



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BİYOKOMPOZİT SUBSTRATLARDA KÜLTÜRÜN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE - KAYNAKLI
EKSTRASELLÜLER VEZİKÜLLERE OLAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Neziha Ayşenur KURT

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN**

**ANKARA
2022**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Biyokompozit Substratlarda Kültürün Mezenkimal Kök Hücre-Kaynaklı Ekstrasellüler Veziküllere Olan Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir / hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Neziha Ayşenur KURT

Tarih: 15 / 12 / 2021

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda Neziha Ayşenur KURT tarafından hazırlanan “Biyokompozit Substratlarda Kültürün Mezenkimal Kök Hücre-Kaynaklı Ekstrasellüler Veziküllere Olan Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20 / 01 / 2022

Doç. Dr. Aysel KOÇ DEMİR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN
Ankara Üniversitesi
Raportör

Dr. Öğr. Üyesi Nuray EMİN
Kastamonu Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler Ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	vii
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	4
1.1.1. Ekstrasellüler Veziküller İle Haberleşme / Sinyal İletimi	5
1.1.2. Ekstrasellüler Veziküller (EV)	7
1.1.3. Kemik Doku	19
1.1.4. Elektromanyetik Alan	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Gereç	32
2.2 Yöntem	36
2.2.1. Biyokompozit Substrat Yüzey Çalışmaları	36
2.2.2. Hücre Çalışmaları	43
2.2.3. Elektromanyetik Alan Çalışmaları	48
2.2.4. Ekstrasellüler Vezikül Çalışmaları	49
2.2.5. İstatistiksel Analizler	53
3. BULGULAR	54
3.1. Biyokompozit Substrat Yüzey Çalışmaları	54
3.1.1. Kemik Hücre Dışı Matriks (K-HDM) Kaynaklı Biyokompozit Jellerin Karakterizasyonu	54
3.2. Hücre Çalışmaları	67
3.2.1. İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu	67
3.3. Ekstrasellüler Vezikül Çalışmaları	74
3.3.1. Eksozom İzolasyonu Ve Karakterizasyonu	74
3.3.2. Eksozomların Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi	80

3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	81
3.3.4. Eksozom Yüzey Belirteçlerinin Analizi (Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi)	82
3.3.5. Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi	83
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	86
ÖZET	94
SUMMARY	95
5. KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	
Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	



ÖNSÖZ

Ekstrasellüler veziküllerin farklı birçok hastalığın tanı ve tedavisinde kullanımının yanı sıra ilaç salım sistemi olarak da kullanılabileceği, böylece yenileyici tıp için yüksek bir potansiyel taşıdığı bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, farklı biyokimyasal bileşimlere ve sertlik seviyelerine sahip biyokompozit hidrojel substratlar üzerinde mezenkimal kök hücre kültürleri yürütülerek, farklı substrat yüzeylerin mezenkimal kök hücrelerin salgıladığı ekstrasellüler veziküllere olan etkileri incelenmiştir.

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden itibarenengin bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, tüm çalışmalarına destek veren, bana rehberlik eden ve yolumu aydınlatan danışman hocam sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tamamına yaptığı katkılarının yanı sıra verdiği zaman, değerli bilgileri ve fikirleri ile bana destek olan hocam sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü) sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen sevgili hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma, kısacası tüm ElçinLab ailesi üyelerine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda sonuna kadar arkamda olan ve hayallerimin peşinden gitmem konusunda beni yüreklendirirken maddi - manevi desteklerini esirgemeyen babam Cevat KURT'a ve annem Yasemin KURT'a, ağabeyim Adil Cenap KURT'a ve sevgili eşi ablam Sinem KURT'a, farkında olmasa da sayesinde kendi çocukluğumu görebildiğim yeğenim Almira'ya göstermiş oldukları sabır, anlayış ve fedakârlıklardan dolayı en içten şükranlarımı sunarım.

Neziha Ayşenur KURT

Ankara, Ocak 2022

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	Bovine Serum Albumine (Sığır Serum Albümini)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etanol
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötal Sığır Serumu)
FT-IR	Fourier transform infra-red (Fourier dönüşümlü kızılötesi)
HCl	Hidroklorik asit
HA	Hidroksiapatit
HDM	Hücre Dışı Matriks
MTT	[3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
NaCl	Sodyum klorür
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
K - HDM	Kemik hücre dışı matriks
iAMKH	İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücreleri
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
mV	Milivolt
Hz	Hertz

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Ekstrasellüler veziküllerin genel özellikleri (Agrahari ve ark. 2019' dan uyarlanmıştır.)	8
Şekil 1.2. Eksozomların içerdiği moleküller ve vücutta buldukları bazı yerler (İbrahim ve Marban 2016'dan uyarlanmıştır.)	11
Şekil 1.3. Eksozomların lipit kompozisyonu (Skotland ve ark. 2017'den uyarlanmıştır.)	14
Şekil 1.4. Eksozomların protein kompozisyonu (Kourembanas ve ark. 2015'ten uyarlanmıştır.)	15
Şekil 1.5. Makro ölçekten mikro ölçeye kemik doku bileşenleri	20
Şekil 1.6. Periosteum ve endosteum (Buckwalter ve ark. 1995'ten uyarlanmıştır.)	24
Şekil 1.7. Periosteum (Li ve ark. 2016'dan uyarlanmıştır.)	25
Şekil 1.8. Endosteum	26
Şekil 1.9. İnsan femur kemiğinde bulunan kompakt ve spongiyöz kemik dokusu (Willems ve ark. 2014'ten uyarlanmıştır.)	27
Şekil 2.1. Sığır femur kemiği	36
Şekil 2.2. A) Dokuda süngerimsi kemik, B) Dokudan çıkarılmış süngerimsi kemik	37
Şekil 2.3. Süngerimsi kemiğin HCl ile muamele edilmesi	38
Şekil 2.4. A) Deselüerizasyon öncesi süngerimsi kemik doku, B) Deselüerizasyon sonrası kemik HDM	39
Şekil 2.5. Farklı grup jeller ile (B, BH50 ve BH100) steril koşullarda hücre kültür kaplarının tabanlarının kaplanması	40
Şekil 2.6. Tetrazolyum tuzunun (MTT) formazan bileşiğine yükseltgenmesi	42
Şekil 2.7. Düşük frekanslı- darbeleri elektromanyetik alan maruziyeti oluşturmak için kurulmuş sistem	48
Şekil 2.8. İnkübatörde bulunan helmholtz bobinleri arasına hücre kültür kaplarının yerleştirilmesi	49
Şekil 2.9. Numunelerin altın ile kaplanması	51
Şekil 2.10. Görüntüleme için kullanılan taramalı elektron mikroskobu	51
Şekil 3.1. B Grubuna ait 100X SEM görüntüsü	54
Şekil 3.2. B Grubuna ait 500X SEM görüntüsü	55

Şekil 3.3. BH50 Grubuna ait 100X SEM görüntüsü	56
Şekil 3.4. BH50 Grubuna ait 500X SEM görüntüsü	56
Şekil 3.5. BH100 Grubuna ait 100X SEM görüntüsü	57
Şekil 3.6. BH100 Grubuna ait 500X SEM görüntüsü	57
Şekil 3.7. Hücre tohumlanmış B Grubuna ait 100X SEM görüntüsü	58
Şekil 3.8. Hücre tohumlanmış B Grubuna ait 200X SEM görüntüsü	58
Şekil 3. 9. Hücre tohumlanmış B Grubuna ait 500X SEM görüntüsü	59
Şekil 3.10. Hücre tohumlanmış BH50 Grubuna ait 100X SEM görüntüsü	59
Şekil 3.11. Hücre tohumlanmış BH50 Grubuna ait 200X SEM görüntüsü	60
Şekil 3.12. Hücre tohumlanmış BH50 Grubuna ait 500X SEM görüntüsü	60
Şekil 3.13. Hücre tohumlanmış BH100 Grubuna ait 100X SEM görüntüsü	61
Şekil 3.14. Hücre tohumlanmış BH100 Grubuna ait 200X SEM görüntüsü	61
Şekil 3.15. Hücre tohumlanmış BH100 Grubuna ait 500X SEM görüntüsü	62
Şekil 3.16. B grubuna ait FT-IR spektrumu	63
Şekil 3.17. BH50 grubuna ait FT-IR spektrumu	63
Şekil 3.18. BH100 grubuna ait FT-IR spektrumu	64
Şekil 3.19. Sitotoksosite analizi sonucunda elde edilen verilere göre hücre canlılık oranları	65
Şekil 3.20. Standart kültürde 0., 1., 3. ve 7. günlerdeki hücre canlılığı ve çoğalması	66
Şekil 3.21. EMA maruziyetinde 0., 1., 3. ve 7. günlerdeki hücre canlılığı ve çoğalması	67
Şekil 3.22. iAMKH'lerin invert mikroskop görüntüsü	68
Şekil 3.23. Osteojenik farklılaşma sonrası Alizarin kırmızısı boyama sonucu	69
Şekil 3.24. Osteojenik farklılaştırma sonrası Von Kossa boyama sonucu	69
Şekil 3.25. Adipojenik farklılaştırma sonrası Sudan siyahı boyama sonucu	70
Şekil 3.26. Kardiyojenik farklılaştırma sonrası Hematoksilen - Eozin boyama sonucu	71
Şekil 3.27. iAMKH'lerin oluşturduğu kolonilerin Kristal Viyole boyaması ile makraskobik gösterimi	71
Şekil 3.28. iAMKH'lere ait FCM analizi sonucu immünfentiplleme tablosu	74
Şekil 3.29. 0. Gün grubuna ait boyut yoğunluk grafikleri	76

Şekil 3.30. 3. Gün grubuna ait boyut yoğunluk grafikleri	78
Şekil 3.31. 7. Gün grubuna ait boyut yoğunluk grafikleri	80
Şekil 3.32. Eksozomlara ait SEM görüntüleri	81
Şekil 3.33. Standart protein eğrisi	82
Şekil 3.34. Standart kültür ve EMA maruziyetinde 0., 3. ve 7. gün gruplarına ait CD9/CD63 ifadeleri	83
Şekil 3.35. Standart protein eğrisi	84
Şekil 3.35. Standart protein eğrisi	84
Şekil 3.36. Deney gruplarının 0., 3. ve 7. günlerdeki standart ve EMA maruziyetinde toplam protein içeriklerinin karşılaştırılması	84



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Manyetik alan türleri ve özellikleri	30
Çizelge 2.1. Mezenkimal kök hücreler için immunfenotipleme tablosu	47
Çizelge 3.1. Hücre grupları ve MTT sonucunda canlılık oranları	65
Çizelge 3.2. Eksozomların boyut ve yüzde dağılımı	74
Çizelge 3.3 Eksozomların ortalama zeta potansiyelleri	81



1. GİRİŞ

Son yıllarda yenileyici tıp ve kök hücre alanında hücre temelli tedavilerde doku iyileşmesi için geliştirilen çalışmalar öne çıkmaktadır. Doku yenilenmesine/tamirine yönelik çalışmalarda proliferasyon ve farklılaşma yetenekleri yüksek olan hücreler tercih edilmektedir. Bu amaçla tercih edilen kök hücrelerin kullanımı, hücrelerin immün modülatör veya direkt ve/veya parakrin yollarla salgıladıkları maddelerle ilişkilidir. Kök hücre kullanılan tedavilerde, canlıda oluşturduğu immün cevap, hücrenin özel laboratuvarlarda (GMP) hazırlanmasının gerekli oluşu ve uzun süreler içerisinde hazırlanabilmesi ve ayrıca *in vitro* ortamda kültürü yapılan kök hücrelerin bir ilaç gibi (üçüncü parti) stabilitesini koruyamaması, maliyeti gibi çeşitli önemli sebepler, tedavi amaçlı hücresel çalışmalar için dezavantaj oluşturmaktadır.

Hücre temelli tedavilerden uzaklaşan yeni yaklaşım, hücreless hücreless tedaviler şeklinde ilerlemektedir. Bu yaklaşım, hücreler tarafından salgılanan ekstrasellüler veziküller, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi sekretomların tedavi amaçlı kullanılmasını kapsamaktadır. Ekstrasellüler veziküller genel olarak apoptotik cisimcikler, mikroveziküller ve eksozomlar olmak üzere üçe ayrılır (Borges ve ark., 2013, Yanez-Mo ve ark., 2015, Zaborowski ve ark., 2015).

Bu konuda öne çıkan ekstrasellüler veziküller ise eksozomlardır. Eksozomlar boyutları 30-150 nm arasında değişen hücreler tarafından mikro çevresine salınan ekstrasellüler veziküllerdir (Doyle ve ark., 2019). Eksozomların kargosunda özel proteinler (Stoorvogel ve ark., 2002, Simons ve ark., 2009, Escrevente ve ark., 2011), lipitler (Mashouri ve ark., 2019, Pathan ve ark., 2019, Kalluri ve ark., 2020) deoksiribonükleik asit (DNA) (Lâzaro ve ark., 2014, Yanez-Mo ve ark., 2015), haberci ribonükleik asit (mRNA) (Valadi ve ark., 2007, Skog ve ark., 2008), mikro RNA (miRNA) (Valadi ve ark., 2007, Zhang ve ark., 2015) ve mitokondriyal DNA (Guescini ve ark., 2010, Sansone ve ark., 2017) bulunmaktadır (Sharma ve ark., 2013) ve farklı kargoları da özelliklerini değiştirmektedir.

Eksozomların hücre hücre etkileşiminde (Andaloussi ve ark., 2013), hücrelerin birbirleri ile iletişimi ve sinyalleşmesinde (Valadi ve ark., 2007, Doyle ve ark., 2019) ve hücrelerin farklılaşmasında (Bruno ve ark., 2009) hücreler arası yollarda rol oynadıkları bilinmektedir (Hong ve ark., 2019). Eksozomların fizikokimyasal stabilitesi ve kolay/büyük ölçekte paketlenmesi, hücreler arası iletişimde kullanılabilir olmasını sağlar. Hücre eksozomlarının değişik yüzey substratlarında üretilip bunların iyi bir şekilde karakterizasyonu sonucunda gelecekte hücreler arası iletişimde veya hastalıkların teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılacakları düşünülmektedir.

Bu bağlamda hücrelerin tutunabileceği hücre yüzey substratı olarak kemik HDM kullanıldı. Kemik, vücudu koruyan, destekleyen ve hareketini sağlayan iskelet sisteminin bir bileşenidir. Kemik aynı zamanda kanın oluşumunu sağlayan kemik iliği gibi özelleşmiş dokuları da koruma görevi bulunan bir yapıdır. Kemik dokusu vücudumuzda bulunan kalsiyumun büyük bölümünü depolar ve ihtiyacımız olan kalsiyum kemikten karşılanır. Kemik dokusu, kemik hücreleri ve matriksinden oluşur.

Kemiğin hücreler arası iletişim elemanları hücreler arası iletişim için iki farklı kaynaktan gelirler; osteoblast soyu (osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar ve osteositler) ve osteoklast soyu (monositler, makrofajlar). Hücreler köken aldıkları kaynakların özelliklerine göre kemiğin farklı fonksiyonlarını gerçekleştirirler.

Kemik matriksi ise organik yapılar (%35) ve organik olmayan (%65) (inorganik) yapılardan oluşur. Organik kemik matriksi tip I kollajen lifleri (%90); kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asitçe zengin proteoglikan ve kollajen olmayan proteinleri içerir. Kemiğin inorganik matriks bileşiminde daha çok kalsiyum fosfat birikimleri ve hidroksiapatit bulunur. Bu yapılar kollajen liflerin arasında yer alır. Kısaca kemik, doğal bir kompozit malzeme olarak kabul edilebilir (Cowin ve ark., 2001, Vaz ve ark., 2011). Bu nedenle, kemik dokusu ile ilişkili süreçlerde, kemiğin doğal yapısından esinlenilmesi önem taşımaktadır. Kemik dokusunda meydana gelen hastalıkların etkin tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekli olup, hastaların daha kaliteli bir hayat

yaşayabilmesi için kemik dokunun kompozit yapısının çözümlenmesi gerekmektedir.

Kemik doku mühendisliği çerçevesinde geliştirilen üç boyutlu (3B) hücre-iskele yapılarının *in vitro* kültürü, kendi HDM bileşimlerini oluşturabilmeleri, aktif sitokin, sinyal moleküllerini salgılayabilmeleri ve kemik hücreleri ile etkileşimi için uygun/doğal biyomalzemenin geliştirilmesi önemlidir (Butler ve ark., 2000). Kemik dokusunda bulunan kalsiyum miktarı ve insanların günlük kalsiyum gereksinimlerinin karşılanmasının dengeli olması bu çalışmalara yönelmenin önemini açığa çıkarmaktadır. Kalsiyum kemiklerden salındığında, kaslarımızın kasılması, kanımızın pıhtılaşması, hücre membranlarının geçirgenliği, sinir impulslarının iletilmesi gibi kompleks biyolojik olayların dengede olması gerekmektedir. Vücudun diğer organlarında ve dokularında da olduğu gibi kemik dokuda makrodan nanoya kadar değişen ölçeklerde bileşenleri içeren hiyerarşik bir düzenleme mevcuttur. Bu düzenlemenin ve dengenin bozulmaması gerekmektedir. Bu zamana kadar hedef kemik dokusuna yönelik çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiş, ancak böyle kompleks bir dokunun yeniden yapılandırılmasındaki zorluklar tamamen aşılamamıştır.

Bu amaçla literatürde belirlenen bilinmeyenler doğrultusunda, tez çalışmasında ilk aşamada kemik dokusundan doğal HDM (K-HDM) eldesine yönelik olarak deselülerizasyon / demineralizasyon protokolleri uygulanmıştır. Bundan sonra, elde edilen K-HDM histokimyasal, spektrofotometrik ve mikroskopik analizler ile karakterize edilmiştir. Elde edilen K-HDM'nin kimyasal bileşimi belirlendikten sonra, hidrojel formunda hücre substratı olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Farklı oranlarda hidroksiapatit katkılarıyla oluşturulan kompozit içeriğe sahip bileşimlerde K-HDM substratları hazırlanmış ve yapıların kimyasal (FT-IR) ve morfolojik (SEM) özellikleri incelenmiştir. Bundan sonra, farklı biyokimyasal bileşimlere ve sertlik seviyelerine sahip biyokompozit K-HDM substratlarında standart koşullar ve elektromanyetik alan maruziyeti ile kültürü yapılan mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin salgıladıkları ekstrasellüler veziküller karakterize edilmiştir.

1.1. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Hücreler tek başlarına ve buldukları ortamlarla ilişki kurmadan canlılıklarını sürdüremedikleri için, hücreler haberleşme (sinyal iletimi/trasdüksiyon) tüm hücrelerin temel bir özelliğidir. Hücreler, kendi aralarında haberleşme/iletişim kurmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu geliştirdikleri mekanizmalar ile hem yakın çevrelerindeki hücreler ile hem de kendilerinden uzakta bulunan hücreler ile iletişim kurabilmektedirler. Hücre-hücre sinyali iletiminde hedef hücrenin uzaklığına bağlı olarak 4 farklı uyarı mekanizmasından bahsedilmektedir; Endokrin uyarı, Parakrin uyarı, Sinaptik uyarı, Otokrin uyarı. Bu mekanizmaların yanında hücreler arası iletişim, hücrenin ilettiği sinyalin uzaklığı esas alınarak sinyal iletimi de kendi arasında 4 grupta incelenmektedir;

1. Endokrin sinyal iletimi; sinyal iletimi molekülleri (hormonlar) özelleşmiş endokrin hücrelerde sentezlenir ve dolaşım yoluyla taşınarak, uzak vücut bölgelerindeki hedef hücreler üzerinde etki gösterir.

2. Parakrin sinyal iletimi; bir hücreden salınan bir molekül, komşu hedef hücreleri etkiler. Sinyal iletimi moleküllerinden bazıları komşu hücrelerin davranışlarını da lokal olarak etkiler.

3. Sinaptik uyarı ile iletim; sinir sisteminde bulunan sinir hücrelerince gerçekleştirilir. Bir sinir hücresinden bir diğer sinir hücresine ya da kas hücresine elektriksel impulsların iletimi, o sinir hücresinden salgılanan ve nörotransmitter adı verilen kimyasal uyarı molekülleri sayesinde gerçekleşir.

4. Otokrin sinyal iletimi; hücrelerin kendi ürettikleri sinyal iletimi moleküllerine yanıt vermesi şeklindedir.

Bu kapsamda ekstrasellüler sinyaller ile iletişim altı aşamada gerçekleşir; uyarı molekülünün sentezi, uyarı hücresinden uyarı molekülünün salınması, uyarı molekülünün hedef hücreye taşınması, özel reseptör proteini tarafından uyarının alınması, reseptör-uyarı molekülü kompleksi tarafından tetiklenen hücreler

metabolizmada değişiklik ve görevi sona eren uyarı molekülünün uzaklaşması şeklinde yürür.

Hücrelerin birbiri ile haberleşmesi oldukça karmaşık olaylar şeklinde gerçekleşmekte olup, bu haberleşmenin tam olarak anlaşılması için daha çok araştırmanın yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

1.1.1. Ekstrasellüler Veziküller İle Haberleşme/ Sinyal İletimi

Kökene, doğası ve özellikleri bakımından hücre dışı veziküllerin çeşitleri bulunduğundan literatürde birçok farklı adlandırma kullanılmaktadır. Boyutlarına göre (mikro veya nano boyutta olanlara: mikropartiküller, mikroveziküller, nanoveziküller, nanopartiküller), hücre veya kaynak dokularına göre (prostazomlar, onkozomlar), işlevlerine göre (kalsifikasyon matris vezikülleri, argozomlar, tolerozomlar) veya sadece hücrelerin dışındaki mevcudiyetlerine göre (ektozomlar, eksozomlar, eksozom benzeri veziküller) adlandırılabilirler. Bu adlandırmalar hala bir tartışma konusu olmaktadır (Gould ve Raposo, 2013, Russel ve ark., 2019). Ektozom, vezikül dökülme, mikropartikül terimleri ve mikroveziküller genellikle plazma membranından (PM) tomurcuklanarak salınan 150-1.000 nm boyutlarındaki vezikülleri ifade eder.

Eksozom terimi başlangıçta boyutları 40 ile 1000 nm arasında değişen çeşitli hücre kültürlerinden ve 5-nükleotidaz aktivitesi olan vezikülleri adlandırmak için kullanılmıştır (Trams ve ark., 1981). Ancak, bu terim, 1980'lerin sonlarında, retikülosit farklılaşması sırasında multiveziküler füzyonun bir sonucu olarak salınan endozomal kökenli küçük (30-100 nm) veziküller için benimsenmiştir (Johnstone ve ark., 1987). Bu çalışmalardan on yıl sonra, B lenfositlerin ve dendritik hücrelerin (DC'ler) de benzer endozomal vezikül salgıladıkları gösterilmiştir (Raposo ve ark., 1996, Zitvogel ve ark., 1998). Birçok farklı hücre tipinden, hematopoietik ve hematopoietik-olmayan hücrelerden eksozomal veziküllerin serbest bırakıldığı gösterilmiştir. Çalışmaların çoğunda hücre kültürlerinin kullanılması nedeniyle, salgılanan veziküllerin biyogenetik kökenine (endozomal kökenine) dikkat edilebilmiştir. Bununla birlikte, çoğu hücrenin muhtemelen hem PM hem de endozomdan türetilmiş vezikülleri serbest

bırakabildiği çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle, birçok çalışmada EV'lerin eksozomlar olarak adlandırılmasına ve buna karşılık geldiği kabul edilmesine rağmen MVB'lerin intralüminal veziküllerin (ILV'ler) kökenlerine ait oldukları hakkında sağlam kanıtlar olmaması nedeniyle daha detaylı tanımlama araştırmalarının yapılması gerekmektedir. Ancak, günümüzde eksozomlar ve MV'lerin aralarında ayırım yapılmasına izin verecek yeterli yöntemlerin olmaması, bu konudaki çalışmalar için sınırlayıcı olmaktadır. Eksozomların ve MV'lerin birbirlerinden ayırt edilmesine yönelik olarak, boyut, yapı, yüzdürme (buoyant) yoğunluğu veya protein bileşimi gibi özellikleri incelenmekte olup, yeni izolasyon yöntemleri için EV topluluğu ve bu konuda çalışan diğer gruplar EV veri tabanında taranmaktadır (Kalra ve ark., 2012, Russella ve ark., 2019).

Hücre dışı veziküller olarak adlandırılan ekstrasellüler veziküller, hücreler tarafından hücre dışı ortama salınan nano-boyuttaki keseciklerdir. Çift tabakalı lipit membranlar ile çevrilmiş ve canlıların tümünde olmasa da çoğu hücreler tarafından salınmaktadır. Ekstrasellüler veziküller hücrenin atık bileşenlerini uzaklaştırılması, biyoaktif moleküllerin ve enzimlerin iletilmesi, moleküler bilgilerin taşınması ve aktarılması gibi farklı işlevleri gerçekleştirir (Raposo ve ark., 2018, They ve ark., 2019)

Ekstrasellüler veziküller orijinlerine, oluşum şekillerine, boyutlarına, kargo içeriklerine ve işlevleri arasındaki farklılıklara göre 3 ana gruba ayrılmaktadır; apoptotik cisimcikler, mikroveziküller ve eksozomlar (Mathivanan ve ark., 2010). Bu sınıflandırma, 2018 yılında Uluslararası Hücre Dışı Veziküller Derneği (ISEV) tarafından membranlar ve EV'ler ile ilgili olarak gerçekleştirilen toplantı sonrasında ortak karar alınarak revize edilmiştir (Lötvall ve ark., 2014, They ve ark., 2018). Bu karara göre EV'lerin esas olarak iki hücresel sistemden oluşmuş oldukları kabul edilmiştir;

- 1. PM (mikroveziküller, ektozomlar, mikropartiküller)**
- 2. Endozomal sistem/ MVB (eksozomlar)**

ISEV'in aldığı kararlar arasında;

1. EV biyogenezinde ve salınmasında membranların rolleri;
2. Zarlar, EV alımı ve füzyonu;
3. EV'leri ve zarları incelemek için kullanılan teknolojiler ve stratejiler;
4. EV transferi ve fonksiyonel testler;

Dikkat çekici başlıklar olarak karşımıza çıkmaktadır.

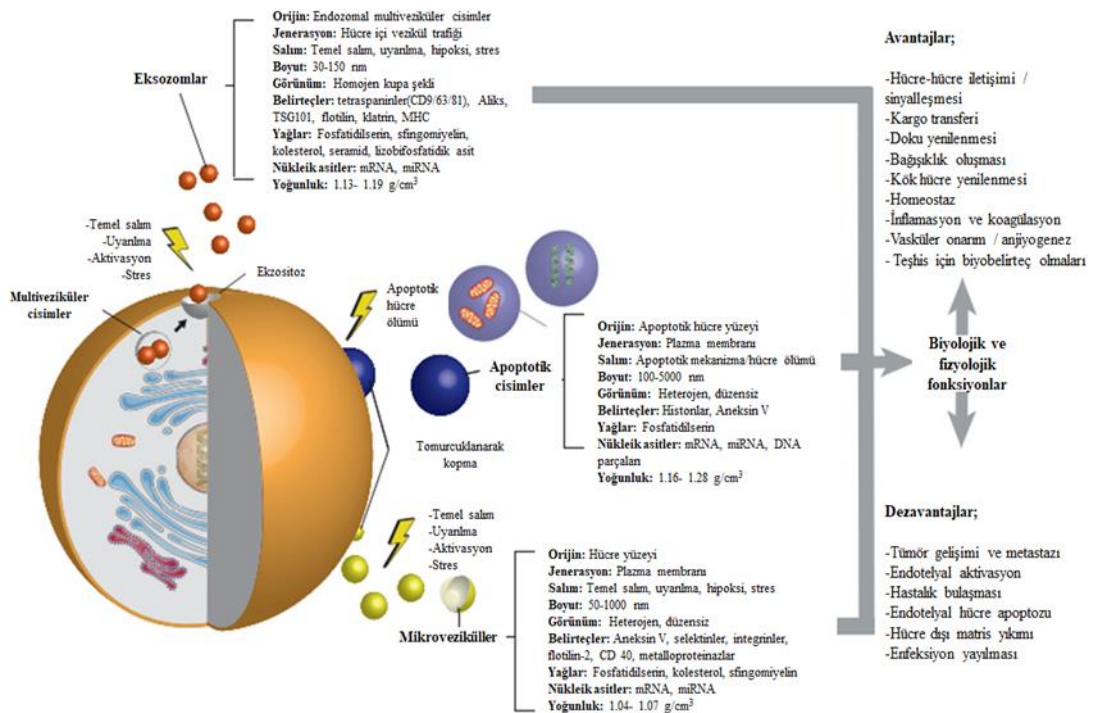
1.1.2. Ekstrasellüler Veziküller (EV)

Ekstrasellüler veziküller; çift katmanlı lipit membran ile sınırlandırılan ve tüm organizmalarda olmamakla birlikte çoğu hücreden salınan nano boyuttaki keseciklerdir. Bu kesecikler, homeostaz, gelişim ve düzenleyici sistemler için önem taşımaktadır. Ekstrasellüler veziküller ayrıca hastalık süreçlerinde rol oynar, inflamasyona aracılık eder ve/veya yanıt verir, hastalığın seyrine ve gelişimine katkıda bulunabilir. Bu özellikleri bakımından teranostik uygulamalar ve teşhis için umut vaat etmektedirler (van Niel ve ark., 2018, Russel ve ark., 2019).

Ekstrasellüler vezikül terimi geniş bir vezikül aralığını kapsar, ancak fenotipik heterojenitenin fonksiyonel heterojenite tarafından yansıtılıp yansıtılmadığı henüz kesin değildir. İki potansiyel ekstrasellüler vezikül sınıfı, EV biyogenezinin iki ana hücrel bölgesi tarafından belirlenir ve bunlar; plazma membranı (PM) ile endozomal sistemdir. Başlangıçta plazma membranında dökülen veziküller için 'eksozom' terimi kullanılmasına rağmen, daha sonra bu terimin spesifik olarak multiveziküler cisimciklerin (MVB), plazma membranı ile füzyonu sonucu hücreden salınan intraluminal veziküller (ILV) için kullanılması kabul edilmiştir. Buna karşılık 'mikro vezikül', 'ektozom' ve 'mikropartikül' terimleri doğrudan plazma membranından dökülen vezikülleri tanımlamak için kullanılmıştır. Ekstrasellüler vezikülün alt sınıfları, biyogenez yollarına ek olarak, boyut, şekil, yüzey molekülleri, kargo

içerikleri, zar bileşenleri, köken aldıkları hücre orijinleri ve işlevlerine göre de tanımlanabilir.

Ekstrasellüler veziküllerin sınıflandırılması ve işlevleri için temel belirleyici karakter membran yapısıdır. EV'lerin hangi hücrelerden salgılandığının anlaşılması için, kargo içeriği, zar yapısı (özel lipit ve protein) ve boyutlarının incelenerek karara varılması gerekmektedir (Osteikoetxea ve ark., 2015, Janas ve ark., 2015, Kormelink ve ark., 2016, Abels ve Breakefield, 2016, Lea ve ark., 2017, Zhang ve ark., 2018).



Şekil 1.1. Ekstrasellüler veziküllerin genel özellikleri (Agrahari ve ark. 2019' dan uyarlanmıştır.)

A) Plazma Membranı (PM)

Mikroveziküller

Mikroveziküller; ortalama 100-1000 nm boyut aralığında, plazma membranı orijinli ekstrasellüler veziküllerdir (Biancone ve ark., 2012). Hücre zarının tomurcuklanmasının ardından, çeşitli protein ve enzimlerin etkileri ile hücre dışı ortama salınmaktadırlar. Mikroveziküller, köken aldıkları hücre zarının belirteçlerini

ifade eder ve hücre içi bilgi içerir, ancak boyut ve üretildikleri mekanizma açısından eksozomlardan farklılık gösterir.

Mikrovezikül salımı, hücrelerin fiziksel veya biyokimyasal tetikleme mekanizmalarına tabi tutulmasıyla *in vitro* uyarılabilir ve bunların fiziksel /fonksiyonel özellikleri, gelişen analitik teknolojiler kullanılarak karakterize edilebilir. Mikroveziküller boyut ve şekil olarak heterojen dağılım göstermektedirler ve çeşitli RNA, DNA, protein ve lipitleri de içermektedirler (Mohammadi ve ark., 2020).

Ektozomlar

Plazma membranı yüzeyinden tomurcuklanarak (ektositoz ile) kendiliğinden veya çeşitli uyarılara yanıt olarak salınan boyut aralığı 0.1-1 µm olan mikroveziküllere ektozomlar adı verilir. Ektozomlar, sitozolik içerikli veziküllerdir ve belirleyici olarak çift katmanlı zarlarının dış yüzeylerinde yoğun miktarda fosfatidilserin bulunmaktadır.

Ektozomların, ökaryotik hücreler arasında moleküler bilgi alışverişinde görev aldığı, lökosit, eritrosit, trombosit ve tümör hücreleri gibi farklı kökene sahip kaynaklardan türetilenlerinin doğuştan gelen bağışıklık sistemi üzerinde etkilerinin olduğu, makrofajlar ile dendritik hücreleri yeniden programlayarak immünoşüpresif etkilerin oluşmasında ve adaptif bağışıklığın uyarılmasında görev aldıkları bilinmektedir (Cocucci ve Meldolesi, 2011).

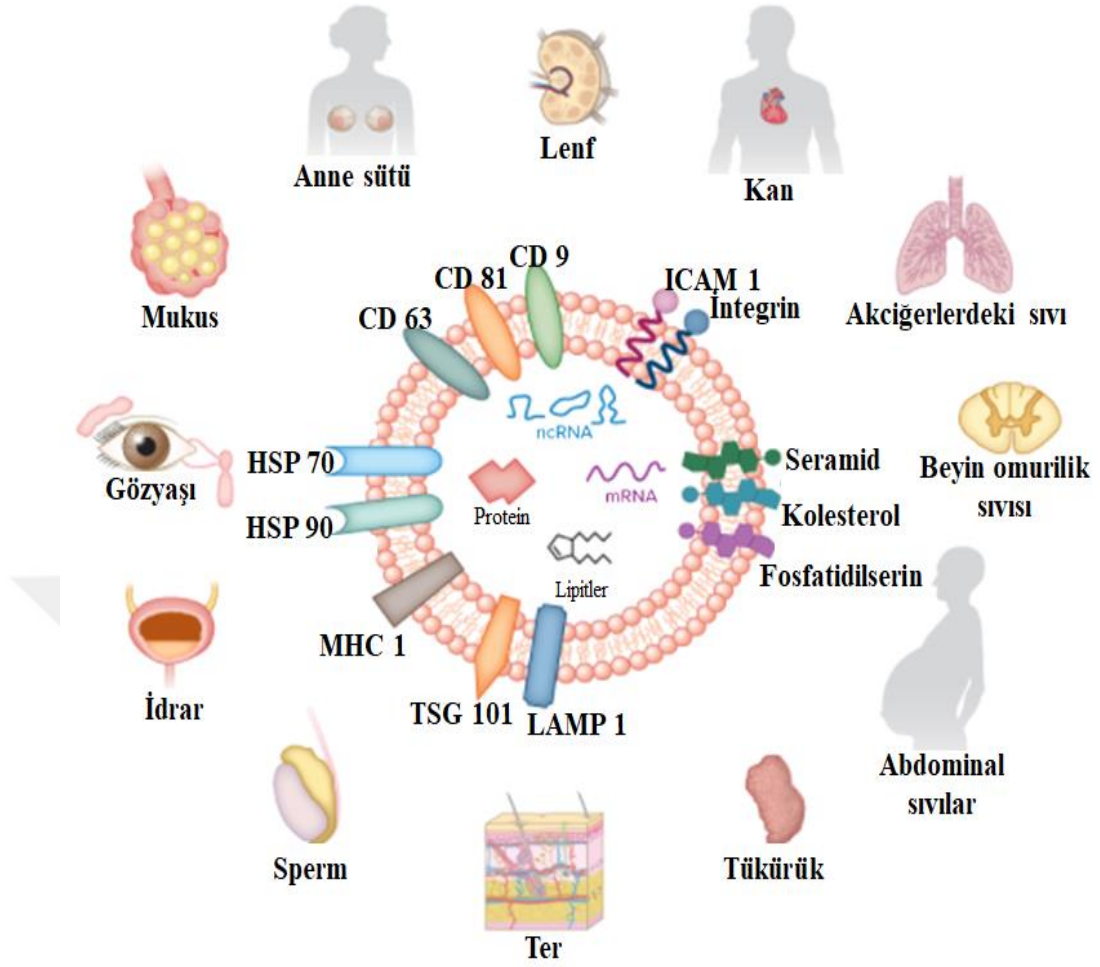
Mikropartiküller

Mikropartiküller (MP), genellikle anyonik fosfolipid fosfatidilserini (PS) ve hücrel kökenlerini temsil eden membran antijenlerini açığa çıkaran 0.1-1 µm boyutlarındaki zar partikülleri olarak tanımlanan, aktive edilmiş veya apoptotik hücreler tarafından salınan mikron altı boyutta veziküllerdir (Sluijter ve ark., 2018, Zhou ve ark., 2021).

B) Endozomal Sistem/ Multiveziküler Cisimcikler (MVB)

Eksozomlar

Eksozomlar; genel olarak 30-150 nm boyut aralığında ve homojen şekilde bulunan biyoaktif nano-keseciklerdir (Doyle ve ark., 2019). Eksozomlar, ökaryot ve prokaryot birçok hücre tipi tarafından, hücre dışı ortama salınan, endositik kökenli, lipit çift katman yapıda, kendilerine özgü biyogenez yolları, lipit bileşimleri ve DNA, RNA, hücre yüzey proteinleri ile hücre içi protein molekülleri gibi kargo içerikleri (Zaborowski ve ark., 2015) bulunan ekstrasellüler veziküllerdir. Eksozomlar, kan (Caby ve ark., 2005), idrar (Pisitkun ve ark., 2004), tükürük (Ogawa ve ark., 2011), amniyotik sıvı (Asea ve ark., 2008), beyin omurilik sıvısı (Vella ve ark., 2007), safra (Masyuk ve ark., 2010), sinoviyal sıvılar, nasal salgılar, anne sütü (Admyre ve ark., 2007), serum, plazma gibi tüm vücut sıvılarında bulunmaktadır (Raposo ve ark., 2013, Ibrahim ve Marbán, 2016).



Şekil 1.2. Eksozomların içerdiği moleküller ve vücutta buldukları bazı yerler (İbrahim ve Marban 2016'dan uyarlanmıştır.)

Yüksek verimli proteomik ve genomik analiz yöntemlerinin uygulamaya geçmesi ve özellikle kanser gelişiminde parakrin mekanizmaların anlaşılmasına başlanması ile, eksozom biyolojisi alanında bir farkındalık oluşmuştur; bir zamanlar hücre atık yönetimine dâhil olduğu düşünülen parçacıkların, artık kısa ve uzun menzilli bir iletişim yolunda yüksek oranda korunan unsurlar olduğu kabul edilmektedir. İncelenen tüm ökaryotik hücre tiplerinin, -hematopoyetik hücreler, epitel hücreleri, nöral hücreler, kök hücreler, adipositler ve kanser hücreleri de dâhil olarak-, *in vitro* kültürde eksozomları salgıladıkları bulunmuştur. Kanonik eksozom üretimi, tek hücreli amipli protistlerden (Kriebel ve ark., 2008), mantarlara (Albuquerque ve ark., 2008), bitkilere (An ve ark., 2007) ve hayvanlara (Korkut ve ark., 2009, Raposo ve

Stoorvogel, 2013) kadar ökaryotların birçok taksonunda gösterilmiştir (İbrahim ve Marbán, 2016).

In vivo şartlarda eksozomlar, kan, asit, beyin omurilik sıvısı, tükürük, süt ve hatta idrar dâhil olmak üzere tüm vücut sıvılarından büyük miktarlarda izole edilebilmektedir. Şekil 2.2’de eksozomların zar içerikleri ve moleküler yükleri bir şema ile birlikte gösterilmiştir. Bu veziküller, başta proteinler, mRNA ve kodlamayan RNA olmak üzere çeşitli sinyalleşme moleküllerini, en önemlisi mikroRNA'ları (miR'ler) ilettiği anlaşılmıştır.

Eksozomların; hücreler arası iletişim, sinyal iletimi, genetik materyal iletimi, immünolojik yanıtın düzenlenmesi, gen transkripsiyonu ve translasyonun düzenlenmesi, anjiogenez, yara iyileşmesi, hücre atıkların uzaklaştırılması, hücre yapım ve onarım, apoptoz, hücre farklılaşması, neoplazi, metabolik süreçlerin programlanması ve düzenlenmesi, hücre göçü, hastalık yayılımı gibi birbirinden çok farklı ve önemli fonksiyonları bulunmaktadır (Schorey ve ark., 2008, Kalluri ve LeBleu, 2020). Eksozomlar ayrıca nükleik asitleri, proteinleri, lipitleri, sinyal moleküllerini ve metabolitleri taşırlar. Sonuç olarak, sağlık ve hastalık gibi fizyolojik durumlarda, yakın ve uzun mesafeli hücreler arası iletişimin aracılığı olup hücre biyolojisinde önemli rolleri bulunmaktadır (Kalluri ve LeBleu, 2020).

Yapılan çalışmalar eksozom içeriğinin hem hücreden hücreye hem de hücrenin o andaki durumuna göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Eksozomlar, bu pleiotropik özelliği sebebiyle; erken tanı ve teşhis için yüksek potansiyele sahiptirler (Gangoda ve ark., 2015, Keerthikumar ve ark., 2016).

a) Eksozom Kompozisyonu

Farklı kaynaklardan elde edilen eksozomlar, farklı yapısal proteinler ve lipitler içerirler. Mathivanan ve arkadaşlarının, ExoCarta veritabanını kullanarak, farklı organizma ve hücre tipleri ile yürütülmüş 146 çalışmaya dayalı olarak 2012 yılında yayınladıkları araştırmalarında, 4563 protein, 1639 mRNA, 764 miRNA ve 194 lipit türünü raporlamışlardır. Günümüzde eksozomlar ile yapılan 286 araştırma çalışması sonucunda 9769 protein, 3408 mRNA, 2838 miRNA ve 1116 lipit türünün

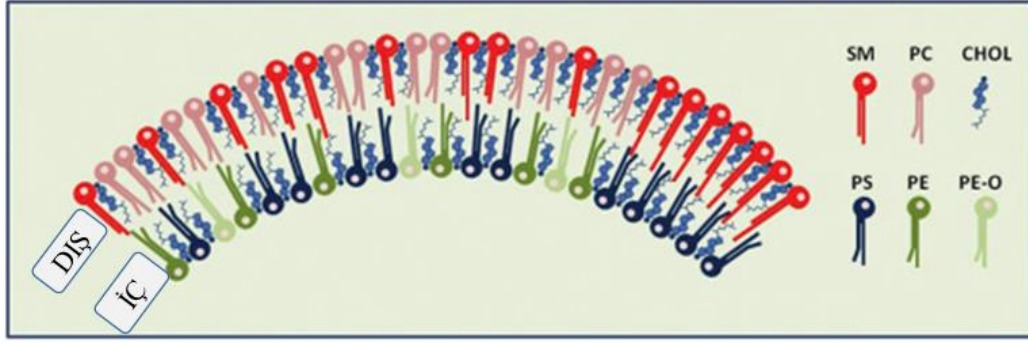
veritabanına işlendiği görülmektedir. Farklı hücre kökenli eksozomlar belirli ortak proteinleri ifade etmektedir. Bu proteinler arasında CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 ve CD82 tetraspanin molekülleri öne çıkmaktadır (Escola ve ark., 1998).

b) Eksozomların Lipit Kompozisyonu

Eksozomlar, kolesterol, digliseridler, sfingolipitler, fosfolipitler, gliserofosfolipitler ve poligliserofosfolipitlerden oluşan çift tabakalı lipit bir zarla çevrelenir (Subra ve ark., 2010). Eksozomların lipit bileşimi, plazma membranının lipit bileşiminden farklıdır ve eksozom membranlarının plazma membranı ile karşılaştırıldığında, daha sert yapıda olmaları gibi farklı fiziksel özelliklerini de açıklar. Bu lipitlerin bazıları, biyogenez sırasında, hedef hücre tarafından tanınma ve hücreye alınmaları gibi yapı dışı işlevlerde de görev almaktadır (Trajkovic ve ark., 2008).

Fosfolipitler, çift katlı zar katmanları arasında düzensiz şekilde dağılır ve bu düzensizlik lipit membranların eğriliğini, akışkanlığını ve elektrostatik özelliklerini belirlemektedir. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi fosfatidilserinler (PS), fosfatidiletanolaminler (PE), fosfatidilinositoller (PI), fosfolipit flippazların varlığı sebebiyle plazma membranın iç yüzeyinde, kolesterol (CHOL), sfingomiyelin (SM) ve fosfatidilkolin (PC) ise dış yüzeyinde daha yoğun şekilde bulunmaktadır (Russel ve ark., 2019).

Yapısal ve iletim bileşenlerinin yanı sıra, eksozomlar; prostaglandinler, lökotrienler ve bu lipitleri üretebilen aktif enzimler dâhil olmak üzere çeşitli biyoaktif lipitleri içerirler (Zakharova ve ark., 2007).

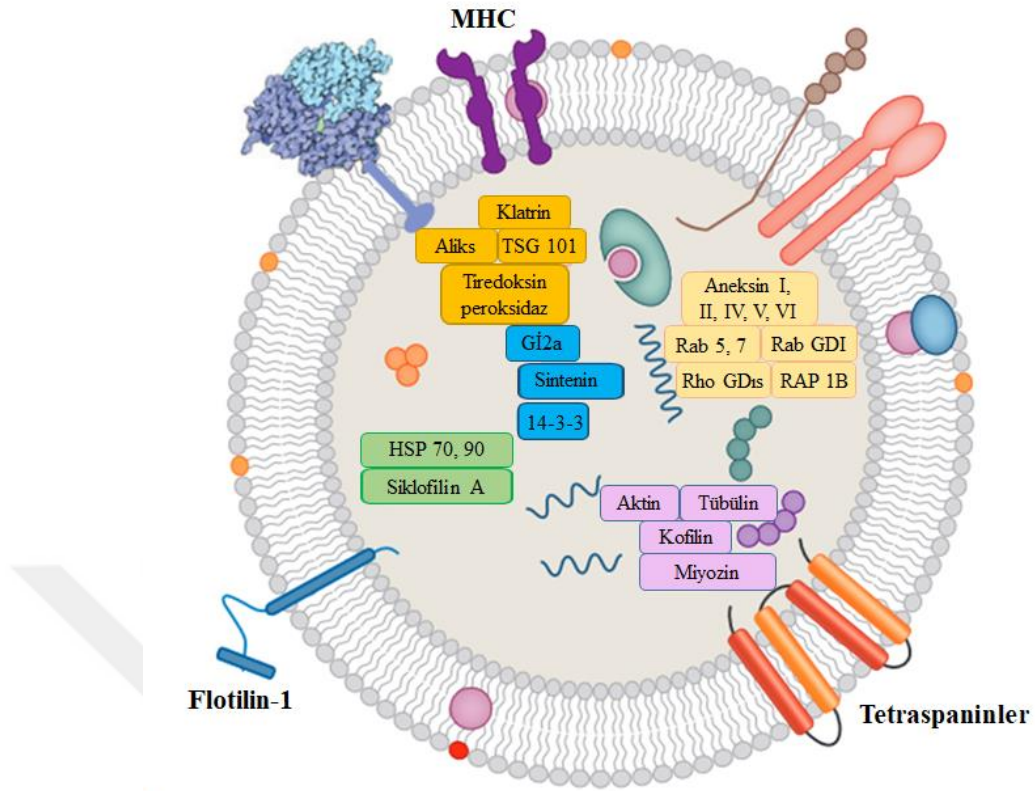


Şekil 1.3. Eksozomların lipit kompozisyonu (Skotland ve ark. 2017'den uyarlanmıştır.)

c) Eksozomların Protein Kompozisyonu

Eksozomlarla ilgili proteinler genel olarak; membran taşıma ve füzyon proteinleri sınıflarına aittir. Bu protein sınıfları; tetraspaninleri (CD9, CD63, CD81), ısı şok proteinleri (Hsp60, Hsp70, Hsp90), GTPazları (EEF1A1, EEF2), endozomal proteinleri (ESCRT 0, ESCRT I, ESCRT II, ESCRT III), adezyon proteinleri (CD31, integrinler) ve spesifik belirteçlerini (Alix) içermektedir. Hücre iskeleti proteinleri (aktin, tübülün, kofilin, vimentin), metabolik proteinler, sinyal iletiminde görevli proteinler (EGFR, EGFR-VIII), taşıyıcı proteinler (Rabs, anneksin) ve albümin eksozomlarda yaygın olarak bulunan diğer protein türleridir.

Hücre kaynağına ve çevre koşullarına bağlı olarak, eksozom proteinlerinin ekspresyon seviyeleri farklılık göstermektedir. Tüm eksozomlar; MHC I (majör doku uyumluluk kompleksi) sınıfı proteinlerini eksprese ederken; MHC II sınıfı proteinlerinin ekspresyonu, dendritik hücreler, makrofajlar, B hücreleri, mikroglia ve bağırsak epitel hücreleri gibi antijen sunan hücrelerden elde edilen eksozomlar ile sınırlıdır.



Şekil 1.4. Eksozomların protein kompozisyonu (Kourembanas ve ark. 2015'ten uyarlanmıştır.)

d) Eksozomların Moleküler Kompozisyonu

Eksozomların pleitropik özellikleri göz önüne alındığında; molekül çeşitliliği çok fazla olduğundan, moleküler kompozisyonları ile ilgili genelleme yapmak oldukça zordur. Her bir eksozom popülasyonunun moleküler içeriği, salındığı hücre ve doku tipine göre büyük ölçüde değişir. Yine de bazı temel yapılar standarttır. Eksozomların boyutları düşünüldüğünde; ribozom ve mitokondri gibi organelleri barındıramayacağı, aynı sebeple çift sarmallı DNA'ları da nadiren bulundurduğu (Thakur ve ark., 2014), fakat daha küçük boyutlarda DNA fragmentleri ve miR'leri, tRNA'ları ve kodlamayan RNA türleri dahil bol miktarda RNA içerdiği ve sinyal çeşitliliğinin bu durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir (Valadi ve ark., 2007, Lotvall ve Valadi, 2007). RNA içeriği de hücre orijinine göre değişkenlik gösterebilir; fakat eksozomlar, sadece salgılandığı hücreye spesifik RNA profilini tekrar etmezler (Valadi ve ark., 2007, Mittelbrunn ve ark., 2011, Bellingham ve ark., 2012). Kısaca, büyük EV'lerin (IEV'ler) köken aldıkları hücreler ile yüksek oranda benzer RNA ekspresyon

profillerine sahip oldukları, küçük EV'lerin (sEV'ler) ise RNA ekspresyonlarının kaynak hücrenin RNA içeriğinden önemli ölçüde farklı olduğu düşünülmektedir (Russel ve ark., 2019).

Eksozomların moleküler kompozisyonunu oluşturan bir diğer yapı da proteinlerdir ve köken aldıkları hücreye göre büyük ölçüde değişkenlik gösterirler. Eksozomlarda en çok görülen proteinler; yüzey proteinleri olan tetraspaninler (CD63, CD9, CD81), ısı şok proteinleri (Hsc70), lizozomal proteinler (Mabp2b), tümör-sensitif gen 101 proteini (Tsg101), hücre adezyon proteini (ALIX) ve çeşitli füzyon proteinleridir (Rani ve ark., 2015, Wang ve ark., 2017). Eksozomların; çeşitli genetik materyal ve proteinler dışında, enzimleri (ADAMs, MMPs, ATPaz, Enolaz) ve transkripsiyon faktörlerini de içerdikleri gösterilmiştir (Chekanova ve ark., 2007, Henderson ve ark., 2012).

Eksozom biyolojisinde, sinyal mekanizmasında görev alan moleküllerin nasıl seçildiğinin, paklendiğinin ve bunların salımının altında yatan moleküler belirleyicilerin anlaşılmasına bağlı olarak hücrelerin stres-hastalık durumlarında bu içerikleri nasıl değiştirdiklerinin ortaya çıkarılması kritik öneme sahiptir.

e) Eksozomların Biyogenezi ve Salımı

Eksozomlar, diğer özelliklerinin yanı sıra biyogenezleri ile de ekstrasellüler veziküller arasında farklılık göstermektedirler. Apoptozun geç evrelerinde bulunan hücrelerde, plazma zarının kabarcıklarından veya dışa doğru tomurcuklanmasından oluşan apoptotik cisimlerin aksine, eksozomlar multiveziküler cisimciklerden (MVB'ler) ortaya çıkar, endoplazmik retikulumda sınıflandırılan ve golgi kompleksinde işlenen yük ile kaynaşan plazma membranının invajinasyonlarından oluşur. Eksozomları içeren bu kese daha sonra serbest bırakılmak üzere plazma membranı ile kaynaşır. Fakat, bu keselerde toplanan bütün veziküller hücre dışına salınmaz. Bir kısım veziküller hücre dışına salınırken bir kısım veziküller de lizozomlar ile birleşerek yok olur (Futter ve ark., 1996, Mayers ve Audhya, 2012). Bu farklılığın temel sebebinin ise; eksozomlarda bulunan kolesterol miktarı olduğu düşünülmektedir. Kolesterolce zengin olan bu grup, hücre dışına salınırken, kolesterol

bakımından fakir olan grup lizozom ile birleşme eğilimindedir ve farklı olarak da lizobisfosfatidik asit içermektedir (Möbius ve ark., 2002, White ve ark., 2006).

Ekstrasellüler veziküllerin zarlarında bulunan lipit yapısı, kaynak hücrenin plazma membranı ile benzerdir. Fakat eksozomlar; plazma membranı dışında golgi kompleksinden de lipitler içermektedir. Böylece mikroveziküllerden, apoptotik cisimciklerden ve kaynak hücrenin plazma membranından daha farklı bir zar yapısına sahiptirler.

Multiveziküler cisimcikler; doğrudan plazma membranından tomurcuklanırken, eksozomlar; erken endozomlara ve intraluminal veziküllere farklılaşarak plazma membranı ile füzyon sonucunda salınan farklı boyutlardaki nano veziküllerdir. Geç endozom membranlarının invajinasyonu ile; multiveziküler cisimcikler içinde, intraluminal cisimcikler oluşmaktadır (Ganapathi ve ark., 2018).

Eksozomların biyogenez mekanizmaları, ESCRT proteinleri Hrs, CHMP4, TSG101, STAM1, VPS4 ve Sindekan-sintenin-ALIX kompleksi, nSMase2, PLD2 ve CD9 gibi diğer proteinler dahil olmak üzere çeşitli protein türleri tarafından yönetilir (Colombo ve Moita, 2013, Kapustin ve ark., 2015, Hessvik ve Llorente, 2018). Eksozomların hücre dışı ortama salınması, RAB2B, 5A, 7, 9A, 11, 27 ve 35 dahil olmak üzere Rab-GTPaz ailesinin proteinleri tarafından yönlendirilir, SNARE ailesi proteinlerinden VAMP7 ve YKT6, eksozomların hücre dışına salımında görev almaktadır (Fader ve ark., 2009, Gross ve ark., 2012, Kapustin ve ark., 2015, Hessvik ve Llorente, 2018).

Eksozomların biyogenezi, hücre tipi, serum koşulları, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin varlığı- yokluğu olmak üzere birkaç dış faktörden etkilenir. Serum açlığı gibi eksojen faktörler, eksozomların biyogenezini ve salgılanmasını etkiler. Eksozom salımı, Rab27 veya Ral ifadesine bağlıdır ve Rab2741 veya Ral'den yoksun hücrelerde önemli ölçüde azalır. Rab27a ve Rab27b gibi birkaç protein, ekstrasellüler veziküllerin biyogenezinde kritik bir rol oynar (Zheng ve ark., 2013) ve kanser gibi patolojik durumlar sebebiyle aşırı ekspresyonları önemli miktarlarda ekstrasellüler vezikül oluşumunu destekler. Bazı hücre türleri, esas olarak plazma zarından tomurcuklanan kargo proteinleri içeren eksozomları salgılar ve eksozom bileşimi, eksozom

biyogenezinin farklı mekanizmalarından ziyade, ağırlıklı olarak hücre içi protein trafiği yolları ile belirlenir (Fordjour ve ark., 2019).

Eksozomlar, tomurcuklanma verimini artıran, eksozom oluşumunu ve salımını destekleyen zengin bir fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin içeriğine sahiptir. Fosfatidik asit, eksozom biyogenezini destekler ve PLD2, bazı eksozomal yüklerin tomurcuklanmasında rol oynar (Egea-Jimenez ve Zimmermann, 2018). Bu faktörlerin yanı sıra seramid, eksozom biyogenezini düzenleyen ve veziküler tomurcuklanma için gerekli olan membran eğriliğini kolaylaştıran önemli bir lipit molekülüdür.

Eksozom biyogenezinde bir başka kritik faktör, plazma membran homeostazisini, hücre içi protein trafiği yollarını, multiveziküler cisimciklerin olgunlaşmasını ve trafiğini, vezikül tomurcuklanmasını ve salımını düzenleyerek eksozomların biyogenezinde yer alan trans-etkili araçlardır. Örneğin, Rab proteinleri, membran kimliğini belirleyerek, mekanik efektörler ile endozomları ve plazma membranı yolu ile eksozom biyogenezini düzenler (Stenmark ve ark., 2009). Eksozomların kontrolü ve biyogenezinde Rab proteinlerinin işlevleri hücre tipine bağlıdır. Multiveziküler cisimciklerin biyogenezi Rab27a, Rab27b, efektörleri Slp4, Slac2b ve Munc13-4 ve ayrıca Rab 35 ve Rab 11.73 tarafından düzenlenir. Rab27 işlevinin kaybı, eksozom üretiminde ~%50-75 oranında bir düşüşe neden olur (Blanc ve Vidal, 2018). Genel olarak, Rab27 proteinleri hem endozomlarda hem de plazma zarlarında eksozom biyogenezini kontrol ederler. Rab35 ise plazma membranının PIP2 seviyelerini düzenleyerek eksozom biyogenezine katkıda bulunur ve kaybı, eksozom salımının ~%50 oranında azalmasına yol açar (Hsu ve ark., 2010). Ral ailesi de eksozomların biyogenezinde rol oynar ve Ral'in inhibisyonu, plazma membranı yakınında multiveziküler cisimciklerin birikmesine böylece eksozomların ve eksozomal belirteç proteinlerinin veziküler sekresyonunda ~%50 azalmasına neden olur (Hyenne ve ark., 2015). Ral GTPazlar, SDC'lerin eksozomal salımına katılan Arf6 ve fosfolipaz PLD2 dahil olmak üzere çeşitli efektör proteinler aracılığı ile işlev gösterir (Ghossoub ve ark., 2014).

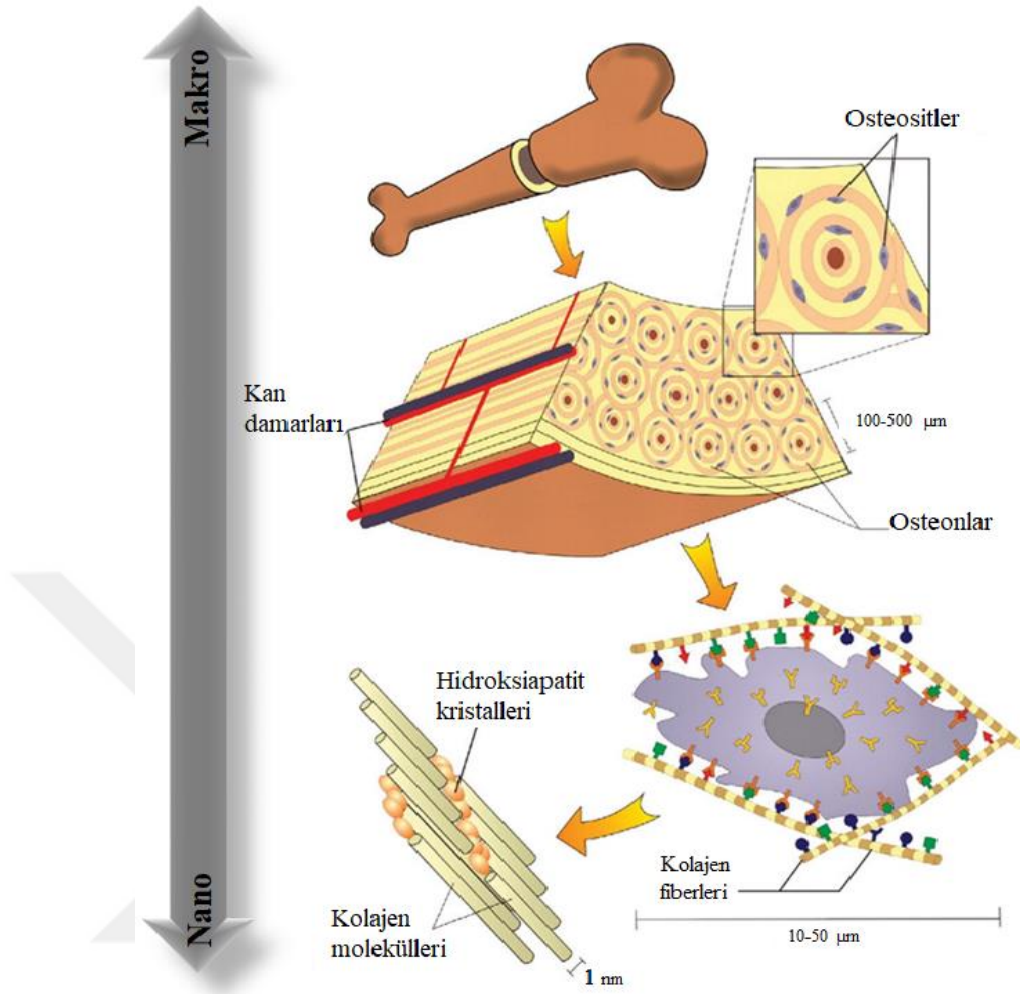
Biyogenez sırasında; karmaşık ESCRT mekanizmalarının, membran bütünlüğünün korunması ve deformasyonunun onarımı gibi farklı işlevleri bulunmaktadır. ESCRT kompleksinin veziküllerin biyogenezine başlıca katkısı,

ESCRT-0'ın ubiquitin bağlanan alt birimleri aracılığı ile endozomal membranın spesifik alanları tarafından tanınması ve salgılanmasıdır. ESCRT-I ve -II kompleksleri de ubiquitin bağlanma noktaları içermektedir (Henne ve ark., 2011). ESCRT-I ve ESCRT-II kompleksleri ile etkileşimden sonra, tomurcuklanma ve hücreden salınma sürecini teşvik etmede rol alan bir protein kompleksi olan ESCRT-III ile birleşmektedir. ESCRT-III kompleksi diğer ESCRT türlerinden farklı olarak ubiquitin bağlanma noktaları içermemektedir ve görevi, oluşan vezikülün kesilerek ayrılması ile ilgilidir. ESCRT-III kompleksi; vezikülün ayrılması için gerekli olan enerjiyi, sınıflandırma proteini Vps4 tarafından sağlamaktadır (Henne ve ark., 2011). ESCRT (TSG101 ve CHMP4) proteini ile ilişkili olan Alix gibi diğer birkaç protein, sindekan ile etkileşim yolu ile eksozomal kargo seçiminde rol oynarlar (Villarroya-Beltri ve ark., 2014).

1.1.3. Kemik Doku

Kemik doku, osteoblastlar, zar hücreleri, osteositler ve osteoklastlar olmak üzere dört farklı hücre tipini barındıran, hücre dışı matrisin mineralleşmesi ile kalsiyum ve fosfat tuzlarınca doygunlaşmış bir bağ dokusudur (Buckwalter ve ark., 1995, Downey ve Siegel, 2006).

Kemik dokusu, içerdiği hücreler, mineralize yapılar ve inorganik bileşenler ile doğal bir kompozit yapıdır. Kemiğin; vücuda destek ve hareket sağlama, yumuşak dokuların ve hayati organların korunması, mineral homeostazı ile asit-baz dengesinin korunması, büyüme faktörleri ve sitokinleri içermesi, kemik iliğini barındırması dolayısıyla kan hücrelerinin üretilmesi gibi farklı işlevleri bulunmaktadır (Robling ve ark., 2006, Datta ve ark., 2008).



Şekil 1.5. Makro ölçekten mikro ölçeğe kemik doku bileşenleri

A) Kemik Doku Bileşenleri

Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler, büyüme ve transkripsiyon faktörlerini içeren, osteoblastlara farklılaşma kapasitesi olan mezenkimal kök hücrelerdir. Osteoblast öncüleri olarak da adlandırılabilen bu hücreler, kemiğin endosteum, periosteum tabakaları ile Havers kanallarının iç yüzeyinde bulunmaktadır. Osteoprogenitör hücreler, uygun koşullar altında yönlendirildiğinde fibroblastlara, adipositlere, kondrositlere ve kas hücrelerine de öncülük edebilmektedir (Aubin ve ark., 2001). Osteoprogenitör hücreler, kemiğin doğal gelişim sürecinde ve onarılması veya yenilenmesi gereken durumlarda işlevseldir (Barrère ve ark., 2006).

Osteoblastlar

Osteoblastlar; osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan ve aktif kemik oluşumunun olduğu bütün bölgeleri kaplayan, kübik ya da silindirik şekilli kemik hücreleridir. Bu hücreler kemik-osteoblast arayüzü boyunca konumlanarak, kemiğin mineralize olmayan matriksini (osteoid) oluştururlar ve osteoid mineralleşmesini başlatarak bu süreci kontrol ederler.

Osteoblastlar, tip I kollajen ve kollajen olmayan protein ürünleri oluştururlar. Kollajen olmayan protein ürünleri ise, osteokalsin, osteopontin, osteonektin, kemik siyaloproteini, osteoprotegerin, makrofaj-koloni stimüle edici faktör ve kemiği uyarıcı aktiviteler ile kemik morfojenetik protein ailesinin üyeleri olan büyüme faktörleridir. Osteoblastlar, güçlü bir sitokimyasal reaksiyon olan alkalın fosfataz aktifliğine sahiptirler. Alkalın fosfataz, yüksek pH değerlerinde, monofosfat esterlerini hidroliz eden bir hücre yüzeyi proteindir (ekto-enzim) ve aktifliği, hücre protein sentezinin sona ermesi sonucu osteoblastların mineralize kemik matriksine gömülerek osteosit haline gelmeleri ile son bulmaktadır. Osteoblastlar, protein ürünleri dışında, hücre içi ve dışında kullanılmak üzere kalsiyum fosfat minerallerini de üretirler ve kemik oluşumunun tamamlanması ile yassılaşılarak osteositlere dönüşürler (Annaz ve ark., 2004, Kartsogiannis ve ark., 2004).

Osteositler

Osteositler; olgun bir insan iskeletinde bulunan kemik hücrelerinin %90'ından fazlasını oluşturmakta olup yaklaşık 25 yıl süre ile vücuttaki varlıklarını devam ettirmektedirler (Cooper ve ark., 1966). Osteositler, tek çekirdekli, sitoplazma hacimleri organel içeriği ile aktivitelerine bağlı olarak değişebilen, kemik hücre dışı matriksi varlığının devamlılığını sağlayan, osteoblastik soyun en olgun ve farklılaşmış son hücreleridir. Bu hücreler kireçleşmiş hücre dışı matriks içinde kalan ve metabolik faaliyetleri azalan osteoblastlardan farklılaşan, bölünme yetenekleri bulunmayan hücrelerdir.

Hücre dışı matriks, osteositleri birbirinden uzaklaştırarak hücrelerin etrafında lakünler oluşturmaktadır. Lakünler arasında kalan osteositler, uzantılar oluşturarak kanalikül adı verilen küçük kanallar boyunca ilerler ve bu şekilde lakünler arasında bağlantı oluştururlar. Besin maddeleri bu kanaliküller boyunca lakün içerisine yayılmaktadır. Kanaliküller içinde uzantılar yapmış komşu hücreler ise gap junksiyonlar (oluklu bağlantılar) sayesinde bağlantı oluşturmaktadır. Bu uzantılar aracılığıyla çevre hücreler ile iletişim kurulmakta ve bu iletişim sayesinde olası bir kemik deformasyonunun algılanması-onarılması, kemik oluşumunun desteklenmesi, iyon geçişinin koordine edilmesi gibi önemli fonksiyonlar yerine getirilmektedir (Buckwalter ve ark., 1995).

Osteoblastların gelişimleri, kemik morfogenetik protein (BMP) ailesi, transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) gibi büyüme ve transkripsiyon faktörleri ile Cbfa1 (core-binding factor family) ve BMP7 (Bone morphogenetic protein 7) gibi genler ile kontrol edilmektedir.

Osteoklastlar

Osteoklastlar; çeşitli faktörlerin etkisi altında monosit-makrofaj soyundan farklılaşmış, hematopoietik kök hücre kökenli çok çekirdekli hücrelerdir ve kan dolaşımı vasıtası ile kemik iliğine ulaşırlar, buradan subosteoklastik bölüm veya Howship lakünü adı verilen kemik yüzeyinde yer alan sığ çukurlar içine yerleşirler.

Osteoklastlar, hedef kemik matriksine bağlanarak, H^+ - ATPaz (adenozin trifosfat) ile kemik emilimi için gerekli bir asidik çevre oluşturur ve mineral kaybı ile kemiğin inorganik bileşenleri yıkılır. İnorganik bileşenlerin yıkılmasının ardından katepsin K adı verilen lizozomal bir proteaz ile kemiğin organik bileşenleri enzimatik yıkıma uğrar. Bu süreç sonucu çeşitli bölgelerdeki yıkımın ardından ortama büyüme faktörleri salgılanarak ossifikasyon uyarılır, osteoblastlar tarafından oluşturulan yeni kemik ile doku yeniden şekillenerek yenilenir ve bu işlemlerin birbirini takip etmesi ile kemik doku için homeostaz sağlanmış olur.

Hücre Dışı Kemik Matrisi

Lamelar kemik dokusunun hacimsel olarak %90'ından fazlasını, organik ve inorganik içeriğe sahip kemik matrisi oluşturur (Bostrom ve ark., 2000).

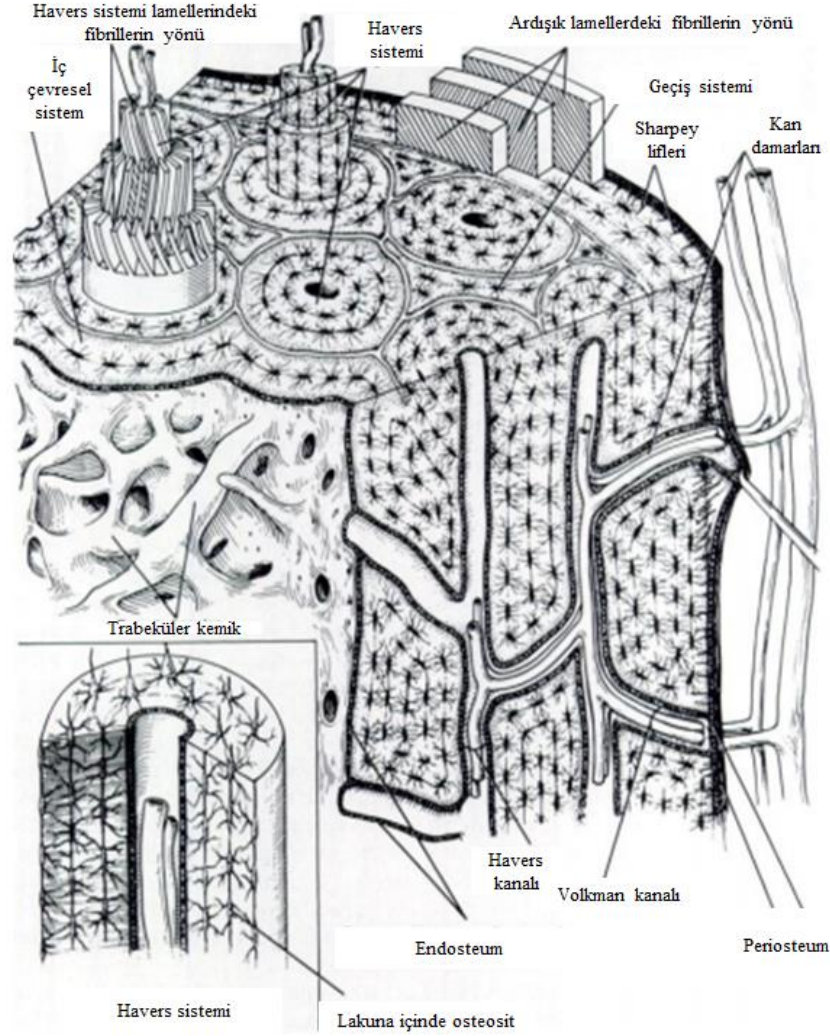
İnorganik kısım matrisin yaklaşık %65'ini meydana getirir ve temel olarak kalsiyum fosfat, kalsiyum karbonat, az miktarda kalsiyum florür ve magnezyum florür içerir. Kalsiyum fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kollajen lifler boyunca dağılmış halde konumlanırlar. İnorganik matris iyon rezervuarı olarak görev yaparak kemiğin dayanıklılık ve sertliğini sağlar (Buckwalter ve ark., 1998, Bostrom ve ark., 2000).

Kemik matrisinin %35'i ise, kemiğe elastikliğini de sağlayan organik bileşiklerden oluşmaktadır. Temel olarak kollajenden (%90) oluşan organik kısım, tip I, V, XII kollajen lifleri ile, kondroitin sülfat, keratan sülfat, hiyalüronik asit gibi proteoglikanları ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, siyaloproteinler, fosfoproteinler gibi kollajen olmayan proteinleri ve büyüme faktörlerini içermektedir. Tip I kollajen kemik matrisinin temel proteindir (Rodan ve ark., 1992, Bostrom ve ark., 2000, Nancy ve ark., 2003).

B) Kemik Zarları

Kemik zarı hücreleri, kemik rezorpsiyonunun ve kemik oluşumunun meydana gelmediği, kemik yüzeylerini kaplayan hareketsiz düz şekilli osteoblastlardır. Bu hücreler; ince- düz bir çekirdek ve endoplazmik retikulum ile golgi aygıtı gibi bazı organelleri içerirken, sitoplazmaları kemik yüzeyi boyunca uzanmaktadır (Miller ve ark., 1989). Bu hücrelerin bir kısmı kanaliküllere uzantılar oluştururken, bir kısmının da zar hücrelerine komşu olan hücreler ve osteositler ile bağlantı oluşturduğu gözlenmektedir (Miller ve ark., 1989, Aarden ve ark., 1994). Kemik zarı hücreleri; kemiğin fizyolojik durumuna göre salgı üretimi yapabilmekte, boyutlarını artırabilmekte ve kemik hücrelerini çevreleyerek şekillerini değiştirebilmektedir (Donahue ve ark., 1995). Kemik zarı hücrelerinin; osteoklastlar ile kemik matrisi arasındaki direkt etkileşimi engelleyerek, kemik erimesini önleyebildiği ve osteoklast farklılaşmasına katıldığı bilinmektedir (Mosley ve ark., 2000, Andersen ve ark., 2009). Kemik zarı hücrelerinin; kemiğin diğer bileşenleri ile, kemiğin oluşumu sırasında ve

mevcut durumunda var olan anatomik bütünlüğünün korunmasında önemli görevleri bulunmaktadır (Everts ve ark., 2002).

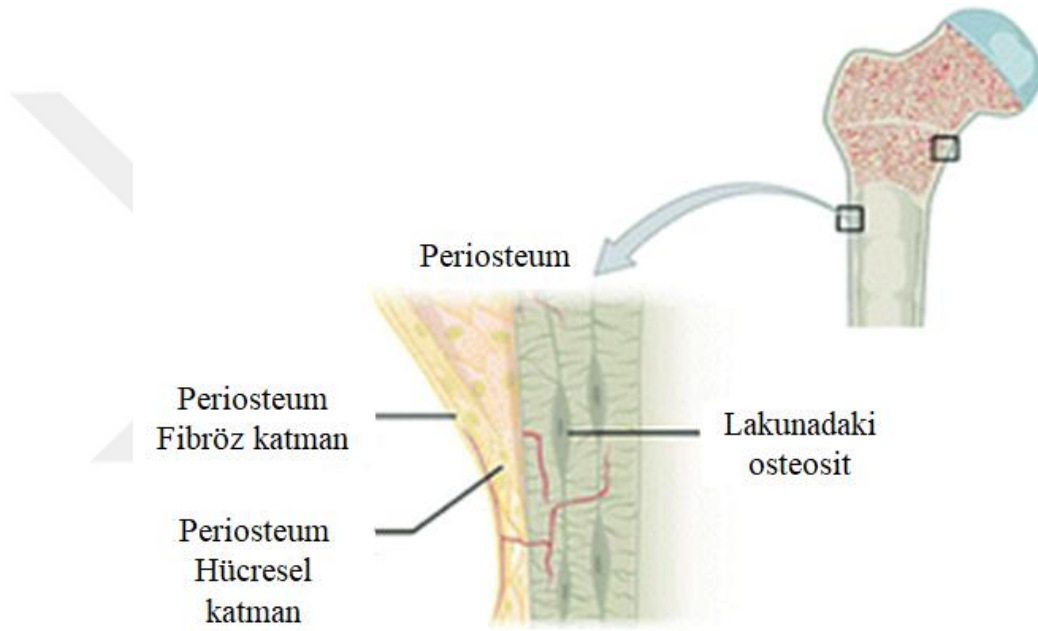


Şekil 1.6. Periosteum ve endosteum (Buckwalter ve ark. 1995'ten uyarlanmıştır.)

Periosteum

Periosteum; dış fibröz kısmında kollajen fibrilleri ve fibroblastları içeren, iç kısmında ise osteoprogenitör hücreleri içeren hücrece zengin kemiği dıştan saran çift katmanlı kalın bir zar tabakasıdır (Squier ve ark., 1990, Buckwalter ve ark., 1995, Dwek ve ark., 2010). Periosteumun, kemik matriksine bağlantısı Sharpey fibrilleri olarak isimlendirilen periosteal kollajen fibriller ile sağlanır (Dwek ve ark., 2010). Periosteumda; kan damarları, lenf damarları ve sinir tellerinden oluşan yoğun bir ağ

tabakası bulunur ve bu tabaka kemiğin kanla beslenmesine önemli ölçüde katkıda bulunur (Lucio ve ark., 1992). Periosteum osteojenik özelliktedir. Periostal hücreler; lokal veya sistemik uyarılara yanıt oluşturarak kemik metabolizması için önemli fonksiyonlara katılmaktadır (Bahney ve ark., 2019). Periosteumun kalınlığı bulunduğu kemik türüne göre değişmektedir ve genel olarak yaş ilerledikçe periosteumun kalınlığı azalmaktadır (Uddströmer ve ark., 1978). Periosteum, sesamoid kemik türlerinde bulunmamaktadır (Aper ve ark., 1996, Bland ve ark., 1997).

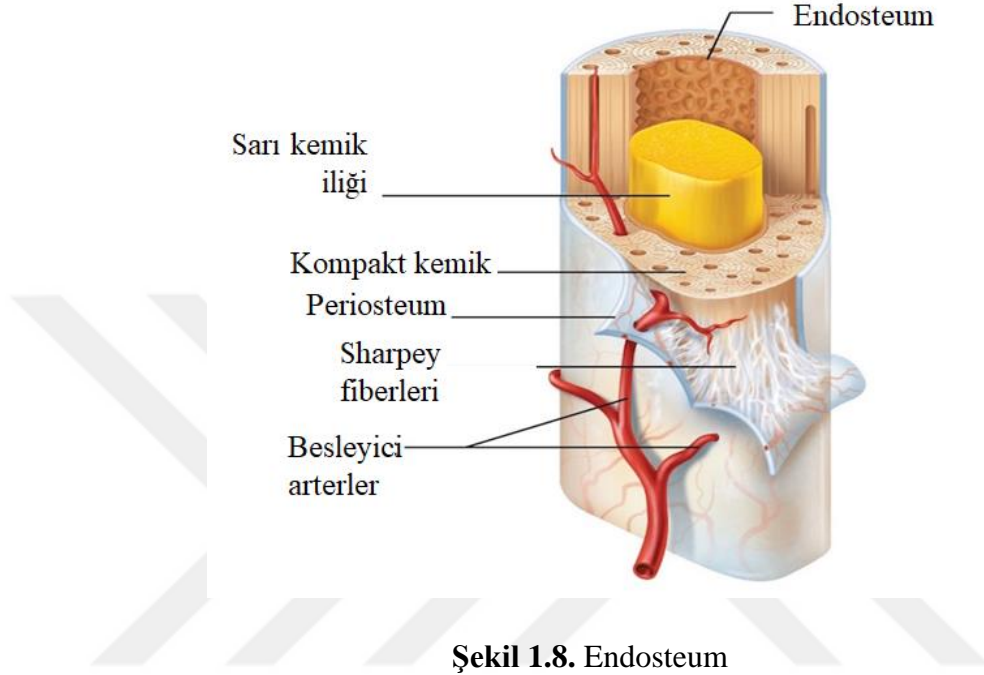


Şekil 1.7. Periosteum (Li ve ark. 2016'dan uyarlanmıştır.)

Endosteum

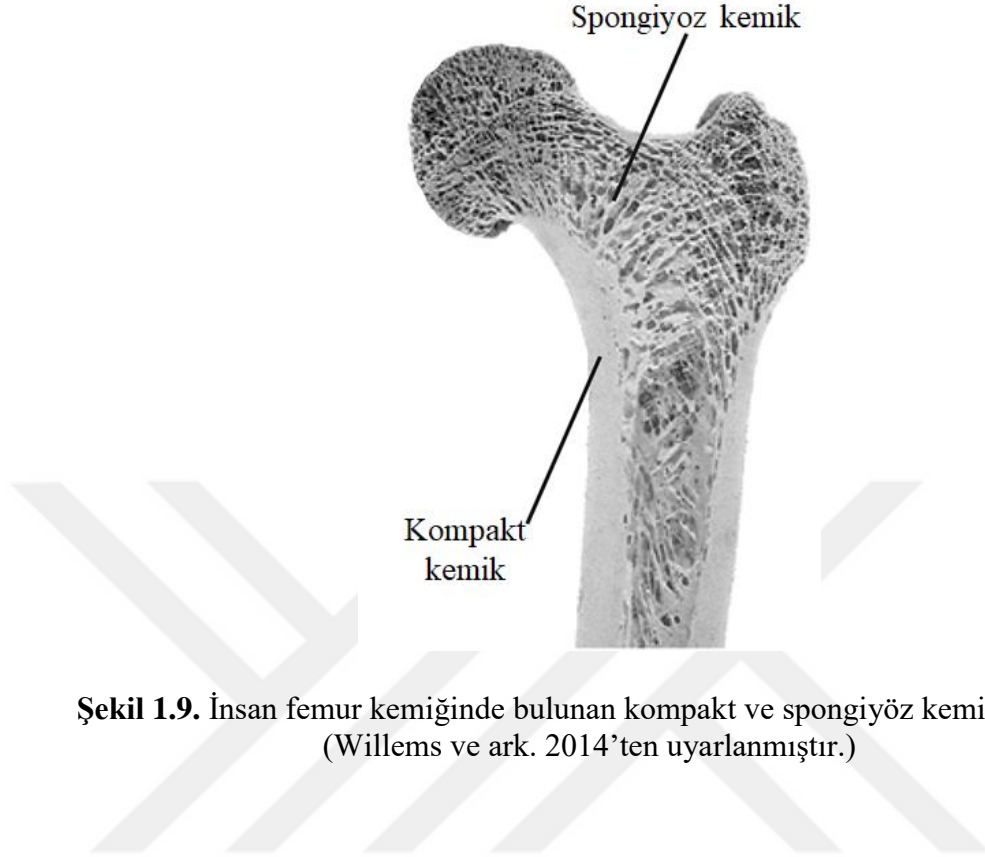
Endosteum; kemik iliği boşluğu zarı olarak da tanımlanan, kemik duvarının iç yüzeyini, Havers kanallarını ve kemiğin tüm iç boşluklarını kaplayan bir zarıdır. Endosteum, osteoprogenitör hücrelerden ve tip-III kollajen liflerden (retiküler lifler) oluşur (Boskey ve ark., 1984, Sims ve ark., 2014). Endosteum, diğer bir kemik zarı olan periosteumdan belirgin şekilde daha incedir (Christodoulou ve ark., 2020). Endosteum; bulunduğu yer ve fonksiyonlarına göre üç başlık altında sınıflandırılabilir, bunlar; kortikal endosteum, osteon endosteum ve trabeküler endosteumdur. Kortikal endosteum; kemik iliği boşluğunu kaplar. Osteon endosteum; osteonları kaplar ve

sinirlerle kan damarlarını içerir. Trabeküler endosteum ise trabeküler kemikte bulunur ve kemiğin büyümesinde ve gelişmesinde rol alır (Cooper ve ark., 2013, Zhou ve ark., 2014, Ren ve ark., 2015, He ve ark., 2017, Hage ve ark., 2017, Lu ve ark., 2019).



C) Kemik Doku Çeşitleri

Kemik doku; makroskobik olarak kompakt ve spongyöz olmak üzere iki başlıkta sınıflandırılır. Kompakt kemik; yaygın olarak uzun kemiklerin çevrelerinde bulunur ve osteositleri çevreleyen kan damarları ile kanaliküllerin nüfuz ettiği yoğun ve sert bir dokudan oluşur. Trabeküler, spongyöz veya süngerimsi kemik ise; uzun kemiklerin uçlarında, omurlarda, eklem yüzeylerinin yakınında bulunur ve kemik iliği ile çevrili ince plakalar ile bağlantı desteklerinden oluşan bir ağdan oluşur. Kortikal ve trabeküler kemik, hüresel ve moleküler bileşimlerinde çok benzerdir, ancak fonksiyonel ve mekanik özelliklerinde önemli ölçüde farklılık gösterir (Grabowski ve ark., 2015). Kortikal kemik, dokuya sertlik ve dayanıklılık kazandırırken, trabeküler kemik ise metabolik olayların gerçekleştiği yerdir.



Şekil 1.9. İnsan femur kemiğinde bulunan kompakt ve spongiyöz kemik dokusu (Willems ve ark. 2014'ten uyarlanmıştır.)

Kompakt Kemik Doku

Kompakt kemik; sert, sıkı, yalnızca %10 gibi bir kısmı poroziteye sahip, oldukça düzgün bir yapıdadır (Sikavitsas ve ark., 2001). Femur ve tibia gibi uzun kemiklerde, bilek kemikleri gibi kısa kemiklerde, kafatası kemikleri gibi düz kemiklerde ve düzensiz kemiklerde bulunmaktadır (Sikavitsas ve ark., 2001, Baron ve ark., 2003). İskelet sisteminde bulunan kemiklerin %80'inini kompakt kemikler oluşturmaktadır. Kemik boyunca uzunlamasına; Havers kanalları ve bunlara dik şekilde konumlanan Volkmann kanalları bulunur.

Spongiyöz Kemik Doku

Spongiyöz kemik; %50-90 poroziteye ve geniş yüzey alanına sahip bir yapıdadır, bu özelliği ile basınca karşı, kompakt kemiğe kıyasla 20 kat daha az dayanıklıdır (Temenoff ve ark., 1999, Sikavitsas ve ark., 2001). Trabekül adı verilen, çeşitli boyutlarda dallanmalar ve plakalarla sünger ve bal peteği benzeri bir yapı

görünümüne sahiptir. Genellikle kompakt kemik ile kaplı uzun kemiklerin metafizinde ve vertebral cisimlerde bulunmaktadır. Yüzey alanının genişliği ve boşluklu yapısı sayesinde metabolik aktivitelere ev sahipliği yapmaktadır.

D) Kemikleşme Çeşitleri

Kemik yapım işlemi; diğer bir deyişle kemik ossifikasyonu, intramembranöz kemikleşme ve intrakartilagenöz kemikleşme olmak üzere iki ana başlıkta incelenmektedir. Kemik yenilenmesi ve yapımı; intramembranöz kemikleşme sırasında bağ doku kaynaklı hücreler vasıtasıyla gerçekleşirken; intrakartilagenöz kemikleşme sırasında kıkırdak doku kaynaklı hücreler ile gerçekleşmektedir. Her iki kemikleşme sürecinde de ilk oluşan kemik; primer kemik doku özelliğindedir.

İntramembranöz Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme; kıkırdak oluşumu olmaksızın mezenkimal kök hücrelerin, osteoblastlara farklılaşması ve ardından, aralarındaki boşlukları kemiğin inorganik bileşenleri ile doldurması ile meydana gelen kemik yapım ve onarım sürecidir. İntramembranöz kemikleşme sonucunda var olan doku trabeküler yapıdadır. Kafatası kemiklerinin büyük çoğunluğu, intramembranöz kemikleşme sonucunda oluşmaktadır.

İntrakartilagenöz Kemikleşme

İntrakartilagenöz kemikleşme; mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaşması ve bu kondrositlerin kıkırdak dokuyu oluşturması ile meydana gelen kemik yapım ve onarım sürecidir. Kıkırdak doku oluşumunun zamanla kemikleşmesi sonucunda yeni kemik oluşumu gerçekleşmektedir. İskelet sistemini oluşturan kemiklerin büyük çoğunluğu, intrakartilagenöz kemikleşme sonucunda oluşmaktadır. İntrakartilagenöz kemikleşme; endokondral kemikleşme ve perikondral kemikleşme olmak üzere iki alt başlıkta incelenmektedir.

1.1.4. Elektromanyetik Alan

Manyetik alan; göz ile görülemeyen, kuzey ve güney olmak üzere iki kutbu bulunan ve bu iki kutup arasında birbirlerini tamamlayan çizgilerle gösterilen, atomların yörüngelerinde bulunan elektronların hareketi ile oluşan görünmez bir akış olarak tanımlanmaktadır.

Milattan önce 800'lü yıllarda manyetik demir parçalarının çekim özelliği farkedilmiştir. Manyetik alan tedavisinin eski Yunan ve Çin tıbbına dayandığı düşünülmekle birlikte, veriler ile desteklenen ilk kullanımı, İsviçreli hekim ve düşünür olan Paracelcius tarafından 1500'lü yıllarda gerçekleştirilmiştir. Paracelcius manyetik alan tedavisinin; vücut fonksiyonlarını düzenleyebileceğini, yara iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceğini ve epilepsi, diare, hemoraji gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini ileri sürmüştür (Kirsch ve Smith, 2004).

Farklı hastalıkların tedavisi için manyetizma ve mıknatısların kullanımı manyetik alan tedavisi teriminin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Manyetik alan tedavisi; Orta çağda farklı birçok rahatsızlık için kullanılmıştır. Bu rahatsızlıklar içinde başlıcaları zehirlenmeler, artritler, alopesi ve gut hastalığıdır. İkinci Dünya Savaşı sonrasında Japonlar tarafından manyetik alan tedavisi klinikte kullanılmaya başlanmış ve sonrasında hızla Avrupa'ya yayılmıştır (Ramey ve ark., 1998, Markov ve ark., 2007). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, kaynamayan kırıkların iyileştirilmesinde düşük frekanslı akım tedavisinin kullanılabilirliği onaylanmış (Bassett ve ark., 1974, Bassett ve ark., 1977), ardından geçen 10 yıl içinde de yumuşak doku hasarlarında manyetik alan tedavilerinin kullanılabilirliği kabul edilmiştir (Markov ve ark., 2007). 1970'lerde Albert Roy Davis; pozitif-negatif yüklerin canlılar üzerindeki etkilerini araştırmış ve manyetik alan tedavisinin hayvanlarda kanser, kısırlık, glokom gibi farklı hastalıkları tedavi edebildiğini savunmuştur.

İletkenlerden elektrik akımının geçmesi ile manyetik alan oluşur ve elektromanyetizma olarak tanımlanır. Elektromanyetizma terimi ilk olarak ünlü İngiliz fizikçi Michael Faraday tarafından 1800'lerde kullanılmıştır (Markov ve ark., 2007, Beyazova ve Kutsal, 2016). Oluşan bu manyetik alan, iletkenin şekline göre değişkenlik göstermektedir. Düz bir iletkenin oluşturduğu manyetik alan iletkenin

çevresinde dairesel olarak sıralanırken, bobin halindeki iletkenin oluşturduğu manyetik alan sarmalın dış halkalarına dikey olarak sıralanır ve selenoidin içinde kuvvetli, dışında ise zayıf manyetik alan oluşturur (Markov ve ark., 2007).

A) Manyetik Alan Tedavisinin Türleri

Manyetik alan tedavileri; oluşum ve uygulama şekline göre barındırdığı değişimlere göre altı farklı başlık altında incelenmektedir. Farklı manyetik alan türleri; statik manyetik alanlar, düşük frekanslı sinüs dalga elektromanyetik alanları, pulse (darbeli) elektromanyetik alanlar (PEMF), pulse radyofrekans alanlar (PRF), transkranyal manyetik stimülasyon ve milimetrik dalgalar olarak sınıflandırılmaktadır.

Çizelge 1.1. Manyetik alan türleri ve özellikleri

Manyetik Alan Türü	Manyetik Alan Özelliği
Statik Manyetik Alanlar	Bobin boyunca direkt akım geçişi ile oluşan manyetik alanlardır.
Düşük Frekanslı Sinüs Dalga Elektromanyetik Alanları	Farklı bölgelerde farklı frekans aralığında uygulanan manyetik alanlardır. A.B.D. ve Kanada'da 60 Hz, Avrupa ve Asya'da 50 Hz frekans aralığı kullanılmaktadır.
Pulse Elektromanyetik Alanlar (PEMF)	Uygulamaya uygun özel iletim şekli ve amplitüdü olan, düşük frekanslı manyetik alanlardır.
Pulse Radyofrekans Alanlar (PRF)	Uygulamaya spesifik olarak; 13,56 MHz, 27,12 MHz ve 40,68 MHz radyofrekans aralığında kullanılan manyetik alanlardır.
Transkranyal Manyetik Stimülasyon	Uygulama için belirlenmiş beynin spesifik bölgelerine, kısa ve yoğun manyetik pulslar içeren tedavi yöntemidir.

Milimetrik Dalgalar	30-100 GHz aralığında uygulanan, oldukça yüksek bir frekansa sahip olan tedavi yöntemidir.
----------------------------	--

Manyetik akış dansitesi veya manyetik alanın amplitüdü, ‘Gauss’, ‘Tesla Ünitesi’ veya ‘amper’ ile ifade edilmektedir ve bir Tesla 10.000 Gauss’a denktir. Manyetik alanın gücü, manyetik akım yoğunlu ile belirlenir ve elektromanyetik enerjinin hızı ışık hızına denktir. Manyetik ürünlerin gücünü belirtmek için genellikle ‘Gauss’ terimi kullanılır ve manyetik ürünler bu birim üzerinden karşılaştırılmaktadır (Berman ve Straus, 2004).

Manyetik alan tedavilerinde kullanılan cihazların gücü, kullanım amacına ve cihazın türüne göre 500 Gauss ile 3000 Gauss arasında değişkenlik göstermektedir. Manyetik alan ile ilgili bir diğer terim de polaritedir. Polarite devinen manyetik enerji sirkülasyon yönüdür. Tüm magnetler kuzey ve güney olmak üzere iki kutba sahiptir ve bu kutuplar sahip oldukları farklı özellikler ile, hücreler üzerinde farklı spesifik etkiler oluşturmaktadır. Magnetlerin sahip olduğu negatif polariteli kuzey kutbu saat yönünün aksine olup, hücreler üzerinde oksijenizasyonu arttırırken; pozitif polariteli güney kutbu ise saat yönünde olup, hücrelerde dolaşımı arttırmaktadır. Frekans; enerji deviniminin hızını ya da puls tekrarının sayısını ifade etmektedir. Manyetik alanlar; 0-1022 Hz gibi geniş bir frekans aralığına sahiptir ve sadece 3 Hz ile 3 kHz frekans aralığında oldukça düşük frekans (Extremely Low Frequency; ELF) aralığı oluşmaktadır ve alçak frekanslı manyetik alan tedavilerinin bu aralıkta olması istenmektedir. Düşük frekans aralığının tercih edilmesinin sebebi ise frekans değeri yükseldikçe ortaya çıkacak olan ısıdır. Isının artması; manyetik alan etkisinin önüne geçerek tedavide beklenen etkinin oluşmasını engelleyecektir, bu nedenle rutin uygulamalarda genellikle 100 Hz’in altındaki frekanslar kullanılmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Demineralizasyon aşamalarında	<ul style="list-style-type: none">-Hidroklorik asit (HCl) (Sigma, St. Louis, MO, ABD)-Kloroform (Sigma, St. Louis, MO, ABD)-Metanol (Sigma, St. Louis, MO, ABD)-Mekanik karıştırıcı (IKA marka, HW16 model, Staufen, Almanya)
Deselülerizasyon aşamalarında	<ul style="list-style-type: none">-Tripsin (Sigma, St. Louis, MO, ABD)-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma, St. Louis, MO, ABD)-Penisilin-streptomisin (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail)-Manyetik karıştırıcı (IKA, C MAG HS7, Staufen, Almanya)
3B substratların hazırlanması ve jelleştirme süreçlerinde	<ul style="list-style-type: none">-Pepsin (Sigma, St. Louis, MO, ABD)-Hidroklorik asit (HCl) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD)-Hidroksiapatit mikropartikülleri (Plasma Biotal, Buxton, Birleşik Krallık).
Hidrojellerin hazırlanmasında	<ul style="list-style-type: none">-Liyofilizatör (Christ, Alpha 1-4LD plus, Osterode am Harz, Almanya)
Numunenin sterilizasyonu ve hücre ekiminde	<ul style="list-style-type: none">-Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, ABD)-DMEM F:12 (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail)-Fetal sığır serumu (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail)

	<p>-Penisilin-streptomisin (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail)</p> <p>-L-Glutamin (Lonza, Basel, İsviçre)</p> <p>-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-Santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-15R model, CA, ABD)</p> <p>-T75 hücre kültür kapları (Corning, New York, NY, ABD)</p> <p>-24 Kuyucuklu kültür kapları (Corning, New York, NY, ABD)</p> <p>-96 Kuyucuklu kültür kapları (Corning, New York, NY, ABD)</p> <p>-Otomatik pipet (Gilson, Middleton, ABD)</p> <p>-Karbondiyoksitli İnkübatör (Thermo Scientific, Heracell 150i, MA, ABD)</p>
Hücrelerin gelişiminde	<p>-DMEM F:12 besiyeri (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail)</p> <p>-Fetal sığır serumu (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail)</p> <p>-Penisilin-streptomisin (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail)</p> <p>-L-Glutamin (Lonza, Basel, İsviçre)</p> <p>-Tripsin (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-Santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-15R model, CA, ABD)</p> <p>-T75 hücre kültür kapları (Corning, New York, ABD)</p> <p>-Otomatik pipet (Gilson, Middleton, ABD)</p>

	<p>-Karbondiyoksitli İnkübatör (Thermo Scientific, Heracell 150i, MA, ABD)</p> <p>-DMEM besiyeri (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail)</p> <p>-Askorbik asit (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-β-gliserofosfat (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-Deksametazon (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-3-İzobütül-1-metilksantin (IBMX) (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-Azasitidin (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-İnsülin (Sigma, St. Louis, MO, ABD)</p> <p>-İndometazin (Fluka, Buchs, İsviçre)</p> <p>-FCM cihazı (Beckman Coulter Navios, CA, ABD)</p>
EMA maruziyetinde	<p>-Puls üretici (Rigol marka, DG1022 model, Beaverton, OR, ABD)</p> <p>-Amplifikatör (Accel, TS250, Irvine, CA, ABD)</p> <p>-Helmholtz bobini (Lake Shore, MH-12, Westerville, OH, ABD)</p>
EV izolasyonunda	<p>-Total eksozom izolasyon kiti (İnvitrogen, CA, ABD)</p> <p>-Santrifüj (Hettich Universal 32R, Vestfalya, Almanya)</p>
Enzim bağımlı immünosorbent analizinde (CD9/CD63)	<p>-CD9/CD63 ELISA kiti (CosmoBio, ABD)</p> <p>-Spektrofotometre (Molecular Devices SpectraMax M5, CA, ABD)</p>
EV boyutu ve zeta potansiyelinin belirlenmesinde	<p>-Zetasizer cihazı (Malvern Panalytical, Malvern, Birleşik Krallık)</p>

Protein içeriğinin belirlenmesinde	-QuantiPro™ BCA tayin kiti (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD)
Analizlerde, ekstraksiyonlarda	-NaCl (Sigma, St. Louis, MO, ABD) -Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma, St. Louis, MO, ABD) -Pepsin (Sigma, St. Louis, MO, ABD) -Asetik asit (Merck, Darmstadt, Almanya) -Sodyum asetat (Sigma, St. Louis, MO, ABD) -Disodyum tuzu (Sigma, St. Louis, MO, ABD) -HCl (Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Kolorimetrik tayinde	-Spektrofotometre (Molecular Devices SpectraMax M5 cihaz, CA, ABD)
Biyokompozit karakterizasyonunda FT-IR analizi	-FT-IR cihazı (Shimadzu IRAffinity model, Kyoto, Japonya)
Biyokompozit karakterizasyonunda SEM analizi	-Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss EVO 40 model cihaz, Jena, Almanya) -Numune kaplama cihazı (EMITECH K550X model, İngiltere)

2.2 Yöntem

2.2.1. Biyokompozit Substrat Yüzey Çalışmaları

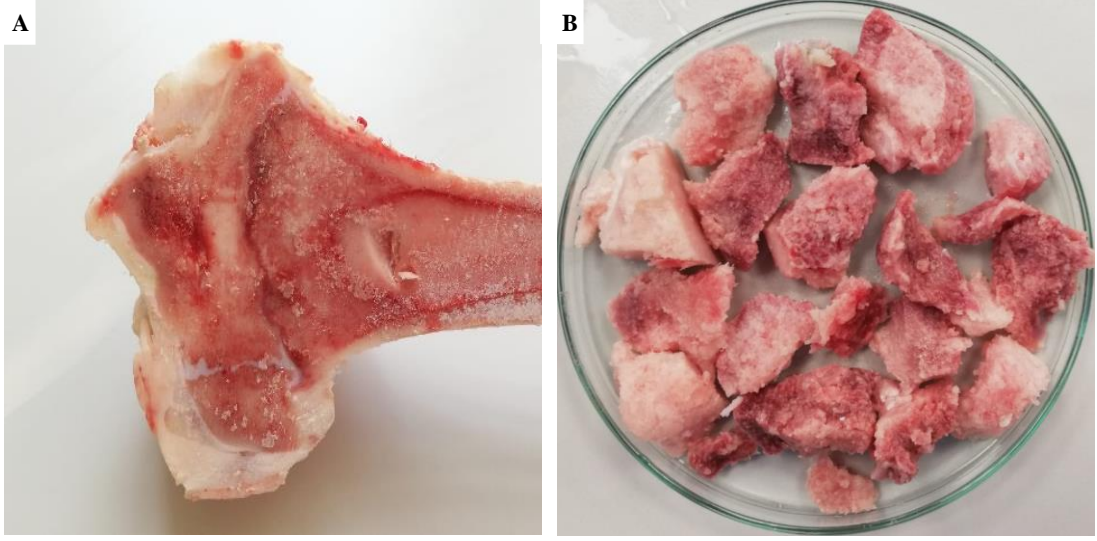
A) Kemik Hücre Dışı Matriksi (HDM) Eldesi

Tez çalışmasında kullanılmak üzere, yerel kasapta kesimi yapılan sağlıklı sığırlardan elde edilen femur kemikleri, kesimi takip eden 12 saat içerisinde, PBS içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara getirildi. Salin solüsyonu ile seri yıkama yapılarak farklı doku kalıntıları uzaklaştırıldı. Temin edilen sığır femur kemiği boylamasına iki parçaya ayrıldı (Şekil 2.1), kemiğin uç kısımlarında bulunan süngerimsi doku keski kullanılarak parçalar halinde çıkarıldı ve HDM elde etmek için işlemlere başlandı.



Şekil 2.1. Sığır femur kemiği

Kemik hücre dışı matriksi (HDM) elde etmek için sığır femur kemiğinden toplanan süngerimsi kemik doku (Şekil 2.2) sırasıyla *demineralizasyon* ve *deselülerizasyon* işlemlerine tâbi tutuldu.



Şekil 2.2. A) Dokuda süngerimsi kemik, B) Dokudan çıkarılmış süngerimsi kemik

Demineralizasyon işlemi için toplanan süngerimsi dokuya uygulanan işlemler;

1 gram doku için 25 ml solüsyon olacak şekilde 0,5 N HCl içinde 24 saat mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı (Şekil 2.3). 24 saatin sonunda distile su ile seri yıkama yapılarak asit dokudan uzaklaştırıldı. Hazırlanan numune, kemik doku ve çevresinde bulunan yağ dokudan arındırılmak amacıyla; kloroform: metanol (1:1, v: v) ile 1 saat muamele edildi, ardından önce metanol sonra distile su ile seri yıkama

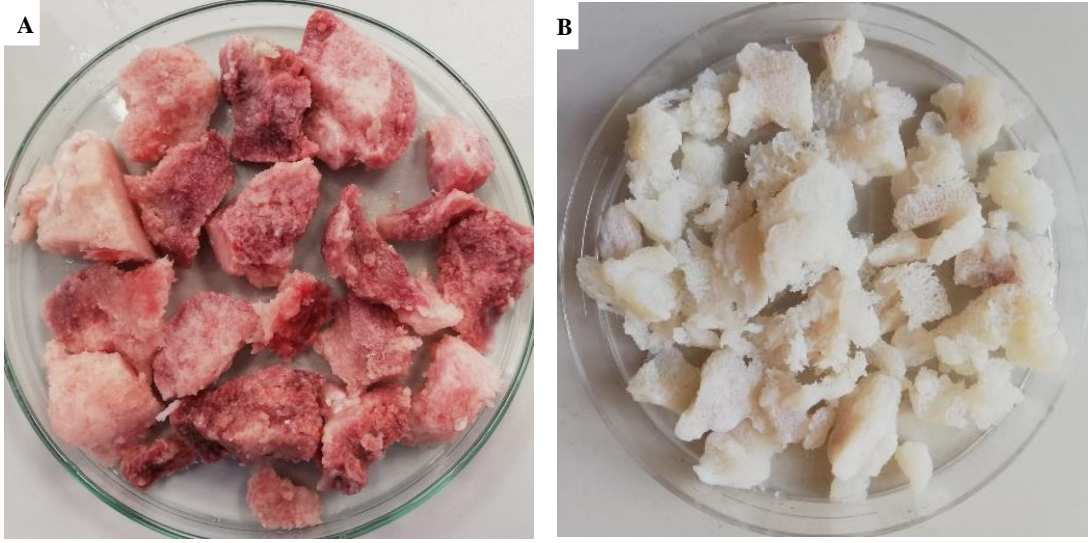
yapıldı. Elde edilen demineralize kemik dokusu liyofilize edilmek için donduruldu (-86°C) ve akabinde 24 saat liyofilizasyon yapıldı.



Şekil 2.3. Süngerimsi kemiğin HCl ile muamele edilmesi

Deselülerizasyon işlemi için demineralize kemik dokusuna uygulanan işlemler;

Demineralize ve liyofilize edilen kemik dokusu, 1L PBS tamponu içinde %0,05 tripsin ve %0,02 EDTA ile hazırlanan çözelti ile 37°C sıcaklığa ayarlı etüvde 24 saat muamele edildi. Ardından, manyetik karıştırıcı kullanılarak; +4°C'de, %1 penisilin/streptomisin içeren PBS ile 24 saat karıştırıldı. Hazırlanan numune süzülerek donduruldu (-86°C). Dondurulan malzeme 24 saat süre ile liyofilize edildi, işlem sonucunda kemik HDM elde edildi.



Şekil 2.4. A) Deselüerizasyon öncesi süngerimsi kemik doku, B) Deselüerizasyon sonrası kemik HDM

B) Biyokompozit Substrat Yüzeylerin Hazırlanması

Biyokompozit substrat yüzey gruplarının oluşturulması için kemik HDM kullanılarak jel hazırlandı. Jelin hazırlanması için deselüerize edilen kemik dokusu kullanıldı. 250 mg deselüerize kemik 25 ml içinde 25 mg pepsin içeren HCl çözeltisi ile sindirildi. Pepsinin aktivite gösterebilmesi için 0,01 N HCl eklendi, deselüerize kemik tamamen sindirilene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve ardından nötralizasyon basamağına geçildi. Asidik pH değer aralığında (pH: 2,5-3,5) olan çözelti; 0,1 N NaOH ile vücut fizyolojisine uygun olan (pH: 7,4) pH değerine gelecek şekilde nötralize edildi ve %10 oranında 10X PBS eklendi. Elde edilen jel ile farklı biyokompozit substrat yüzeyler oluşturmak için hidroksiapatit kullanıldı. Farklı oranlarda katılan hidroksiapatit (BH50 ve BH100) ile gruplar oluşturuldu. BH50 için hazırladığımız jelden 20 ml ve %50 (w: w) oranında hidroksiapatit, BH100 için yine 20 ml jel ve %100 (w: w) oranında hidroksiapatit +4°C’de manyetik karıştırıcı ile 1 gece karıştırıldı ve çözünme işlemi tamamlanınca UV-ışık kaynağı (254 nm) kullanılarak sterilizasyon yapıldı. Hazırlanan farklı grup jeller ile (B, BH50 ve BH100) steril koşullarda hücre kültür kaplarının tabanları kaplanarak substrat yüzeyleri oluşturuldu (Şekil 2.5). Bu işlem jelin akışkanlığını korumak için buz üzerinde gerçekleştirildi. Steril olan kültür kaplarının hücre tohumlama işlemine uygun hale gelmesi için zemininde bulunan jelin 37°C katılması sağlandı. Bu işlem

karbondioksit inkübatöründe gerçekleştirildi. Her T75 hücre kültür kabı için yaklaşık 5 ml jel kullanıldı. B, BH50 ve BH100 olmak üzere gruplar oluşturularak hücre tohumlamaya hazır steril biyoaktif yüzeyler elde edildi.



Şekil 2.5. Farklı grup jeller ile (B, BH50 ve BH100) steril koşullarda hücre kültür kaplarının tabanlarının kaplanması

C) Kemik HDM Kaynaklı Biyokompozit Jellerin Karakterizasyonu

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizleri

Kemik doku temelli biyokompozit substrat numuneleri B, BH50 ve BH100'nin yüzey morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskopisi kullanıldı. Numune hazırlama sürecinde, elde ettiğimiz farklı grup jeller (B, BH50, BH100), UV-ışını altında sterilize edildikten sonra 24 kuyucuklu kültür kaplarına döküldü. 37°C sıcaklıktaki ortamda tutularak yapıların sertleşmesi sağlandı ve ardından gluteraldehit (%2,5) ile tespit edildi. Örnekler, dehidrasyon amacı ile etil alkol serilerinden geçirilerek havada kurutulduktan sonra iletken karbon bant kaplanmış stublar üzerine yerleştirildi. Hazırlanan numuneler görüntülenmek üzere Emitech marka K550X model cihaz ile, yaklaşık 10 nm kalınlığında altın ile kaplandı ve Zeiss marka EVO 40 model taramalı elektron mikroskobu ile analizler gerçekleştirildi.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrofotometrisi Analizi

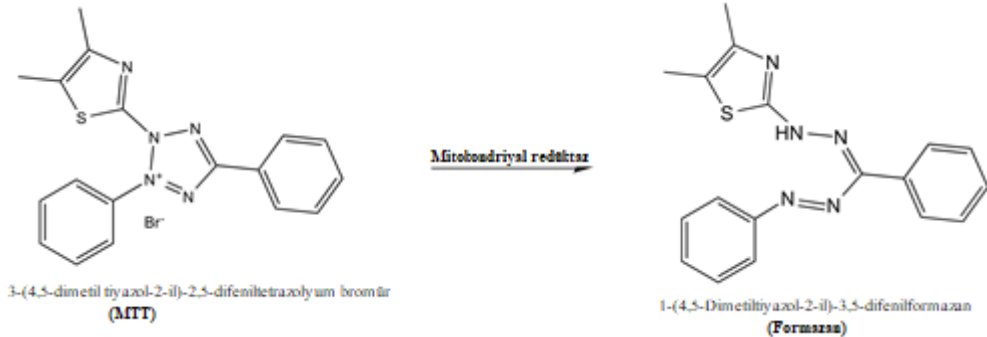
Hazırlanan B, BH50 ve BH100 numunelerinin fonksiyonel grupları ve kimyasal bağ bilgileri Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrofotometresi cihazı ile analiz edildi. FT-IR analizi Shimadzu marka IRAffinity model FT-IR cihazı ile orta kızılötesi bölgede 600 ile 4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında zayıflatılmış toplam yansıma (attenuated total reflection, ATR) ünitesi ile gerçekleştirildi.

Sitotoksosite Analizi

Jel formunda hazırlanmış olan biyokompozit numunelerin (B, BH50, BH100), TS EN ISO 10993-5 (Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi-Bölüm 5: Vücut Dışı Sitotoksosite Deneyleri) standardına uygun olarak *in vitro* toksisite özellikleri incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak fenol çözeltisi kullanılırken, negatif kontrol olarak sadece taze besiyeri kullanıldı ve analizler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Numuneler test öncesi 1 saat süre ile UV ışın maruziyetinde steril edildi. Sitotoksisitelerinin belirlenmesi amacıyla, 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına yerleştirilen numuneler üzerine besiyeri eklenerek, inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) 24 saat inkübe edildi. Aynı zamanda oluşturulan gruplar için, 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına insan kaynaklı adipoz mezenkimal kök hücreleri kuyucukların tabanını kaplayacak şekilde tohumlandı ve inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) 24 saat kültüre edildi. İnkübasyondan sonra hücrelerin besiyeri, numunelerden toplanan biyomalzeme özütleri ile değiştirildi ve hücreler inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) 48 saat süre ile inkübe edildi. 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından, hücre canlılığının kantitatif olarak belirlenmesi amacı ile mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi, 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi kullanıldı. Bu işlem için, hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen besiyeri ile yıkandıktan sonra 50 μL MTT reaktifi ve 450 μL serum içermeyen besiyeri ile 4 saat süresince inkübatörde (37°C ve %5 CO₂) inkübe edildi. İnkübasyon süresince, Şekil 2.6'da gösterildiği şekilde sarı renkli tetrazolyum tuzu (MTT) canlı hücrelerin mitokondriyal

dehidrogenaz aktivitesine bağı olarak mor renkli formazan bileşiğine yükseltgendi ve reaksiyon dengeye ulaştı. Hücre bütünlüğünü bozarak oluşan formazan kristallerini açığa çıkarmak amacıyla kuyucuklara 500 µL MTT çözeltisi (izopropanol içerisinde 0,1 NHCl çözeltisi) eklendi. Karanlık ortamda formazan kristallerinin çözünmesinden sonra çözelti toplandı ve Molecular Devices marka, SpectraMax M5 model mikrolpaka okuyucu ile 570 nm dalga boyunda çözeltilerin absorpsanları ölçüldü, belirlenen kör değerine karşı hücre canlılık oranları belirtilen formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = ((\text{Örnek Abs.}) / (\text{Negatif Kontrol Abs})) \times 100$$



Şekil 2.6. Tetrazolyum tuzunun (MTT) formazan bileşiğine yükseltgenmesi

Alamar Blue™ Testi ile Hücre Canlılığı ve Hücre Çoğalmasının Tespiti

Oluşturulan biyokompozit substratlar üzerine tohumlanan hücrelerin canlılık ve çoğalma durumları, 0, 1, 3 ve 7. günlerde Alamar Blue™ testi yardımıyla takip edilmiştir. Alamar Blue™, resazurin (mavi renkli floresan olmayan bir bileşik) ve bir redoks indikatörü içermektedir. Canlı hücrelerin NADH, NADPH ve FADH₂ gibi metabolik molekülleri olan yapılar indirgenerek resazurinin resorufine dönüşümünü sağlar. Resorufin floresan ışığa yapan bir molekül olup pembe-kırmızı renktedir. Spektrofotometre yardımıyla ölçülebilen floresan yoğunluğu hücre canlılığı ve çoğalması ile ilişkilendirilebilir.

Belirtilen zaman noktalarında Alamar Blue™ testi için 24 kuyucuklu kültür kaplarındaki numuneler (B, BH50, BH100, 3 tekrarlı), steril yeni 24 kuyucuklu kültür

kaplarına aktarıldı. Aktarılan numunenin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve kalıntı serumu uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkama yapıldı. Alamar Blue™ boyası serumsuz besiyeri içerisinde 1/10 olacak şekilde çözelti halinde hazırlandı. PBS ile yıkanmış numunelerin üzerine 1 ml Alamar Blue™ serumsuz besiyeri çözeltisi eklendi ve 4 saat süresince 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem ortamında reaksiyonun dengeye gelmesi için inkübe edildi. Dört saatlik sürenin ardından çözeltinin üst fazı 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı ve floresan (eksitasyon: 560 nm, emisyon: 590 nm) yoğunluğu değerleri mikro plaka lüminesans okuyucu ile tespit edildi. Pozitif kontrolden elde edilen floresan değeri oranı ile çalışma normalize edildi.

2.2.2. Hücre Çalışmaları

A) İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kullanıma Hazırlanması

Bu tez çalışmasında, American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)'dan temin edilen ATCC hücre hatları kullanılmıştır. Uygun şartlarda dondurularak (%10 DMSO) muhafaza edilmiş durumdaki AMKH'leri, standart yöntemler takip edilerek çözülmüş ve kültüre alınmıştır (Zuk ve ark., 2002).

Çözme yöntemi; donmuş hücreler, 37°C'deki su banyosu içinde çözüldükten sonra içerisinde serumlu vasat bulunan tüplere alınarak 1500 devir/dakika (rpm)'da 7 dakika (dk) süre ile santrifüjleme yapıldı. İşlem sonrası supernatan uzaklaştırılarak kalan pellet (hücrelerin) üzerine tam vasat besiyeri ilave edildi.

Kültür etme yöntemi; Süspansiyon edilen hücreler T75 kültür kaplarına aktararak kültürlendi. Hücreler her 3 günde tam vasat ile (Tam vasat: DMEM F:12 içine %10 FBS, %1 penisilin- streptomisin, %1 L-Glutamin ilave edilerek tam vasat hazırlanır.) değiştirilerek, %5 CO₂, %90 nem içeren CO₂'li inkübatörde tutularak gelişimi gözlemlendi. Adipoz Mezenkimal kök hücreler %80-90 kadar bolluğa ulaştığında tripsinleme işlemine geçildi.

Tripsinleme işlemi; Konfluent olan (%80-90 hücre yoğunluğuna ulaşan) hücreler, serum varlığında tripsinin inhibe olmaması için önce ile PBS yıkandı ve daha sonra Tripsin/EDTA çözeltisi (%0,05 Tripsin-0,53 mM EDTA) ilave edilerek

hücrelerin durumuna göre 5-10 dk arasında inkübatörde tutuldu. İnvirt mikroskopta hücreler incelenerek kültür kabının yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrılmasından sonra, hücre süspansiyonunun içine Tripsin/EDTA aktifliğini durdurmak için serum ilave edildi. Serum ilaveli hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 15 dk süre ile santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine tam vasat eklendi ve pipetleme yapılarak hücreler süspansiyona edildi. CO₂'li inkübatöre alınarak, yeniden çoğalmaları sağlandı. Gelişen çeşitli pasajlardaki hücreler karıştırılarak deney gruplarında kullanıldı.

Hazırlanan karma hücre süspansiyonları ile mezenkimal kök hücre karakterizasyonu (invert mikroskop görüntüleme, hücrelerin farklılaştırılması, CFU-f oluşturma, immüfenotiplendirme) çalışmaları, AMKH'lerin farklı substrat yüzeylere tohumlanması ve bu yüzeyler ile uyumu kapsamındaki çalışmalar ile EV izolasyonu ve karakterizasyonu kapsamındaki çalışmalara başlandı.

B) İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları; 2006 yılında, Dominici ve arkadaşlarının Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT)'nin Mezenkimal Kök Hücreleri tanımlamak için kullandığı kriterlere göre gerçekleştirildi.

İnvirt Mikroskop İncelemeleri

Karma hücre kültürünün İnvirt Mikroskoptaki görüntüleri incelenerek, AMKH tanımına uygunlukları morfolojik olarak değerlendirildi.

İnsan AMK Hücrelerinin Farklılaşma Çalışması

İnsan yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin, çeşitli farklılaştırma koşulları altında üçlü soya dönüşme (kemik, yağ ve kardiyak benzeri hücrelere) durumunun incelenmesi için hücreler kültürlendi. Adipoz mezenkimal kök hücreleri istenilen hücre yoğunluğuna (%80-90) eriştikten sonra tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilerek, yapışan hücreler kültür kabından kaldırıldı. Bu işlemde, üç hücre

hattına ait hücrelerin karma pasajlarından (P6-P10) havuz oluşturuldu. Karma havuz MKH'leri 8'li hücre kültür kabına uygun hücre yoğunluğunda (10×10^5 hücre sayısı) ekilerek, hücre yapışmasının iyi bir şekilde sağlanması için 24 saat beklendi. Ekilen hücrelerin **osteojenik farklılaşma için** (düşük glikoz içeren DMEM, besiyeri katkısı olarak 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ askorbik asit; 10 mM β -gliserofosfat; 10^{-8} M deksametazon), **adipojenik farklılaşma için** (yüksek glikoz içeren DMEM, besiyeri katkısı olarak 0,5 mM IBMX; 10^{-7} mM deksametazon; 0,1 U/mL (10 μM) insülin, 0,2 nM indometazin) ve **kardiyojenik farklılaşma için** (5-azasitidin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DMEM ve besiyeri katkısı olarak %10 FBS, %1 P/S, %1 L-G) uygun besiyeri farklılaştırma ortamları kullanıldı.

Farklaştırmış hücreler; histokimya ve immünohistokimya boyamaları için soğuk metanolde tespit edildi. Boyama işlemlerine kadar 4°C 'de saklandı.

Osteojenik farklılaşmayı göstermek ve farklılaşma sonucu hücrelerde biriken kalsiyumu belirlemek için, Alizarin kırmızısı S (AR-S) boyaması yapıldı. AR-S boyaması için daha önce tespit edilmiş olan hücre preparatları, 2 g AR-S boyası ve 100 ml distile su ile hazırlanan AR-S (pH: 4,2) çözeltisi ile 15 dk inkübe edildi ve distile su ile uygulanan boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Bu işlem 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Boyanan kuyucuklarda (2'li tekrarlı) hücrelerde bulunan kalsiyumun kırmızı-turuncu renkte görülmesi beklendi. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile görüntülendi, farklılaşmış hücreler ve mineral odakları değerlendirilerek fotoğraflandı.

Osteojenik farklılaşmayı göstermek ve farklılaşma sonucunda oluşan, depo kalsiyum tuzlarını görüntülemek için Von Kossa boyaması yapıldı. Von Kossa boyaması için daha önce tespit edilmiş bulunan hücre preparatları, karanlık ortamda 20 dk %5'lik AgNO_3 (gümüş nitrat) ile muamele edildi, distile su ile yıkama yapıldı ve ardından 2 dk süre ile 5 gram Na_2CO_3 , 75 ml distile su ve 25 ml formalin ile hazırlanan çözelti uygulandı. Bu süre sonunda çözelti uzaklaştırılarak örnekler distile su ile yıkandı. Hücreler, %5 sodyum tiyosülfat ile 2 dk, sonrasında hematoksilen çekirdek boyası ile 2-3 dk muamele edildi. Boyanan kuyucuklarda (2'li tekrarlı) kalsiyum tuzlarının siyah/kahverengi-siyah, çekirdeğin kırmızı, sitoplazmanın ise pembe renkte görülmesi beklendi. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile görüntülendi, farklılaşmış hücreler ve kalsiyum tuzları değerlendirilerek fotoğraflandı.

Adipojenik farklılaşmayı göstermek için Sudan siyahı boyaması yapıldı. Daha önce tespit edilmiş hücre preparatları, 3-5 dk süre boya öncesi solüsyonu ile muamale edildi. Önceden ısıtılmış Sudan siyahı B boyası uygulandı ve 8-10 dk 60°C’ de bekletildi ve ardından 3-5 dk farklılaşma solüsyonu ile muamele edilerek distile su ile yıkandı. Beş dakika nükleer fast solüsyonu ile boyandıktan sonra 2 dk akan musluk suyunda yıkandı ve ardından distile su ile tekrar yıkandı. Boyanan kuyucuklarda çekirdeğin kırmızı, lipitlerin ise mavi- siyah renkte görülmesi beklendi. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile görüntülendi, farklılaşmış hücreler ve lipitler değerlendirilerek fotoğraflandı.

Kardiyojenik farklılaşmayı göstermek için daha önce tespit edilmiş hücre preparatları hematoksilin/eozin ile boyandı. Preparatlar 5 dk sürelerde etanol serilerlerinden geçirildikten sonra distile su ile yıkandı ve Mayer Hematoksilin solüsyonu ile 10 dk süre ile boyandı. Distile su ile yıkanarak solüsyon uzaklaştırıldı ve % 95 alkol ile muamele edildi. Distile su ile 5 dk yıkanarak Eozin Y solüsyonu ile 1 dk zıt boyama yapıldı. İki tekrarlı olacak şekilde 5 dk %95 alkol ile muamele edildi ve havada kurutuldu. Boyanan kuyucuklarda (2’li tekrarlı) çekirdeğin koyu mavi/ menekşe renkte, sitoplazmanın ise pembe/kırmızı renkte görülmesi beklendi. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile görüntülenerek farklılaşmış hücreler değerlendirilerek fotoğraflandı.

Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerin CFU-f Oluşturması

Hazırlanan karışık pasajlardaki hücreler ile CFU-f oluşturma potansiyeli incelendi. AMKH için karakteristik bir özellik olan koloni oluşturma potansiyelinin incelenmesi için hücrelerin yoğunluğu %80-90 düzeyine ulaştığında tripsin işlemi yapıldı. Tripsin işlemi ile süspansiyon haline gelen hücreler 6’ lı kültür kuyucuklarına 100, 1000 ve 10000 hücre/cm² yoğunlukta olacak şekilde 3 tekrarlı olarak ekildi. AMK hücreleri uygun koşullarda 14 gün boyunca tam vasat ile kültüre edildi ve boyama işlemi için besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı, PBS ile yıkanarak ortamdaki kalıntılar giderildi. Kuyucuklardaki hücreler soğuk metanol ile 5 dk tespit edildi. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan hücreler etanol ile hazırlanan %0,5 kristal viyole boyası (%95 etil alkolde hazırlanan) ile 30 dk oda sıcaklığında (25°C) boyandı, kristal viyole

boyasının ortamdaki uzaklaştırılması için PBS ile yıkandı ve havada kurumaya bırakıldı. Oluşan hücre kolonileri inversiyon mikroskobu ile incelendi ve farklı yoğunluktaki örneklerin birim alan başına koloni sayılarının belirlenmesi için görüntüler alındı. Makroskopik olarak incelenen kuyucuklarda tanımlanan CFU-f kolonileri sayıldı. Ortalama CFU-f frekansı aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{CFU-f Frekansı} = (\text{Koloni Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı}) \times 100$$

AMK Hücrelerinin İmmünotiplendirme Çalışmaları

AMKH'lerin immünotiplendirme çalışmaları için akan hücre ölçer tekniği kullanıldı. Kullanılan karma pasajlardaki hücreler tripsin işlemi kullanılarak hücre kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı. Hücreler 5 ml'de 1×10^6 sayısında olacak şekilde süspansiyon haline getirilerek, farklı floresan işaretleyicilere bağlı CD29, CD73, CD133, HLA-DR, CD90, CD105, CD34, lin ve CD31 yüzey antikoları ile muamele edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin bulunduğu tüpler FCS-PBS ile yıkandı. Santrifüj sonrasında oluşan örnek supernatanları uzaklaştırıldı. Tüpler içinde kalan pelletlerin üzerlerine FCS-PBS ilave edilerek örnekler okuma yapmak üzere cihaza yerleştirildi. Beckman Coulter Navios marka, üç lazerli on renk dedektörü bulunan FCM cihazında her örnekten veri toplanarak (önceden belirlenmiş sabit ayarlarda) kaydedildi. Veriler Kaluza programı kullanılarak analiz edildi.

Çizelge 2.1. Mezenkimal kök hücreler için immünotiplendirme tablosu

Pozitif	Negatif
CD73, CD90, CD105	C-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79, (HLA)-DR

2.2.3. Elektromanyetik Alan Çalışmaları

A) Düşük Frekanslı - Darbeli Elektromanyetik Alan Maruziyeti Oluşturulması

Biyokompozit susbstrat yüzeylere tohumlanan hücrelerde düşük frekanslı - darbeli elektromanyetik alan maruziyeti oluşturmak için kurulan sistem bir Rigol marka DG1022 model puls üretici, bir Accel marka TS250 model amplifikatör ve Lake Shore marka MH-12 model iki özdeş helmholtz bobininden oluşmaktadır. Düşük frekanslı - darbeli elektromanyetik alan uygulaması, 1,3 mT'lik bir manyetik akı yoğunluğunda ve 15 Hz'de bir patlama frekansı (5 ms-uzun puls patlamaları) olacak şekilde oluşturulmuştur. CO₂'li inkübatör içine yerleştirilen bobinler ile biyokompozit substrat yüzeylere tohumlanmış hücreler düşük frekanslı - darbeli elektromanyetik alan maruziyeti ile deney süresince kültüre edilmiştir.



Şekil 2.7. Düşük frekanslı- darbeli elektromanyetik alan maruziyeti oluşturmak için kurulmuş sistem



Şekil 2.8. İnkübatörde bulunan helmholtz bobinleri arasına hücre kültür kaplarının yerleştirilmesi

2.2.4. Ekstrasellüler Vezikül Çalışmaları

A) Eksozom İzolasyonu

İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerinden 0., 3. ve 7. günlerde eksozom izolasyonu için, Eksozom izolasyon (Total Exosome Isolation from cell culture media-Invitrogen) kiti kullanıldı. Hücre kültürü şartlarında (%5 CO₂, %90 nem içeren CO₂'li inkübatörde) istenilen yoğunluğa (%80-90) ulaşan hücreler, izolasyondan önce 12-16 saat kadar (bir gece) serum içermeyen besiyeri ile inkübe edildi, ertesi gün kültürdeki hücrelerin sekrotomlarını ve metabolik atıklarını içeren besiyeri eksozom izolasyon işlemi için toplandı ve izolasyon kiti üretici talimatları doğrultusunda uygulandı. Protokolde aşağıdaki basamaklar takip edildi. Hücre kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla, besiyeri 2000 x g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve hacminin yarısı kadar toplam eksozom izolasyon reaktif (İnvitrogen) eklendi (1ml besiyeri + 500 µL reaktif). Kültür besiyeri ile eklenen reaktifin homojen şekilde karışması için vorteks ile karıştırma yapıldı (15 sn) ve 12-16 saat (gece) +4 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 10000 x g'de 1 saat süre ile +4 °C'de

santrifüj edildi. Oluşan pellet 1 X PBS ile süspanse edildi ve 1 hafta içinde kullanılacak örnekler 2-8 °C’de, daha sonra kullanılacak örnekler ise -20 °C’de saklandı.

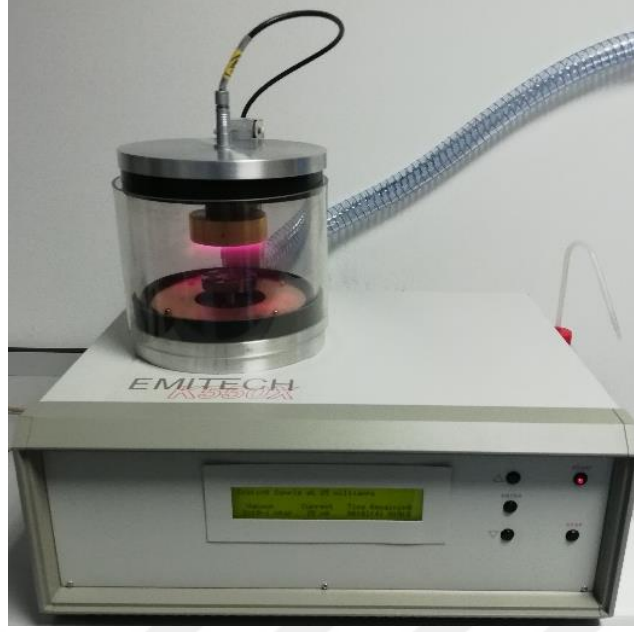
B) Eksozom Karakterizasyonu

Eksozomların Boyut Ölçümü ve Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi

Eksozomların boyut ve zeta potansiyellerinin ölçümü için Zetasizer (Malvern) cihazı kullanıldı. İşlem için örnekler 1/1000 oranında distile su ile seyreltildi, Refractive Index (RI) değeri 1,38 ve absorbans değeri 0,001 olarak alınarak örneklerin partikül büyüklüğü-yoğunluk, zeta potansiyeli (yüzey yükü) ölçümü +4 °C’de, 3 tekrarlı olarak yapıldı. 30-300 nm aralığında olan partiküllerin boyutları değerlendirildi.

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Eksozomların morfolojik özelliklerini ve çaplarını belirlemek için Zeiss marka EVO40 model taramalı elektron mikroskobu kullanıldı. Numune hazırlanması için eksozomlar önce distile su ile yıkandı, daha sonra alkol serilerinden geçirildi. SEM cihazında görüntülemek için stubların (örnek disklerinin) üzeri iletken karbon bantla kaplandı ve önceden hazırlanmış eksozom resüspanسیونundan, yaklaşık 20 µL pipet ucu yardımıyla stub üzerine yayıldı. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılan numuneler, EMITECH marka K550X model cihaz (Şekil 3.9) ile yaklaşık 10 nm kalınlığında altın ile ince bir tabaka halinde kaplanarak taramalı elektron mikroskobu (Şekil 3.10) ile görüntülendi.



Şekil 2.9. Numunelerin altın ile kaplanması



Şekil 2.10. Görüntüleme için kullanılan taramalı elektron mikroskobu

Eksozom Yüzey Belirteçlerinin Analizi (Enzim Bağlı İmmünoSorbent Analizi)

Hazırladığımız numunelerimizde eksozoma bağlı yüzey belirteci olan CD9/CD63 varlığını araştırmak için CD9/CD63 ELISA kiti (CosmoBio- ABD) kullanıldı. Enzim ile işaretli antikor (konjugat) ve substrat kullanılarak, izole edilen eksozomlar da bulunan hedef proteinin varlığı enzim bağlı immünoSorbent analizi (ELISA) ile belirlenmiş oldu. Kullanılan CD9/CD63 ELISA kitinin (CosmoBio, ABD) protokolü üretici firma talimatları doğrultusunda kullanılarak analiz yapıldı. Protokol doğrultusunda bütün reaktiflerin ve 96 kuyucuklu Anti-CD9 antikoru bulunan faz plakasının oda sıcaklığına gelmeleri beklendi. Standart protein çözeltisi seri dilüsyon ile hazırlandı. Dilüe edilen standart protein çözeltisinden her kuyucuk için 100 µL kuyucuklara aktarıldı ve hazırlanan numune solüsyonundan her kuyucuk için 100 µL plakaya yerleştirildi. İşlem 3 tekrarlı olarak yapıldı. Plakaya yerleştirilen Standart dilue protein çözeltileri ve numune çözeltileri, çalkalayıcı ile 30 sn 800 rpm'de çalkalandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Kuyucuklarda bulunan solüsyon uzaklaştırıldı ve 3 tekrarlı olarak 300 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş HRP konjüge anti-CD 63 eklendi, plaka çalkalayıcı ile 30 sn süre ile 800 rpm'de çalkalandı ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra solüsyon uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 300 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuk; 100 µL substrat solüsyonu ile 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve sonrasında 50 µL durdurma solüsyonu eklendi. Plakada bulunan her kuyucuğun absorbansı, Molecular Devices marka, SpectraMax M5 model mikropilaka okuyucu ile 450 nm dalga boyunda ölçülerek sonuçlar değerlendirildi.

Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam protein analizi için izole edilmiş ekstrasellüler vezikül süspansiyonundan 50 µL numune 50 µL RIPA lizis tamponu (25 mM Tris-HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl, %1 Triton-X 100, %1 deoksikolik asit, %0,1 SDS ve proteaz inhibitör kokteyli) ile + 4 °C'de 30 dakika muamele edildi. Buz üzerinde 30 saniye sonikasyon yapıldıktan sonra 15 dakika buz üzerinde tutularak ekstraksiyon basamağı tamamlandı. Ardından QuantiPro BCA protein tayin kiti (Sigma-Aldrich, ABD) üretici firma talimatları doğrultusunda analiz gerçekleştirildi. Her grup için

ekstraksiyon sonucunda elde edilen üründen 100 µL numune ile talimatlar doğrultusunda hazırlanan 100 µL QuantiPro çalışma solüsyonu 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına alınarak 2 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra plakada bulunan her kuyucuğun absorbansı, Molecular Devices marka, SpectraMax M5 model mikropilaka okuyucu ile 562 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılarak standarda karşı toplam protein konsantrasyonu tayin edildi.

2.2.5. İstatistiksel Analizler

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ve grafiklerin çizilmesinde GraphPad Prism 7 programı kullanıldı. Çalışmalardaki bulgular tek yönlü ve çift yönlü varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilerek analiz edildi ve gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi için Post-Hoc testinden Tukey testi gerçekleştirildi. Sonuçların anlamlılığı için $p > 0.05$ değeri kabul edildi.

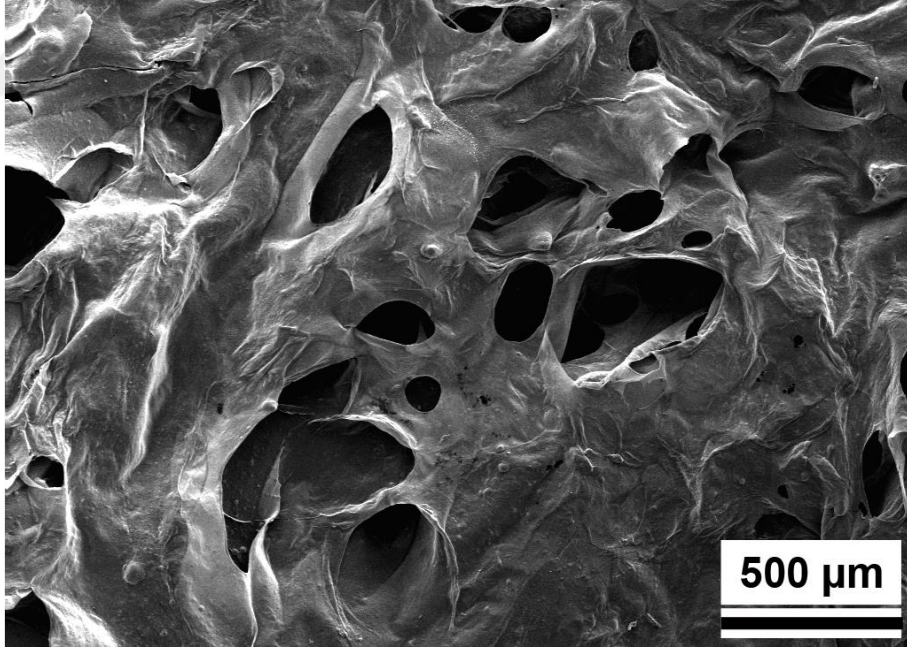
3. BULGULAR

3.1. Biyokompozit Substrat Yüzey Çalışmaları

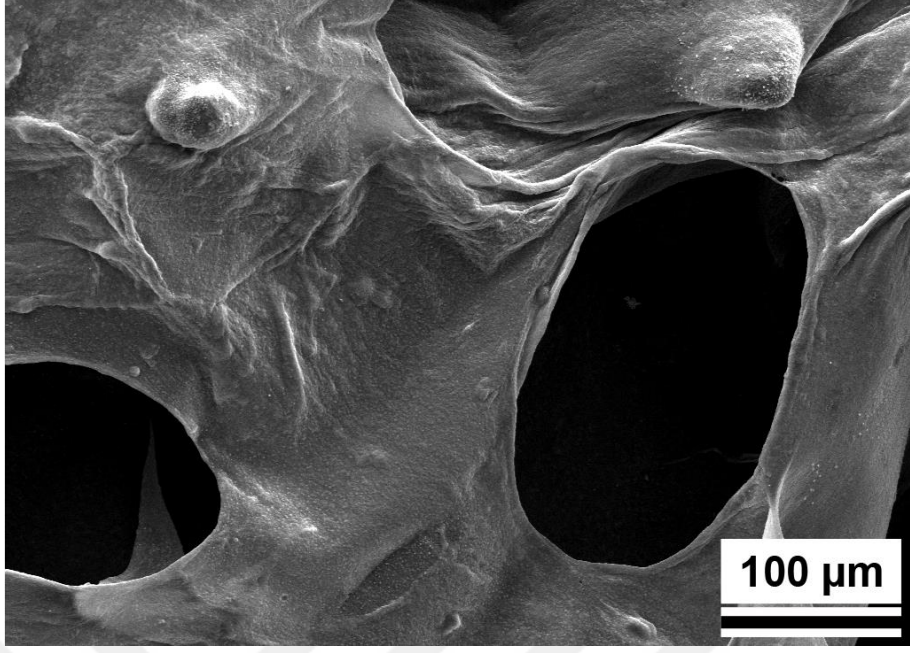
3.1.1. Kemik Hücre Dışı Matriks Kaynaklı Biyokompozit Jellerin Karakterizasyonu

A) Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Tez çalışmasında kullanılan biyokompozit substrat yüzeyleri oluşturan, kemik HDM kaynaklı hidrojel yapıdaki B, BH50, BH100 gruplarının taramalı elektron mikrografları hücresiz ve hücre tohumlanmış olarak elde edildi. Grupların kıyaslanabilmeleri için benzer büyütme oranları kullanıldı. Hüresiz B grubu için Şekil 3.1 ve 3.2’de gösterilen 100X ve 500X büyütmelerde elde edilen mikrograflarda, hidrojel kemik HDM’de yer yer 100-400 μm büyüklüklerinde porların bulunduğu ve bu porların hidrojel yapının içerisinde homojen şekilde dağılım gösterdikleri gözlemlendi.

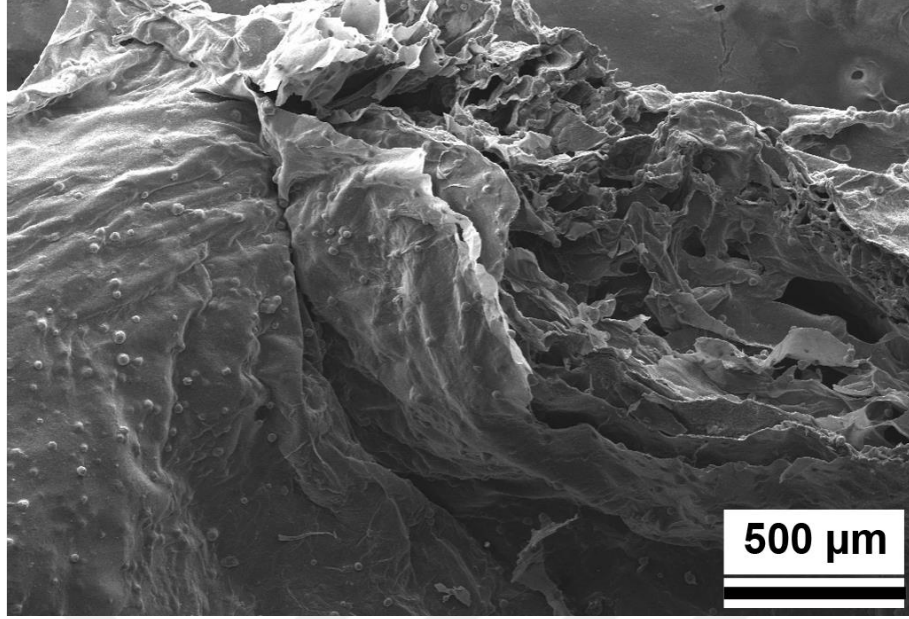


Şekil 3.1. B Grubuna ait 100X SEM görüntüsü

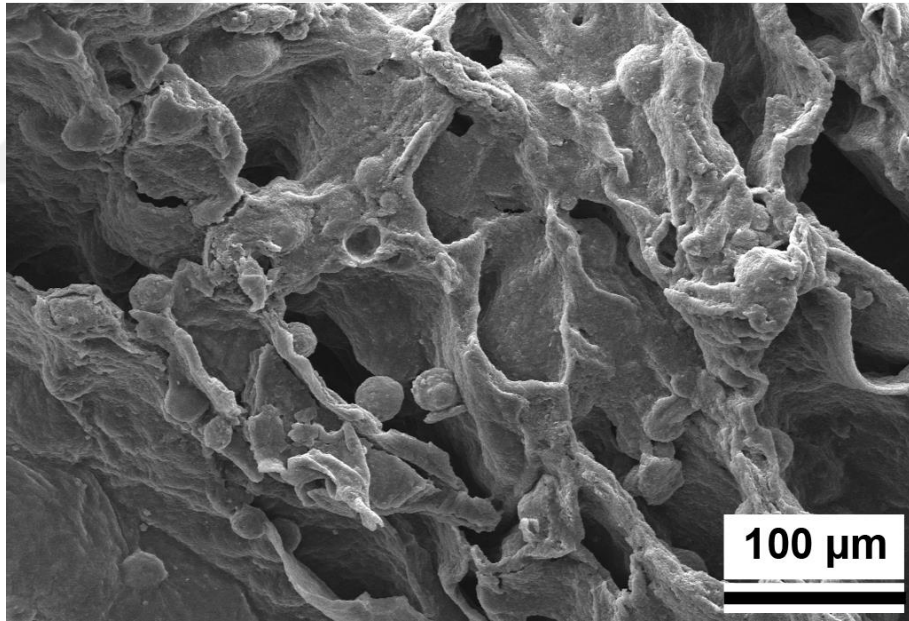


Şekil 3.2. B Grubuna ait 500X SEM görüntüsü

Hücesiz BH50 grubu için Şekil 3.3 ve 3.4'te sunulan 100X ve 500X büyütme ile elde edilen mikrograflarda, B grubunda elde edilen verilerin yanı sıra bileşimde yer alan küresel formdaki hidroksiapatit mikropartikülleri de görüldü. Hidroksiapatit mikropartiküllerinin, biyokompozit hidrojel içerisinde homojen olarak dağılım gösterdiği ve boyutlarının yaklaşık olarak 30 µm civarlarında olduğu belirlendi.

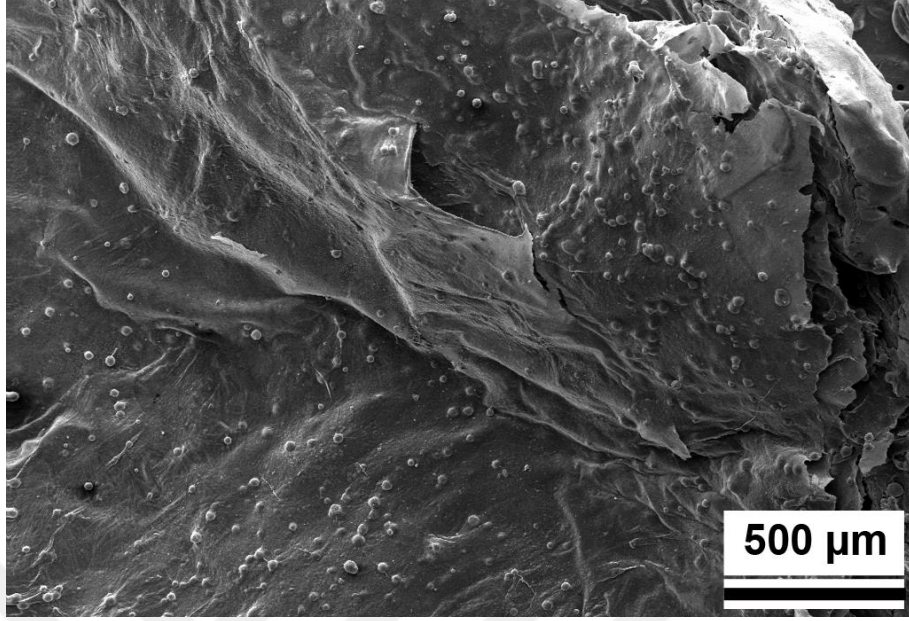


Şekil 3.3. BH50 Grubuna ait 100X SEM görüntüsü

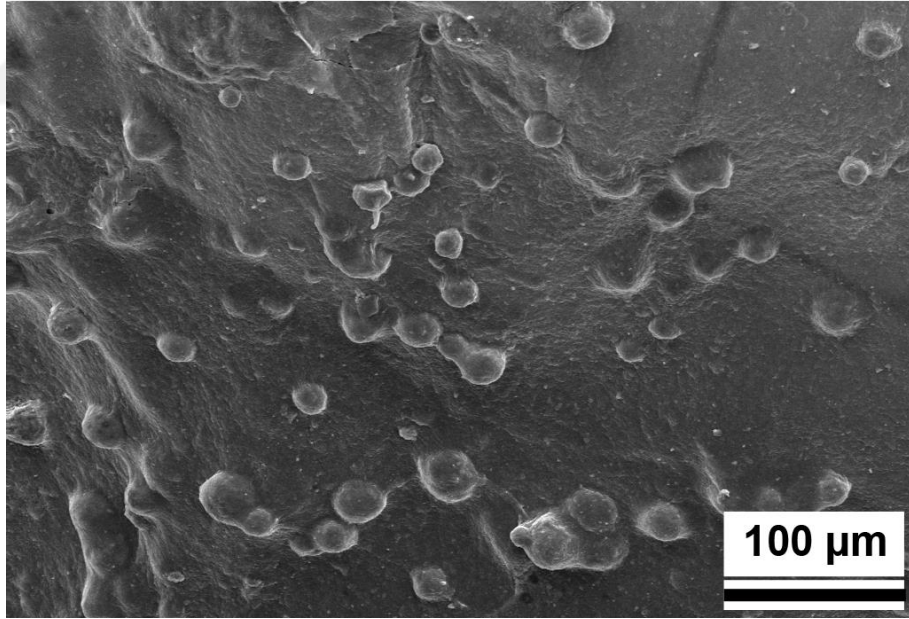


Şekil 3.4. BH50 Grubuna ait 500X SEM görüntüsü

Hüresiz BH100 grubu için Şekil 3.5 ve 3.6’da sunulan 100X ve 500X büyütmelerde elde edilen mikrograflarda, BH50 grubunda elde edilen benzer bulguların yanı sıra küresel hidroksiapatit mikropartiküllerinin daha yoğun olarak bulunduğu dikkat çekti. Hidroksiapatit mikropartiküllerinin, hidrojin içerisinde homojen şekilde dağılımı da gözlemlendi.



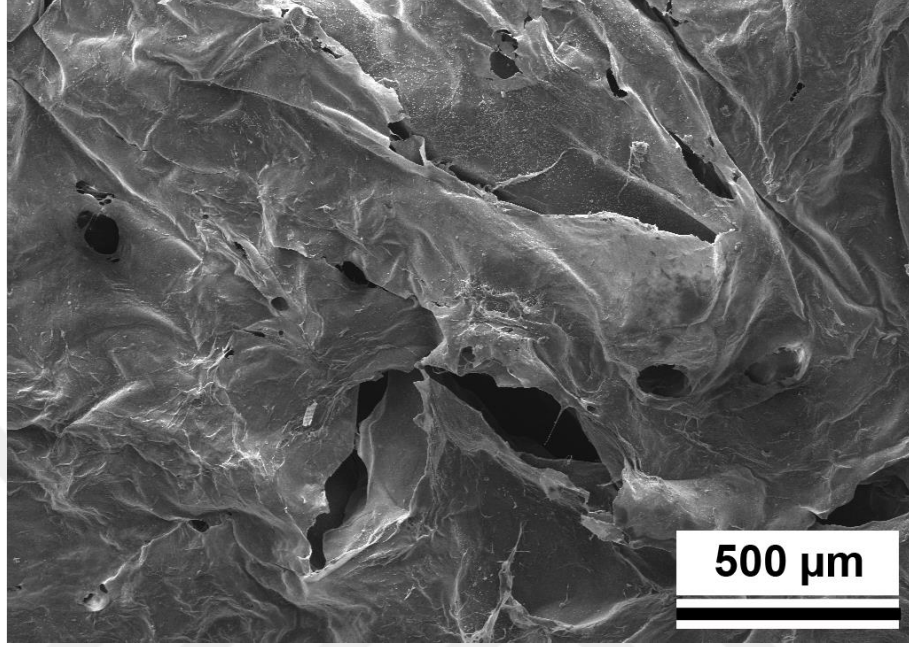
Şekil 3.5. BH100 Grubuna ait 100X SEM görüntüsü



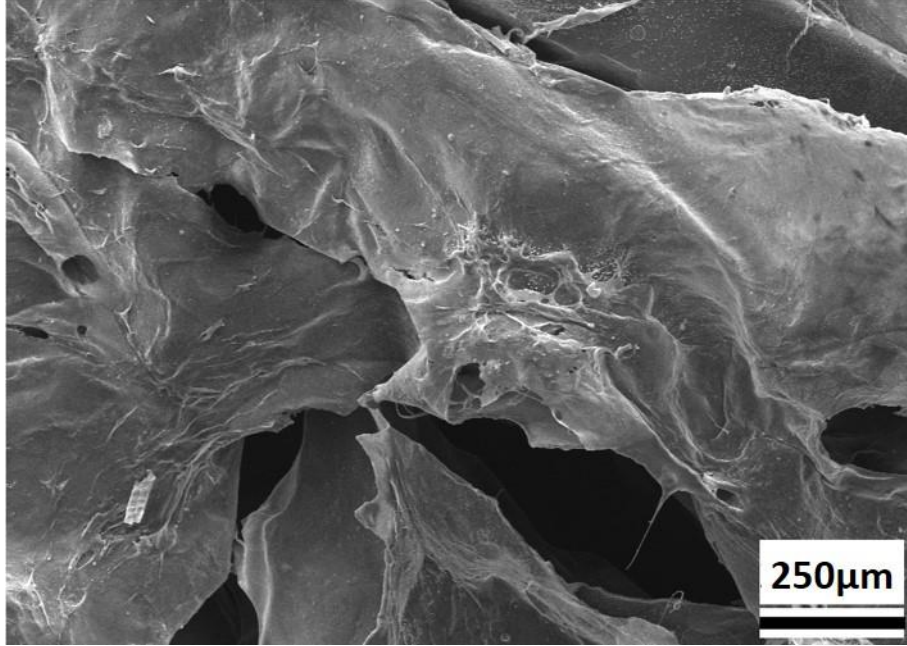
Şekil 3.6. BH100 Grubuna ait 500X SEM görüntüsü

Hücre tohumlanan B grubu için Şekil 3.7,3.8 ve 3.9’da sunulan 100X, 200X ve 500X büyütmelerde elde edilen mikrograflarda, kemik HDM’nin hidrojel yapısının

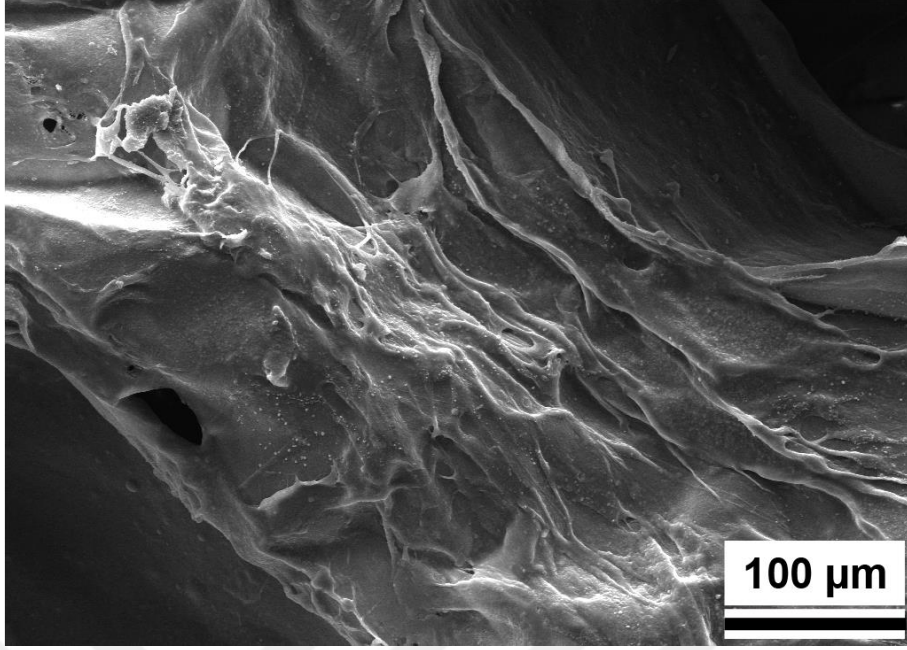
korunduğu ve hücreslerin bu substrat üzerinde tutunduğu ve yayılarak gelişmeye devam edebildikleri gözlemlendi.



Şekil 3.7. Hücre tohumlanmış B Grubuna ait 100X SEM görüntüsü

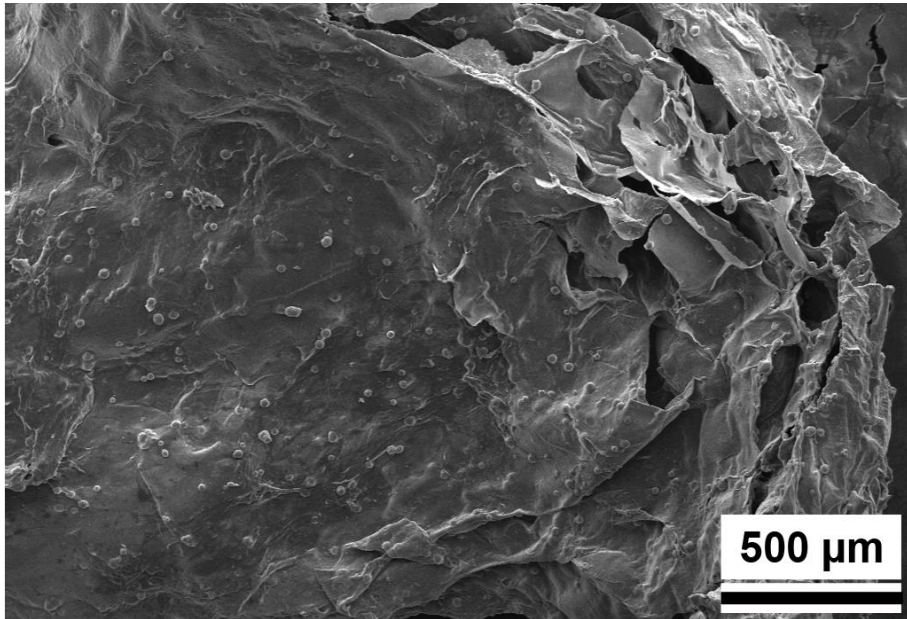


Şekil 3.8. Hücre tohumlanmış B Grubuna ait 200X SEM görüntüsü

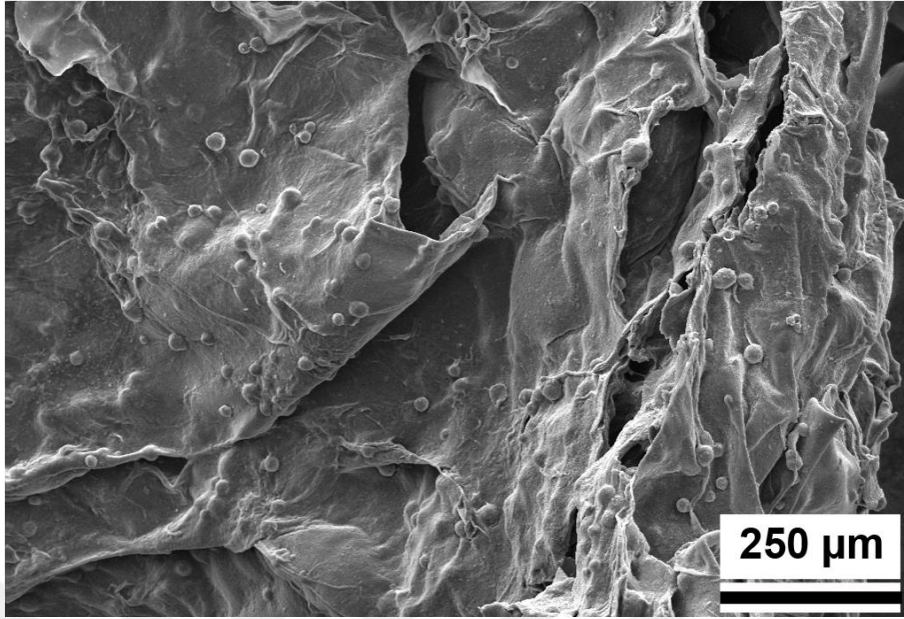


Şekil 3. 9. Hücre tohumlanmış B Grubuna ait 500X SEM görüntüsü

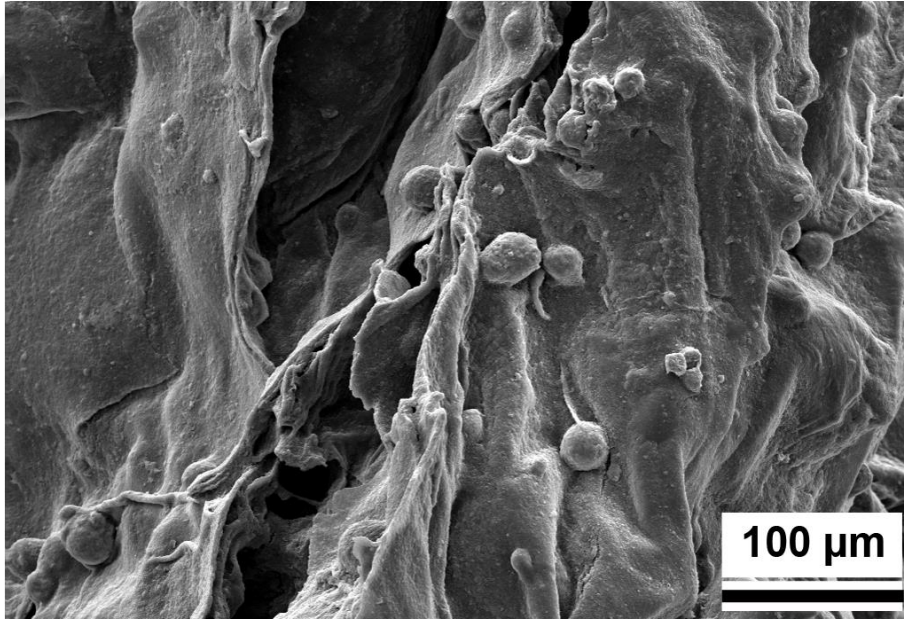
Hücre tohumlanan BH50 grubu için Şekil 3.10, 3.11 ve 3.12’de sunulan 100X, 200X ve 500X büyütmelerde elde edilen mikrograflarda, kemik HDM’nin hidrojel yapısının korunduğu, hidroksiapatit mikropartiküllerin homojen dağılım gösterdikleri ve hücrelerin bu hidrojelde yayılarak gelişmeye devam edebildikleri gözlemlendi.



Şekil 3.10. Hücre tohumlanmış BH50 Grubuna ait 100X SEM görüntüsü



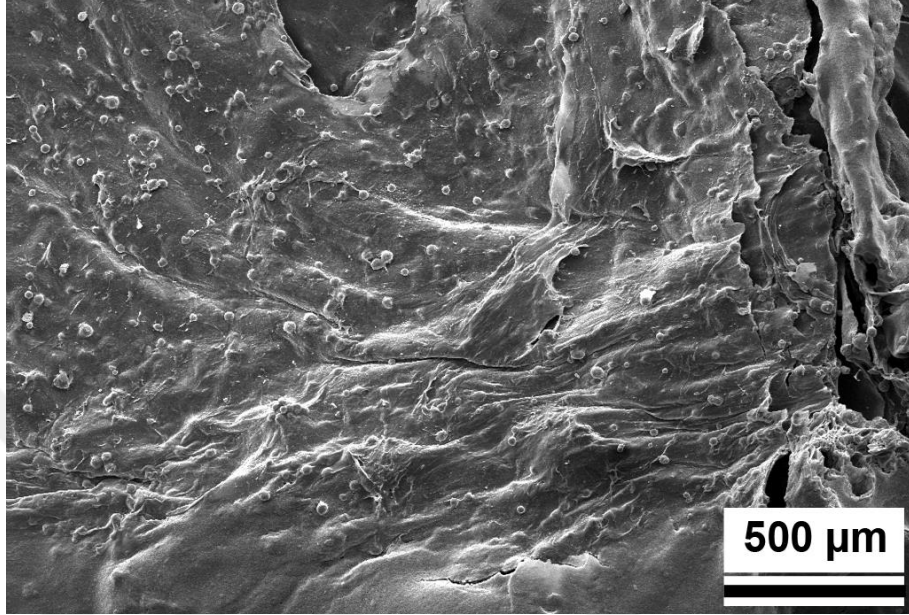
Şekil 3.11. Hücre tohumlanmış BH50 Grubuna ait 200X SEM görüntüsü



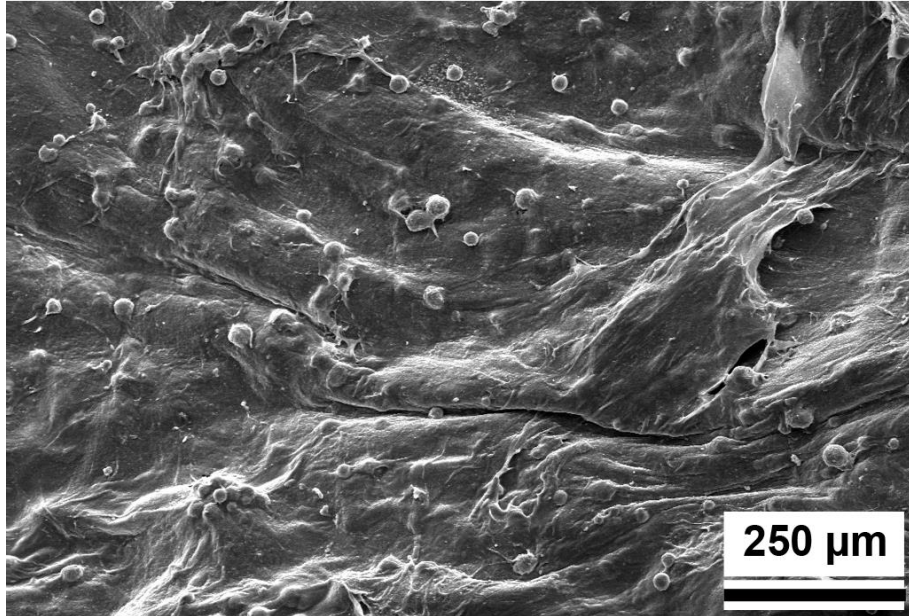
Şekil 3.12. Hücre tohumlanmış BH50 Grubuna ait 500X SEM görüntüsü

Hücre tohumlanan BH100 grubu için Şekil 3.13,3.14 ve 3.15'te sunulan 100X, 200X ve 500X büyütmelelerde elde edilen mikrograflarda, kemik HDM'nin hidrojel yapısının korunduğu, hidroksiapatit mikropartiküllerin BH50 numunesine göre daha

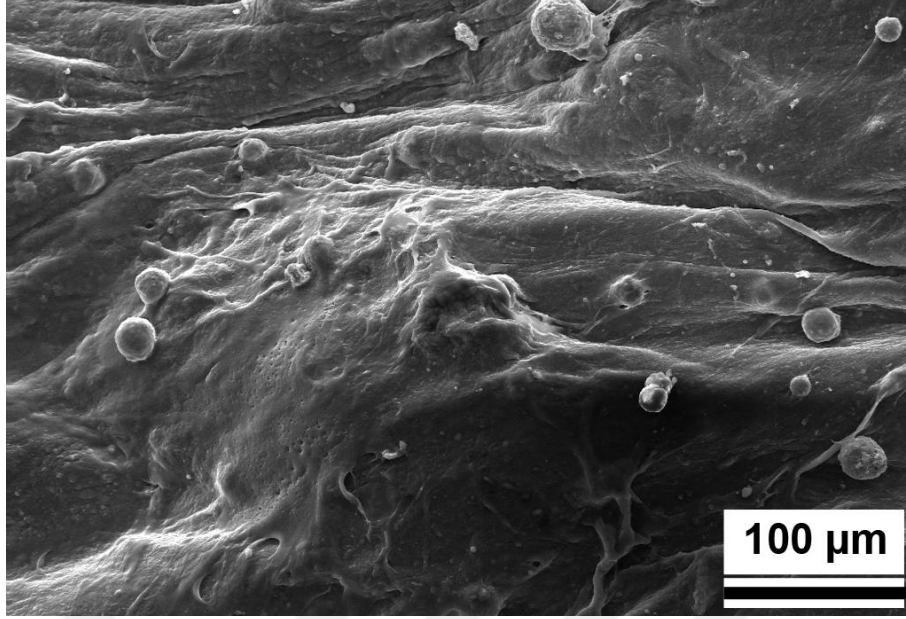
yoğun oldukları ve homojen dağılım gösterdikleri, hücrelerin hem HDM hem de hidroksiapatit mikropartiküllerine yapıştığı ve substrat üzerinde yoğun olarak yayıldığı ve gelişmeye devam edebildikleri gözlemlendi.



Şekil 3.13. Hücre tohumlanmış BH100 Grubuna ait 100X SEM görüntüsü



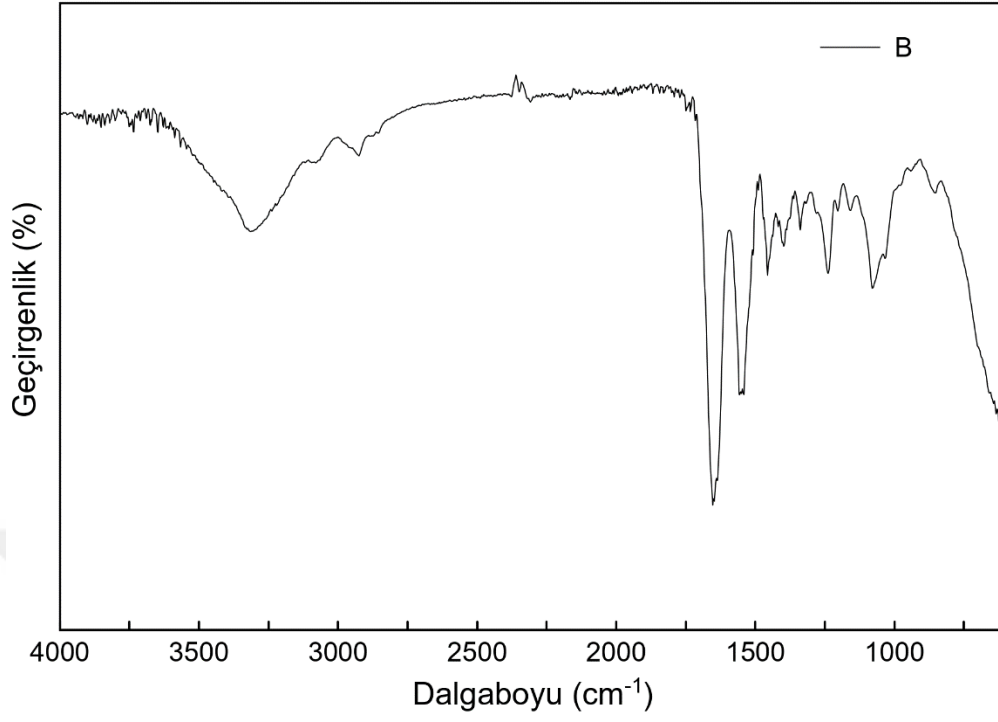
Şekil 3.14. Hücre tohumlanmış BH100 Grubuna ait 200X SEM görüntüsü



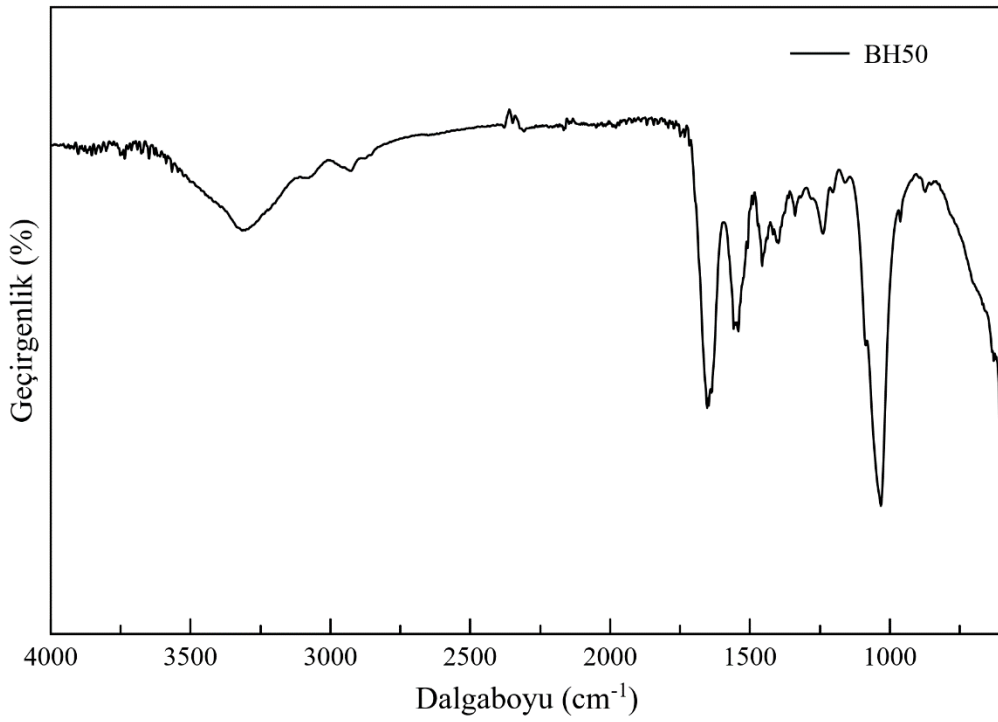
Şekil 3.15. Hücre tohumlanmış BH100 Grubuna ait 500X SEM görüntüsü

B) Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (FT-IR)

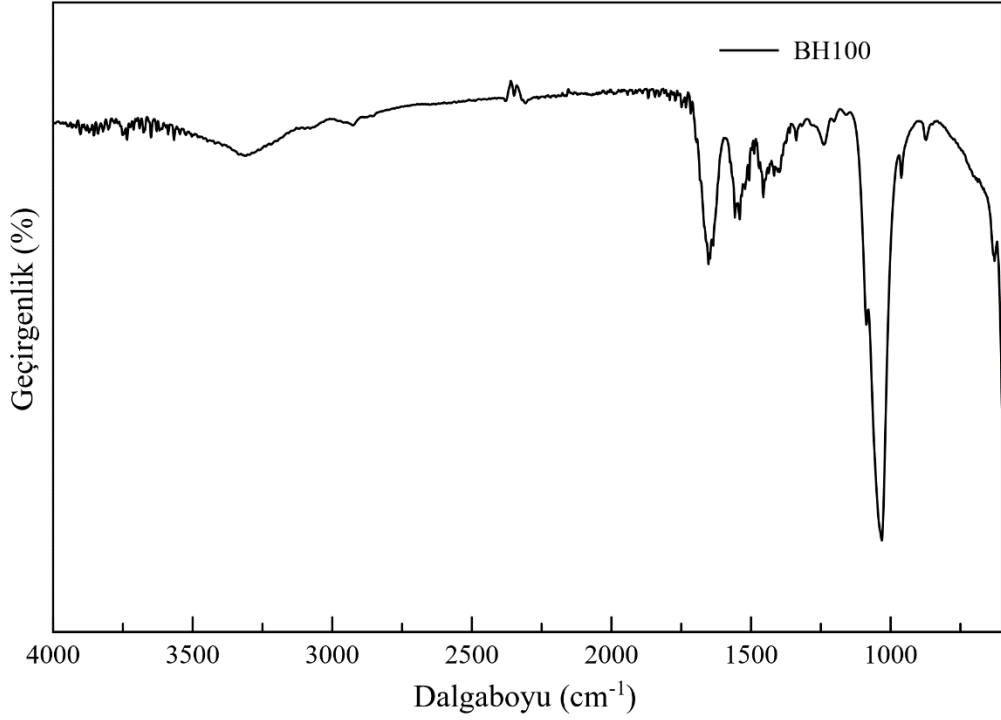
Kemik HDM kaynaklı biyomalzeme olan B numunesinin FT-IR spektrumu Şekil 3.16'da, hidroksiapatit katkılı kemik HDM kaynaklı biyomalzeme olan BH50 ve BH100 numunelerinin FTIR spektrumları ise sırasıyla Şekil 3.17 ve Şekil 3.18'de verilmiştir. Dalga sayısına karşılık % geçirgenlik pikleri incelenerek yapıdaki bileşenler teyit edilmiştir. Her üç görselde de mevcut olan O-H gerilmesine ait olan geniş pik 3250 cm^{-1} ve 3650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, C=O gerilmesine ait olan (amid I) piki 1651 cm^{-1} 'de, N-H deformasyonuna ait olan (amid II) pik 1543 cm^{-1} 'de ve N-deformasyonuna ait olan (amid III) pik ise 1236 cm^{-1} 'de gözlenmektedir. BH50 ve BH100 numunelerindeki, 1000 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen pikler ise hidroksiapatite ait P-O bağına ait olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.16. B grubuna ait FT-IR spektrumu



Şekil 3.17. BH50 grubuna ait FT-IR spektrumu



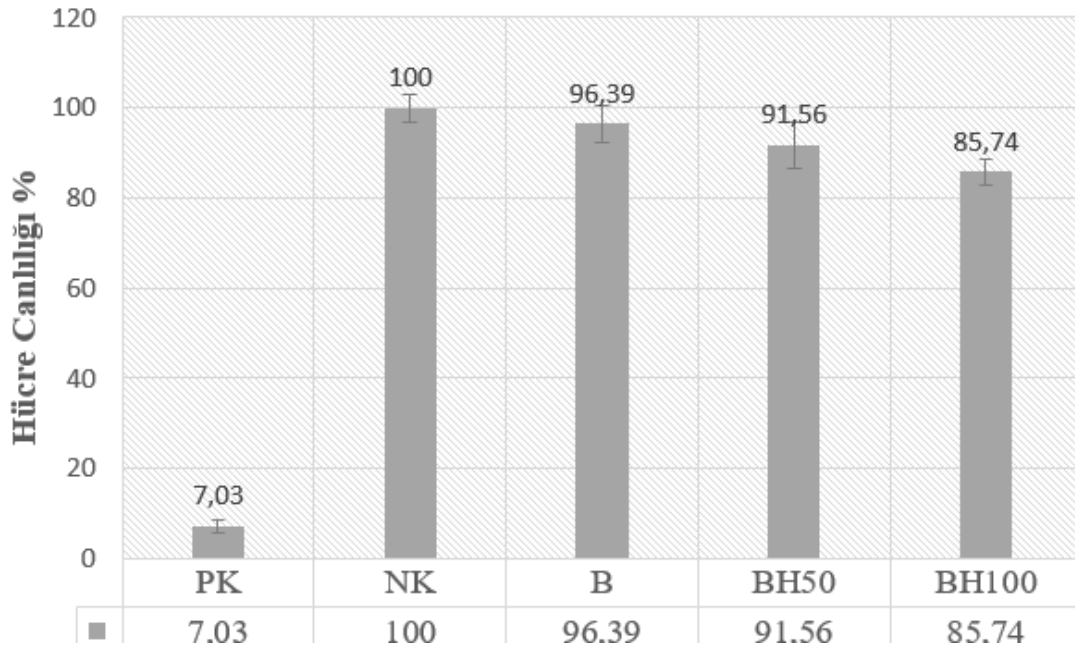
Şekil 3.18. BH100 grubuna ait FT-IR spektrumu

C) Sitotoksosite Analizi

Analizler sonucunda 570 nm dalga boyundaki spektrofotometrik ölçümler sonucu 5 farklı grubun absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmış canlılık oranları Çizelge 3.1 ve Şekil 3.19’da gösterilmektedir. ISO 10993-5 standardına göre, %70’in altındaki hücre canlılık oranları, test yapılan malzemenin sitotoksik özellik taşıdığını gösterir. Bu çalışmada, pozitif kontrol grubunda hücre canlılığı %7 ile en düşük, negatif kontrol grubunda hücre canlılığı ise %100 ile en yüksek olarak bulunmuştur. Deney gruplarında ise, B grubunda canlılık oranı %96-100, BH50 grubunda %91-96, BH100 grubunda ise %85-88 aralığında değerler belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak B, BH50 ve BH100 gruplarının tümünün sitotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.1. Hücre grupları ve MTT sonucunda canlılık oranları

Deney Grubu	% Canlılık
Pozitif Kontrol	7,03 ± 1,44
Negatif Kontrol	100 ± 3,11
B	96,39 ± 4,29
BH50	91,56 ± 5,08
BH100	85,74 ± 2,91

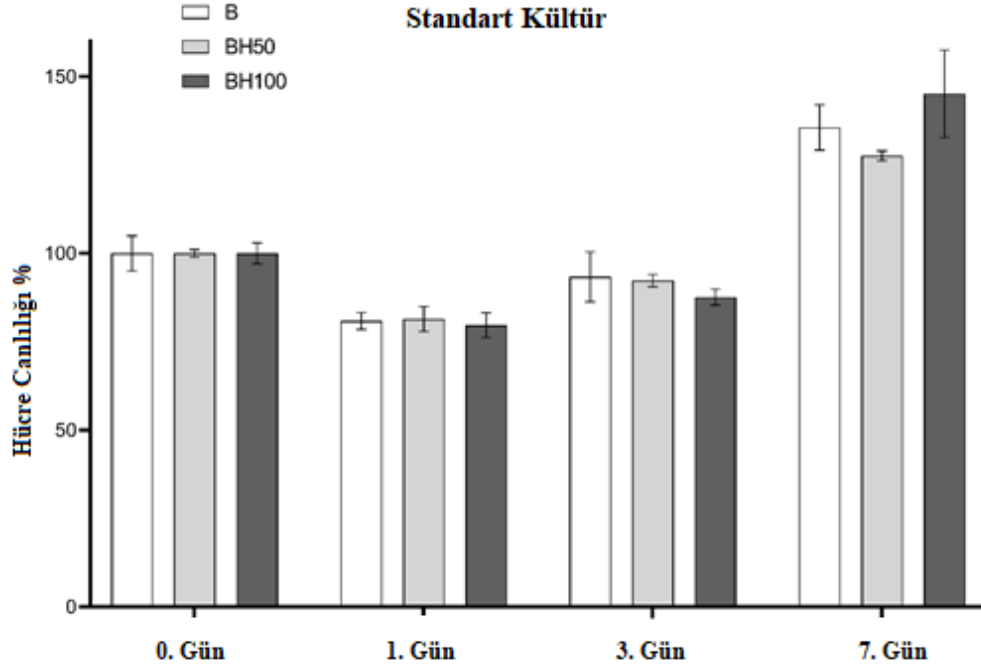


Şekil 3.19. Sitotoksosite analizi sonucunda elde edilen verilere göre hücre canlılık oranları

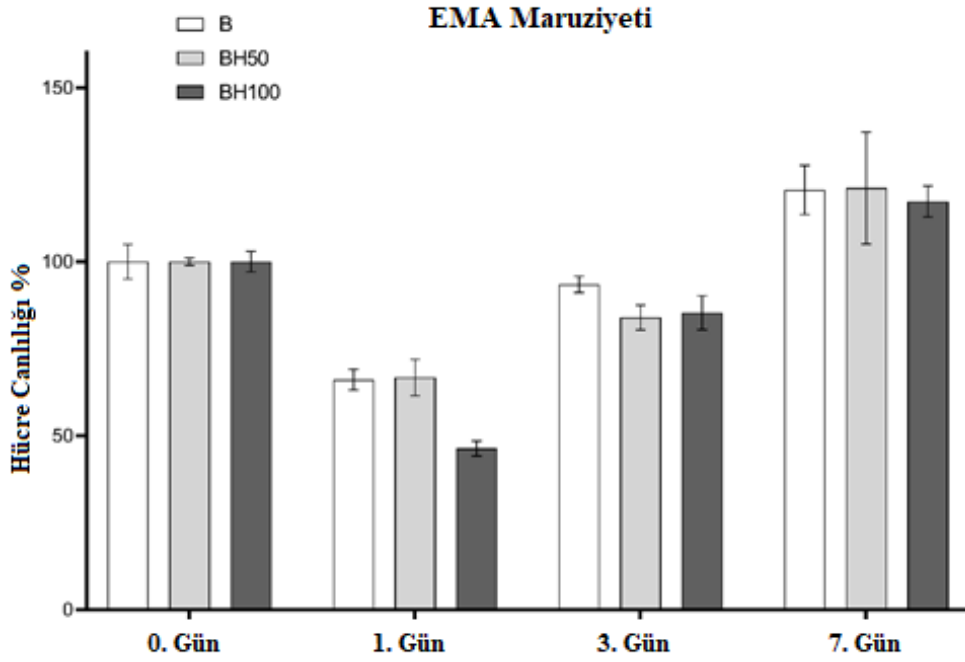
D) Alamar Blue™ Testi ile Hücre Canlılığı ve Hücre Çoğalmasının Tespiti

Geliştirilen jel formundaki numuneler (B, BH50, BH100) üzerine tohumlanan insan kaynaklı adipoz mezenkimal kök hücrelerin çoğalma ve canlılık düzeyleri her iki deney koşulunda gerçekleştirilen kültürler (standart koşul/ düşük frekanslı- darbeli elektromanyetik alan maruziyeti) için 0., 1., 3. ve 7. günlerde Alamar Blue™ testi kullanılarak izlenmiştir. Substratlardaki hücre canlılık düzeyleri, standart kültür kabında sürdürülen kültürler ile normalize edilerek sunulmuştur.

Elde edilen bulgular incelendiğinde, farklı koşullar altında yürütülen kültürlerde [EMA(-) /EMA(+)] bulunan 3 grupta da kültür süresine bağlı olarak canlılık ve çoğalma oranında 1. ve 3. günlerdeki bir miktar düşüşü takiben, kültürün 7. gününe gelindiğinde maksimum seviyeye ulaştığı Şekil 3.20 ve 3.21’de görülmektedir.



Şekil 3.20. Standart kültürde 0., 1., 3. ve 7. günlerdeki hücre canlılığı ve çoğalması



Şekil 3.21. EMA maruziyetinde 0., 1., 3. ve 7. günlerdeki hücre canlılığı ve çoğalması

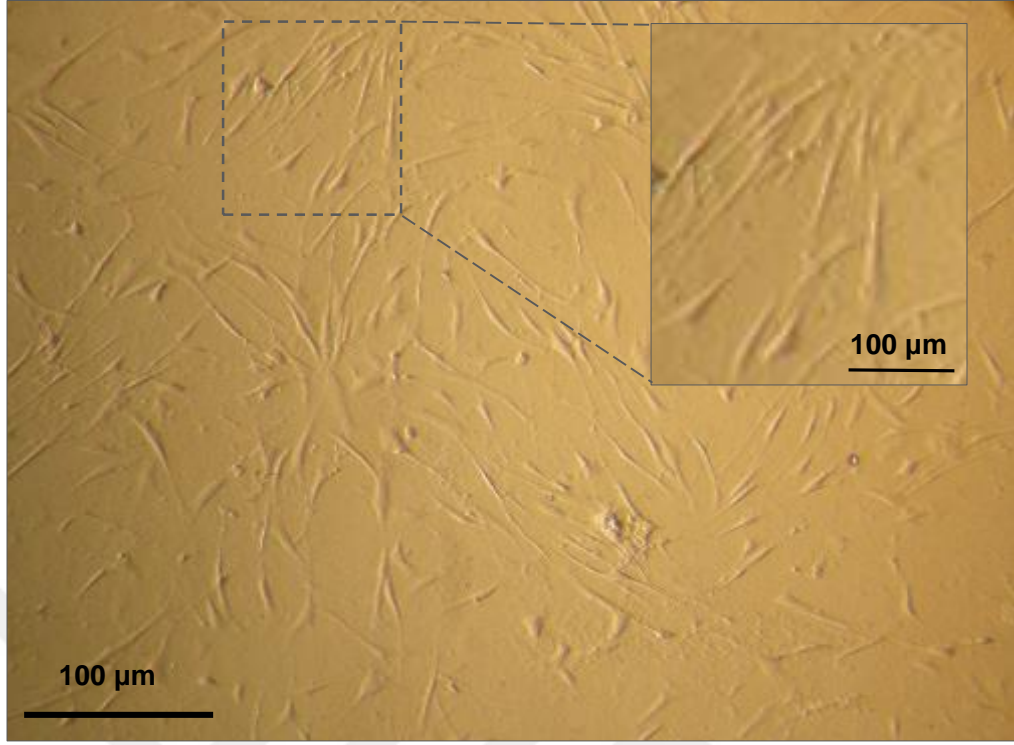
Tez çalışmasında kullanılan biyokompozit substrat yüzeylerin ve uygulanan koşulların, hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerinde dikkat çekici düzeyde bir olumsuz etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

3.2. Hücre Çalışmaları

3.2.1. İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

A) İnvirt Mikroskop İncelemeleri

İnsan kaynaklı adipoz mezenkimal kök hücrelerden oluşturulan karma pasaj içeren kültür, invert mikroskobu ile görüntülenerek incelendi ve morfolojik olarak mezenkimal kök hücre tanımına uygun olarak iğsi fibroblastoid yapıda oldukları gözlemlendi.

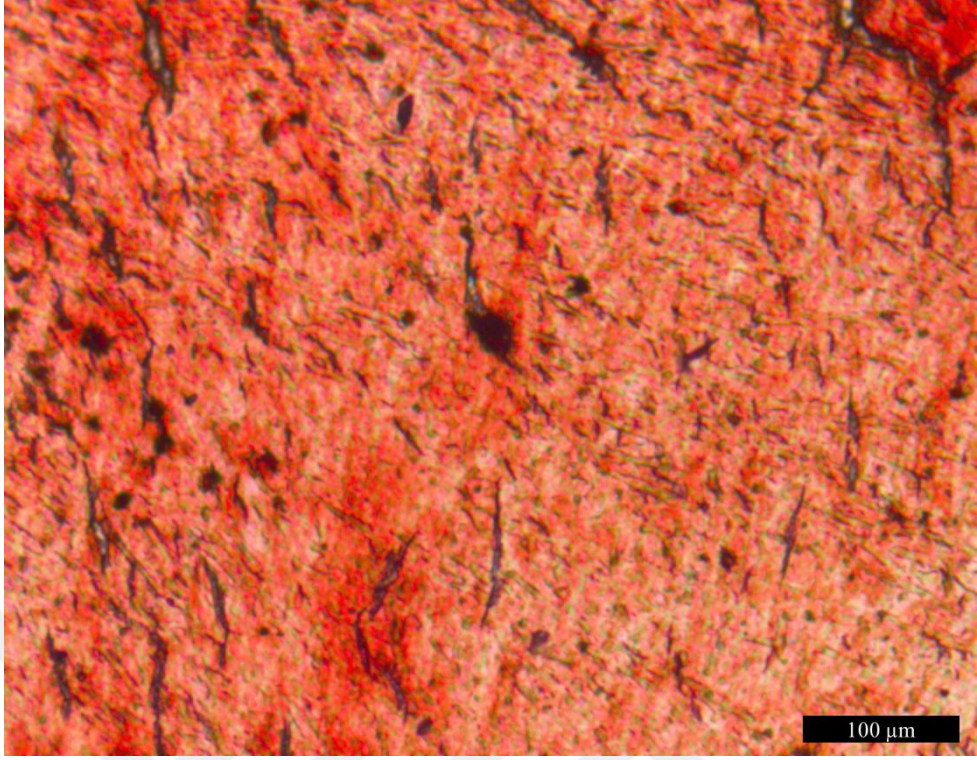


Şekil 3.22. iAMKH'lerin invert mikroskop görüntüsü

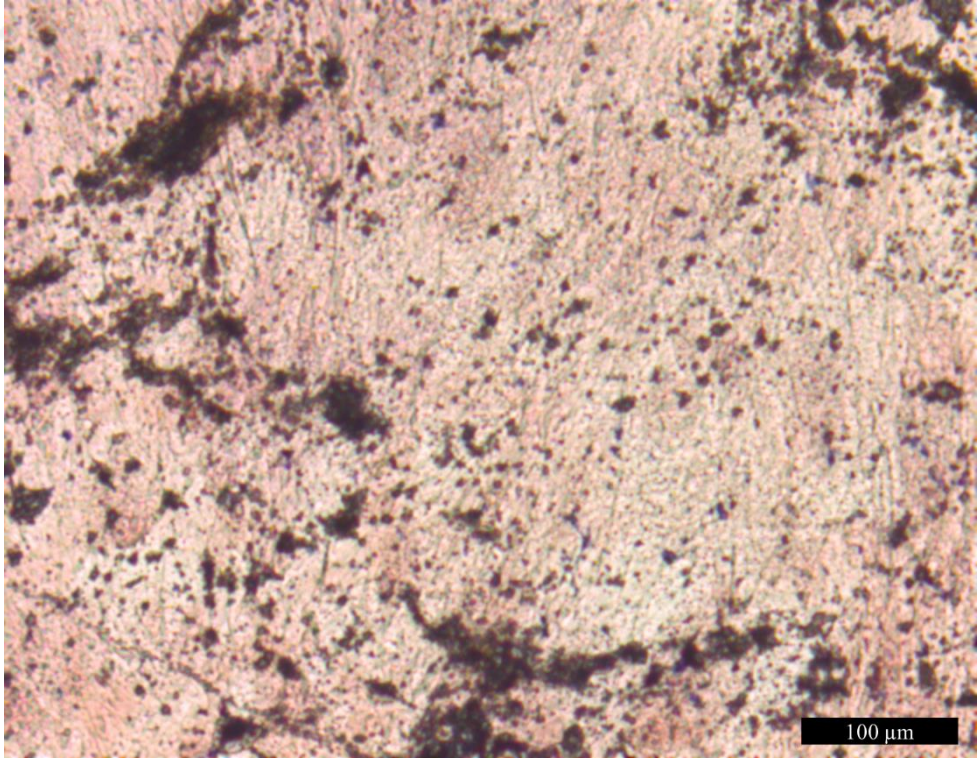
B) İnsan Kaynaklı Adipöz Mezenkimal Kök Hücrelerinin Farklılaşma Çalışmaları

Osteojenik Farklılaşma Çalışmaları

Osteojenik farklılaşmayı göstermek ve farklılaşma sonucunda hücrelerde biriken kalsiyum odaklarını belirlemek için yapılan Alizarin kırmızısı (AR - S) ile depo kalsiyum ve kalsiyum tuzlarını göstermek için Von Kossa boyaması yapıldı. Alizarin kırmızısı boyaması sonrasında mineral odaklarını gösteren bölgelerin koyu kırmızı renkte (Şekil 3.23), Von Kossa boyaması sonrasında ise kalsiyum tuzlarının siyah/kahverengi-siyah, nükleusun kırmızı ve sitoplazmanın pembe renkte (Şekil 3.24) boyanmış oldukları ışık mikroskobu ile görüntülenerek fotoğraflandı.



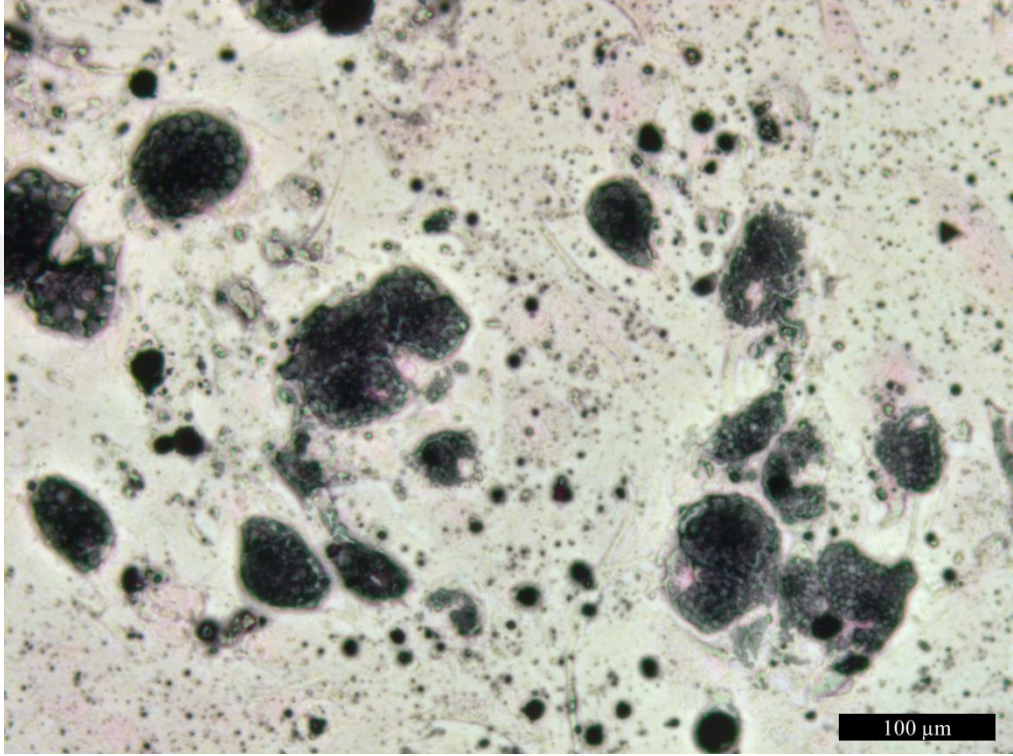
Şekil 3.23. Osteojenik farklılaşma sonrası Alizarin kırmızısı boyama sonucu



Şekil 3.24. Osteojenik farklılaştırma sonrası Von Kossa boyama sonucu

Adipojenik Farklılaşma Çalışmaları

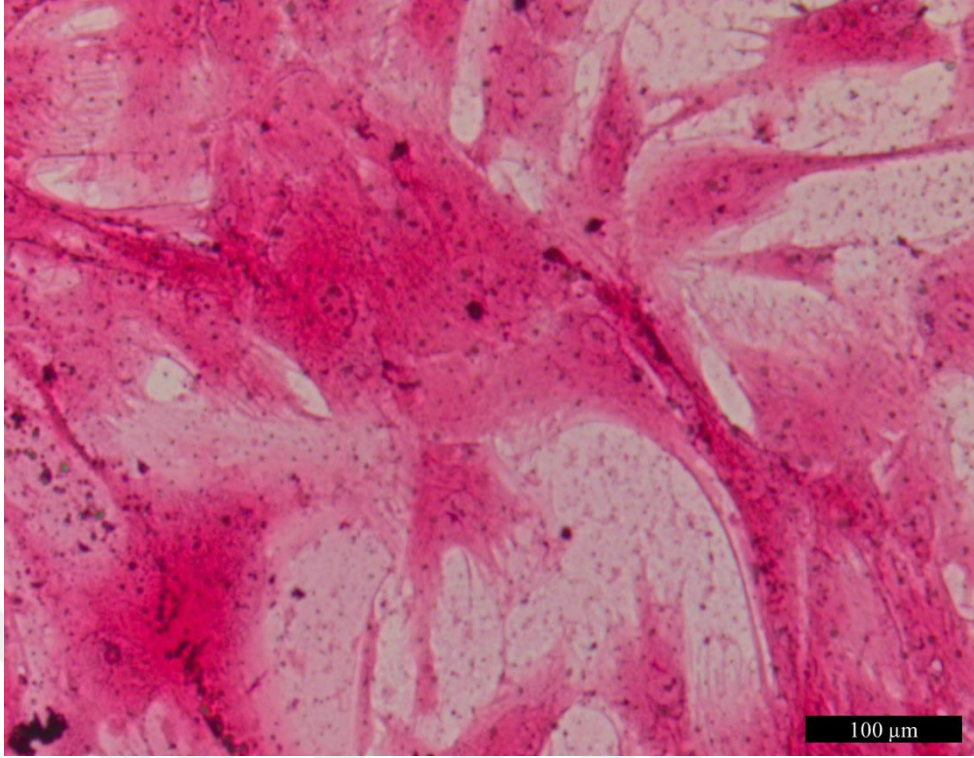
Adipojenik farklılaşmayı göstermek için Sudan siyahı boyaması yapıldı. Boyanan kuyucuklarda çekirdek kırmızı, lipidler ise mavi- siyah renkte görüldü (Şekil 3.25). Boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile görüntülendi, farklılaşmış hücreler ve lipidler değerlendirilerek fotoğraflandı.



Şekil 3.25. Adipojenik farklılaştırma sonrası Sudan siyahı boyama sonucu

Kardiyojenik Farklılaşma Çalışmaları

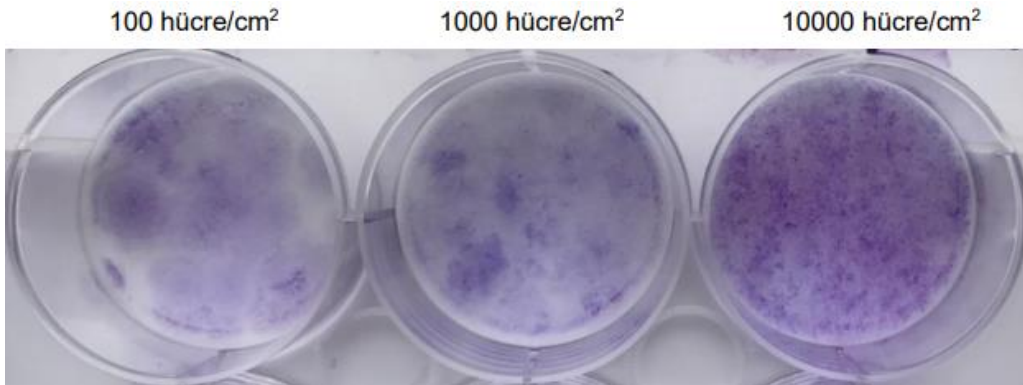
Kardiyojenik farklılaşmayı göstermek için daha önce tespit edilmiş hücre preparatları hematoksilin/eozin ile boyandı. Boyanan kuyucuklarda çekirdek koyu mavi/ menekşe renkte, sitoplazma ise pembe/kırmızı renkte görüldü (Şekil 3.26). Boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile görüntülenerek farklılaşmış hücreler değerlendirilerek fotoğraflandı.



Şekil 3.26. Kardiyojenik farklılaştırma sonrası Hematoksilen - Eozin boyama sonucu

C) İnsan Kaynaklı Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerin CFU-f Oluşturma Çalışmaları

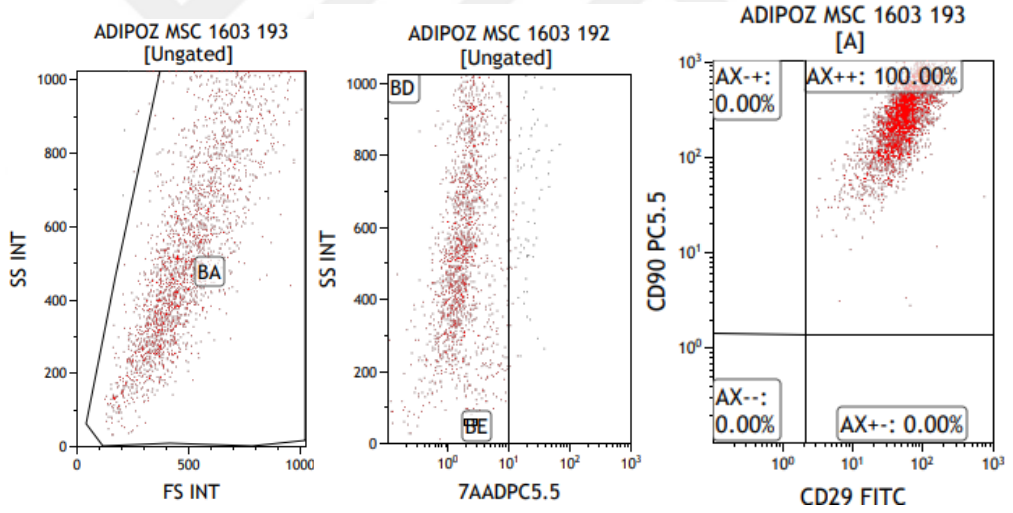
Hazırlanan karışık pasajlardaki hücreler ile CFU-f oluşturma potansiyeli kristal viyole boyaması yapılarak gözlemlendi. Farklı hücre konsantrasyonlarında (100 hücre, 1000 hücre, 10000 hücre) hazırlanmış kuyucuklarda gelişim gösteren hücre kolonileri makroskobik olarak değerlendirildi (Şekil 3.27).

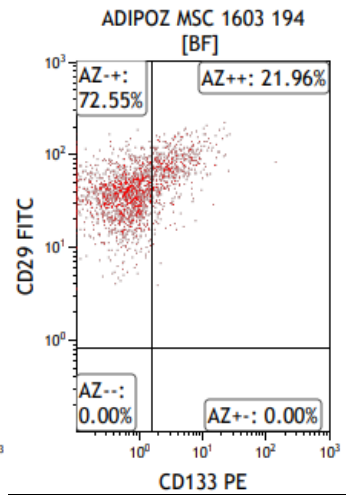
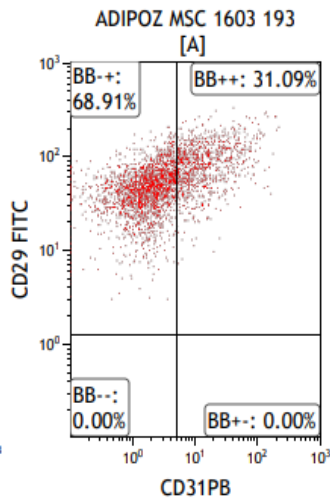
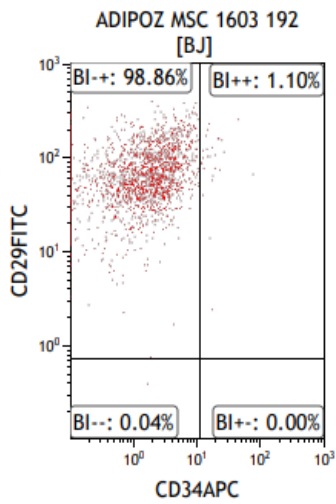
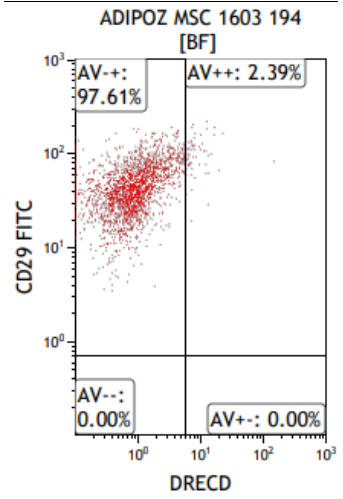
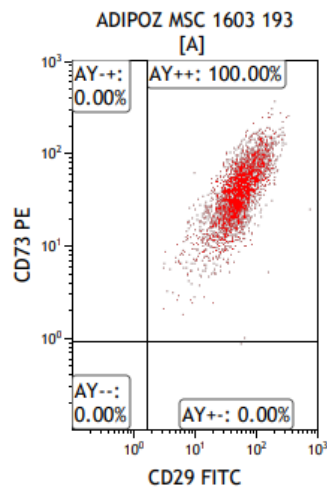
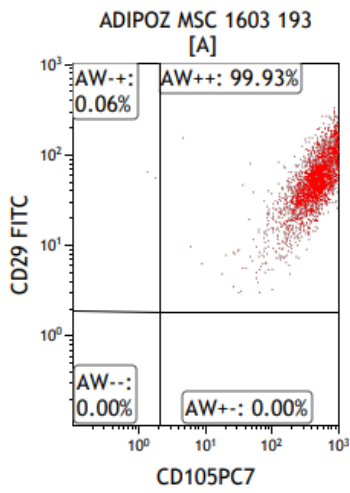


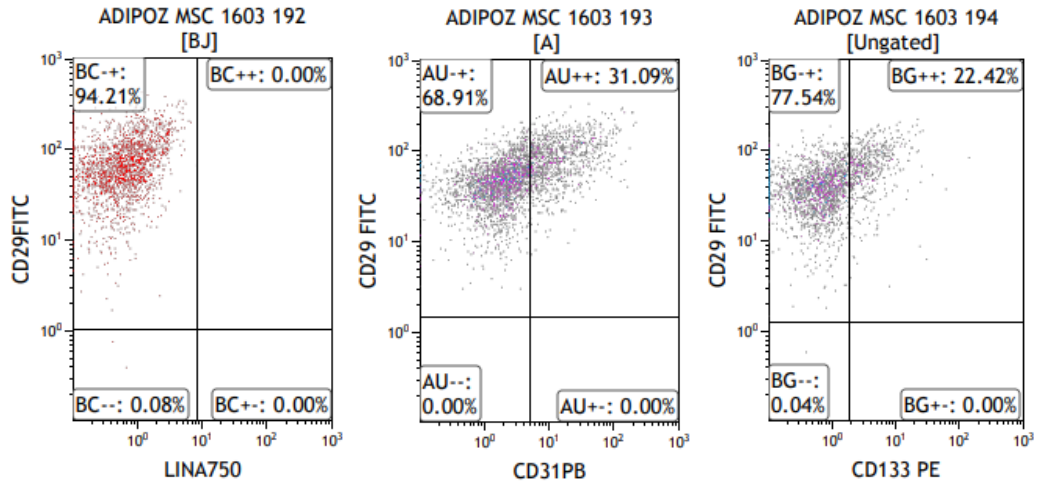
Şekil 3.27. iAMKH'lerin oluşturduğu kolonilerin Kristal Viyole boyaması ile makroskobik gösterimi

D) İnsan Kaynaklı Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotiplendirme Çalışmaları

İnsan kaynaklı adipoz doku hücrelerinden, karma pasaj içeren hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen hücre numulerinden Beckman Coulter Navios marka, üç lazerli on renk dedektörü bulunan FCM cihazında her örnekten veri toplanarak (önceden belirlenmiş sabit ayarlarda) kaydedildi. Veriler Kaluza programı kullanılarak analiz edildi. Veriler değerlendirildiğinde hücrelerin CD29, CD73, CD90 ve CD105'i yüksek düzeyde ifade ederken, CD31, CD34, CD133 ve Lin-A750 ifadeleri ise bu hücreler tarafından yok sayılabilecek düzeyde ifade edilmektedir (Şekil 3.28). Elde edilen veriler ışığında bu tez çalışmasında kullanılan hücrelerin, mezenkimal kök hücreler için spesifik yüzey belirteçlerini karşılamış olduğu ve “Mezenkimal Kök Hücre” olarak tanımlanabileceği belirlenmiştir.







Şekil 3.28. iAMKH'lere ait FCM analizi sonucu immüfentipleme tablosu

3.3. Ekstrasellüler Vezikül Çalışmaları

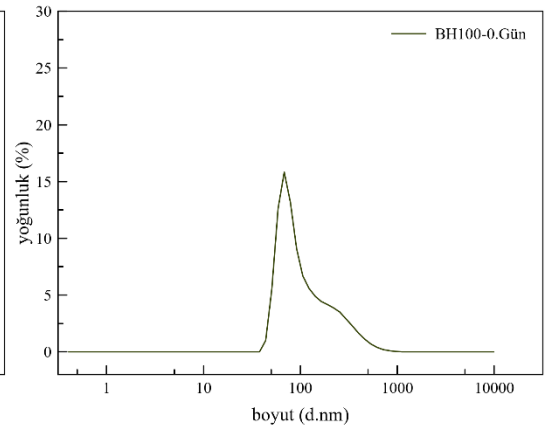
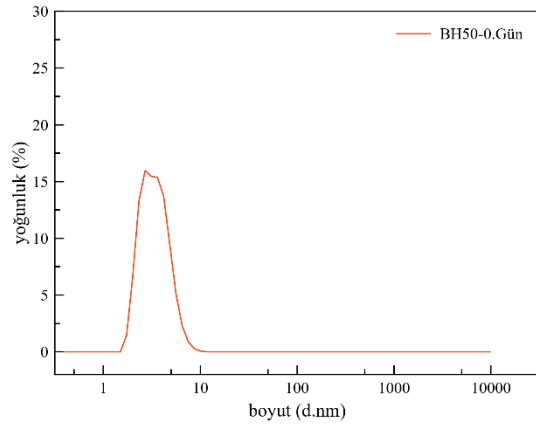
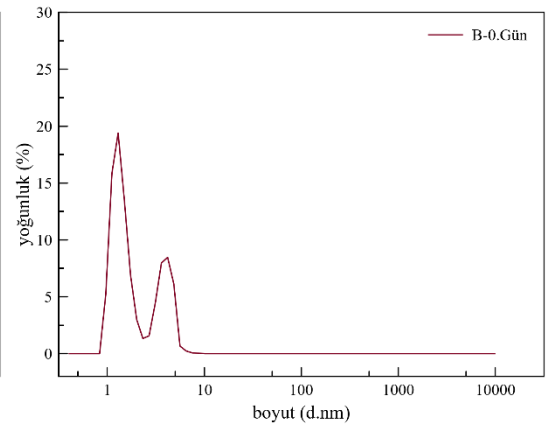
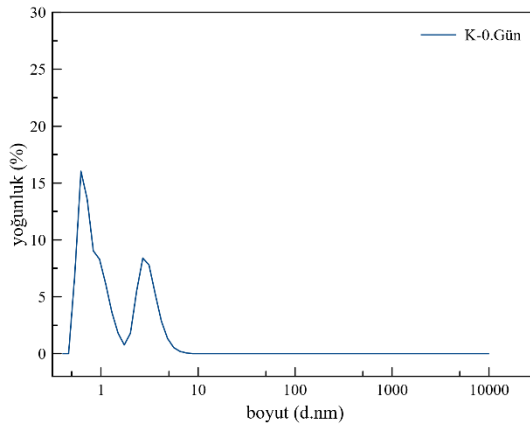
3.3.1. Eksozom İzolasyonu Ve Karakterizasyonu

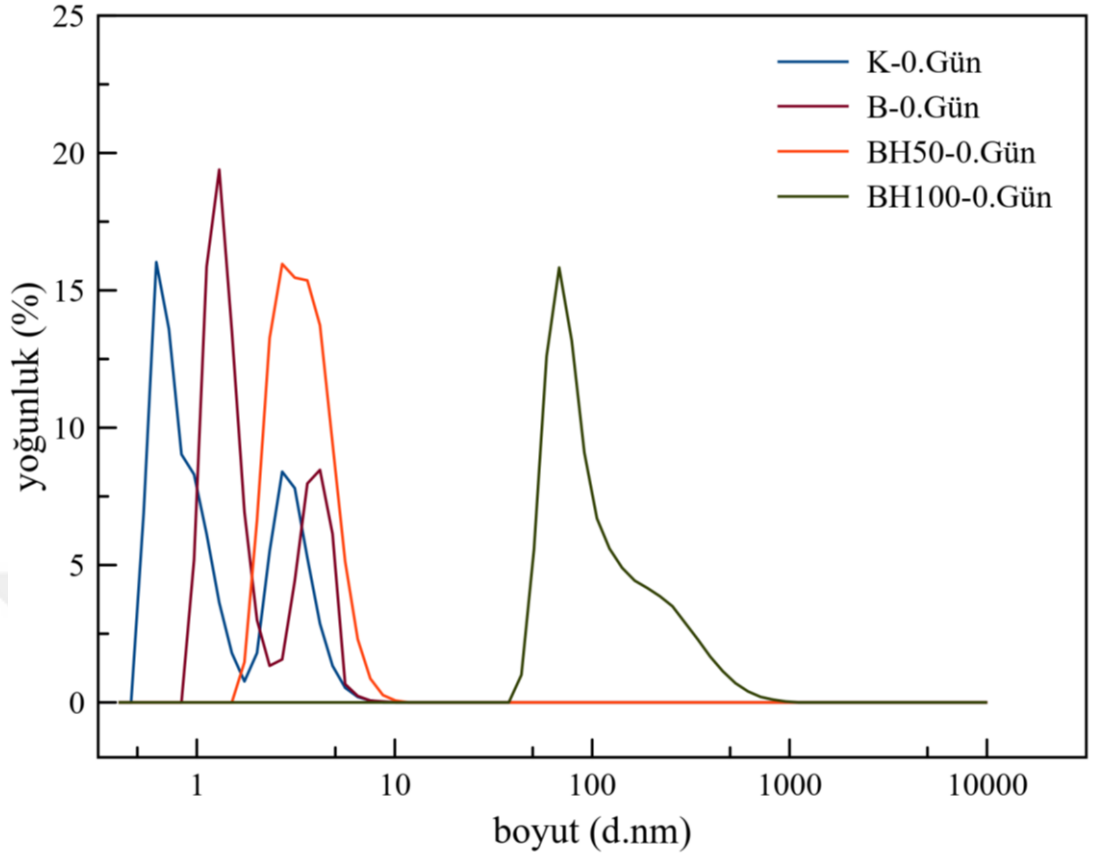
İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerinin; standart koşullarda ve EMA maruziyeti ile kültür edilmesi ile (%5 CO₂, %90 nem içeren CO₂'li inkübatörde), belirlenmiş olan zaman noktalarında (0, 3 ve 7. günlerde) toplanan besiyerinden eksozom izolasyonu (Total Exosome Isolation kit- Invitrogen) yapıldı. İnsan AMKH kültüründen elde edilen eksozomlar; boyut dağılımı, zeta potansiyeli, biyo-belirteçlerin varlığı ve morfolojik özelliklerine göre karakterize edildi. Belirlenen zaman noktalarında (0, 3 ve 7. günlerde), standart koşullarda ve EMA maruziyeti ile kültür edilen deney gruplarının (K, B, BH50, BH100) besiyerlerinden elde edilen eksozomların çapları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Eksozomların boyut ve yüzde dağılımı

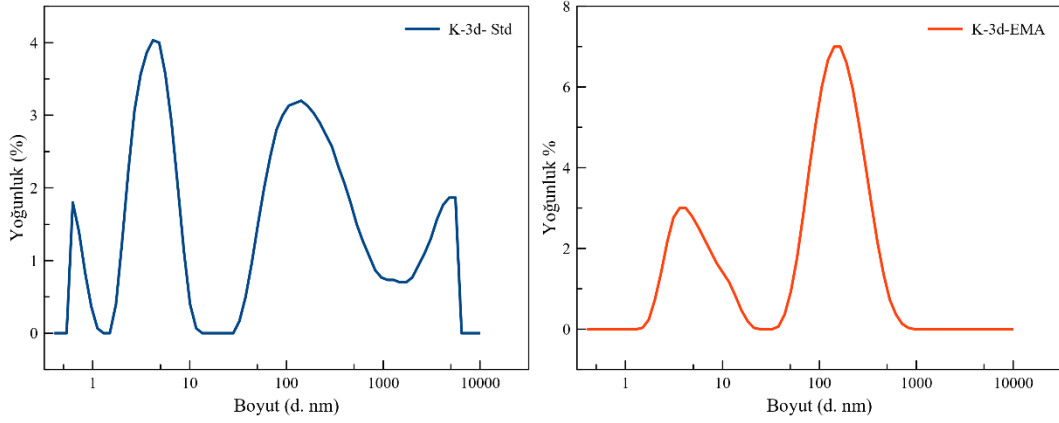
Deney grupları	Standart ortam			EMA maruziyeti	
	0. gün	3. gün	7. gün	3. gün	7. gün
Kontrol	%54,8=190,2nm	%53,6=206,7nm	%24,5=41,71nm	%73,6=157nm	%89,7=182,2nm
	%65,1=217,2nm	%57,2=430,1nm	%34=105,9 nm	%68,2=176nm	%88,5=179,8nm
	%58,8=167,2nm	%43=219,5nm	%22,9=52,15nm	%72,5=216nm	%94=198,6nm
	%56,4=286,1nm	%54=269,7nm	%40,2=72,23nm	%58,9=227,2nm	%14,5=30,82nm

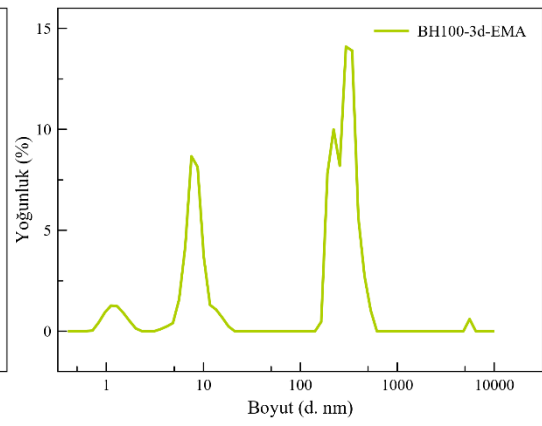
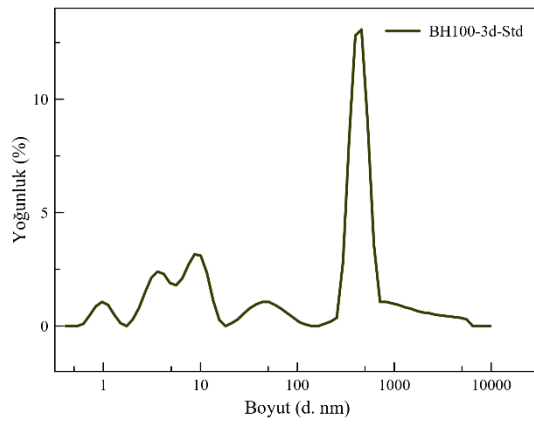
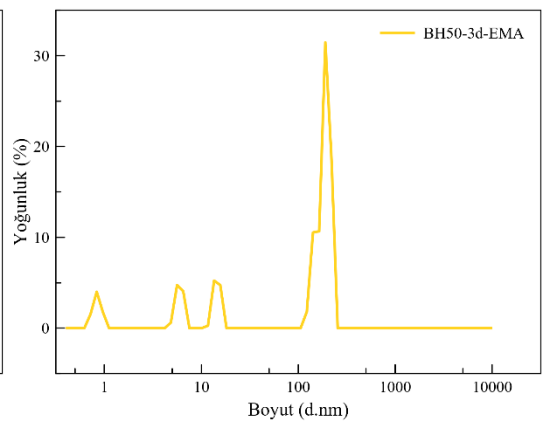
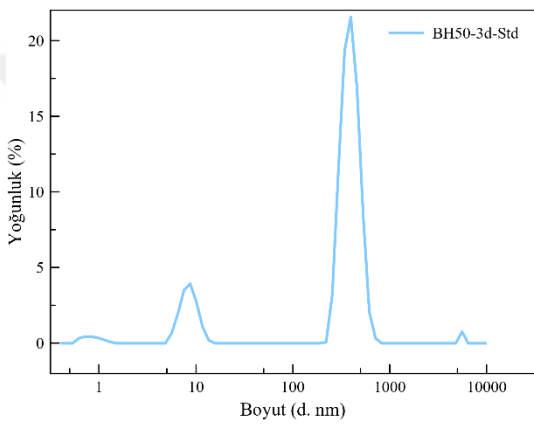
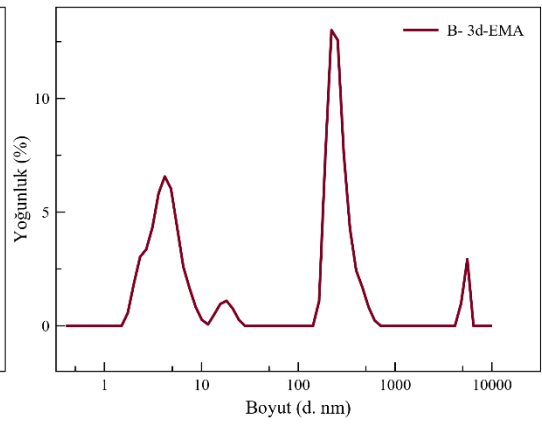
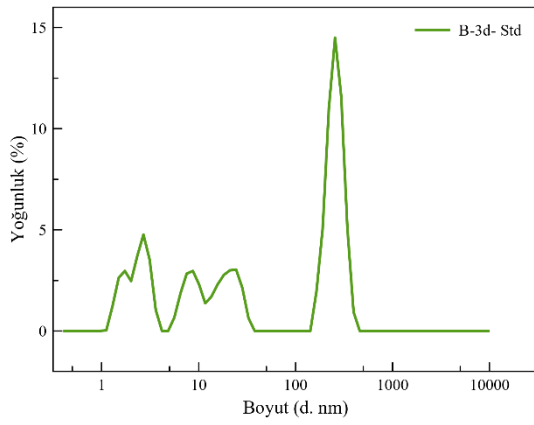
B	%67,7=317,1nm	%58,9=223,2nm	%64,3=13,66nm	%44,9=339,5nm	%81,4=154,4nm
	%62,8=498,3nm	%37,1=296,4nm	%59,5=39,87nm	%49,6=250,8nm	%53,9=185,6nm
BH50	%68,3=296,5nm	%84,8=388,8nm	%46,9=112,5nm	%47,5=144,5nm	%48,7=71,92nm
	%50,2=221,7nm	%79,9=412,9nm	%68,4=88,62nm	%85,9=196,6nm	%82,7=127,5nm
	%66,2=272,5nm	%85=390,8nm	%60,4=55,2nm	%75,9=156,8nm	%80,8=97nm
BH100	%93,3=333,8nm	%47,4=1335 nm	%85,9=65,46nm	%55,3=359,9nm	%60,1=189,4nm
	%89,9=402,6nm	%57,5=425,8 nm	%46,2=30,13nm	%61,6=212,3nm	%73,3=217,2nm
	%94,1=358nm	%75,4=442,9 nm	%74,5=64,25nm	%74,5=313,6nm	%87,1=358,9nm

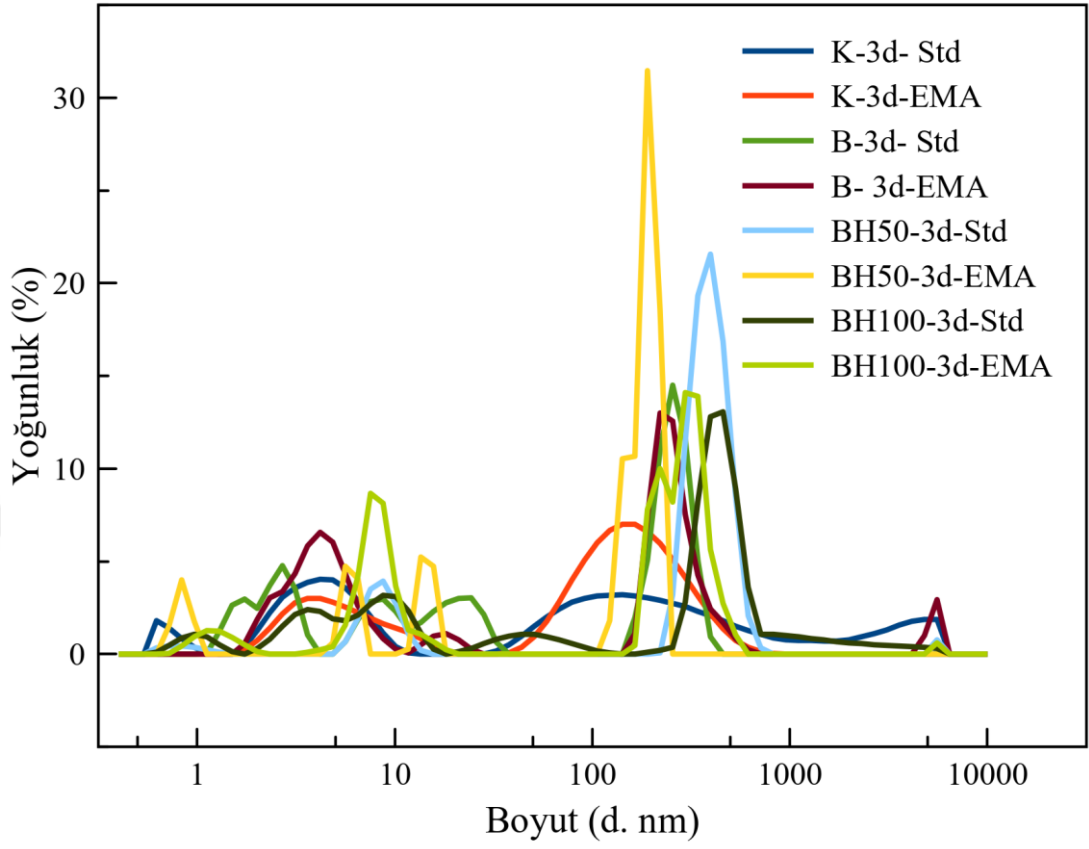




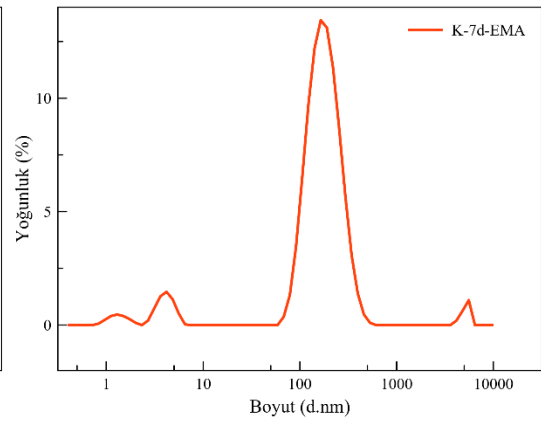
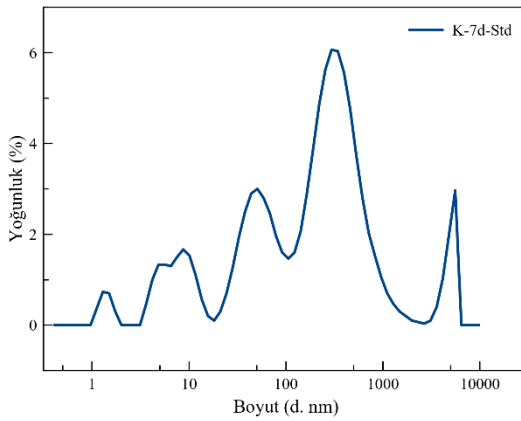
Şekil 3.29. 0. Gün grubuna ait boyut yoğunluk grafikleri

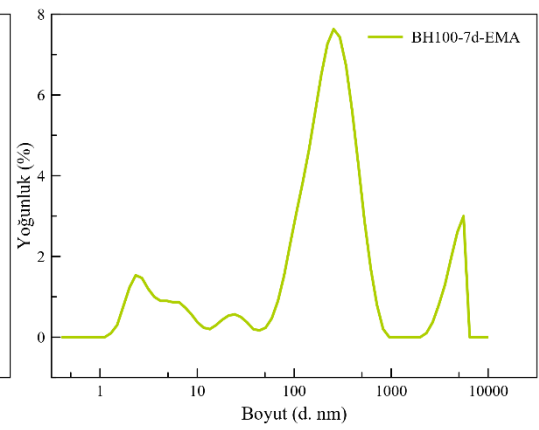
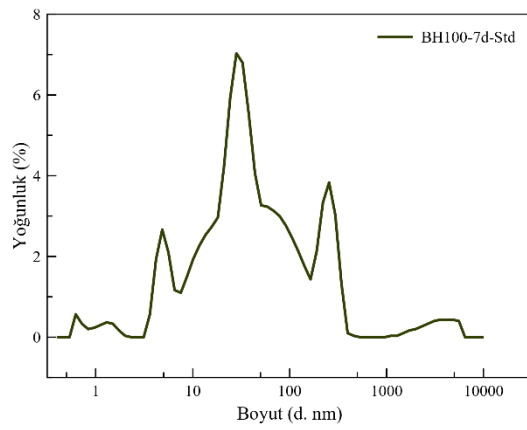
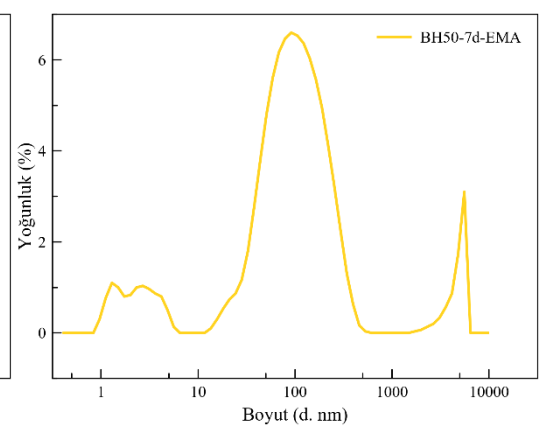
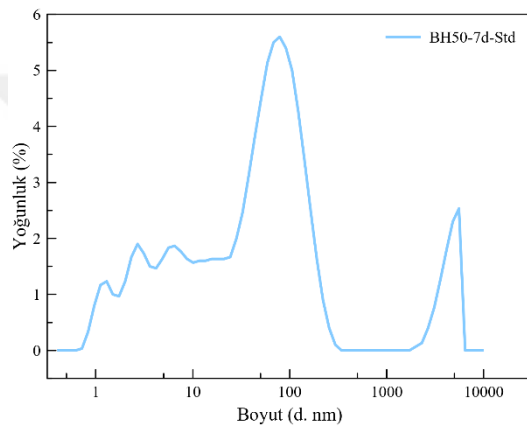
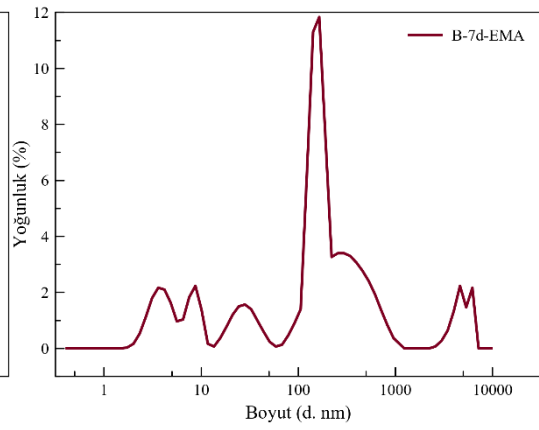
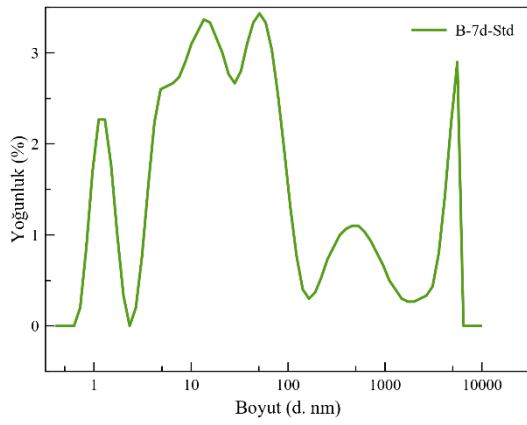


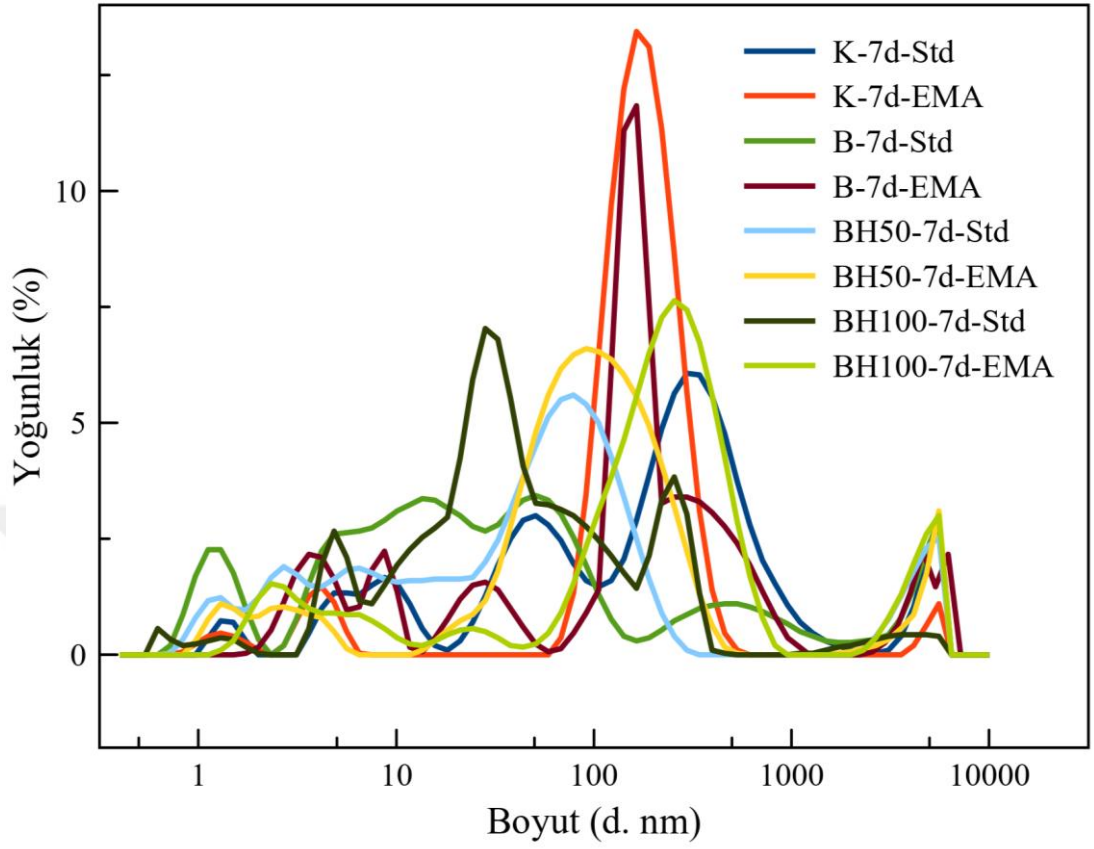




Şekil 3.30. 3. Gün grubuna ait boyut yoğunluk grafikleri







Şekil 3.31. 7. Gün grubuna ait boyut yoğunluk grafikleri

3.3.2. Eksozomların Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi

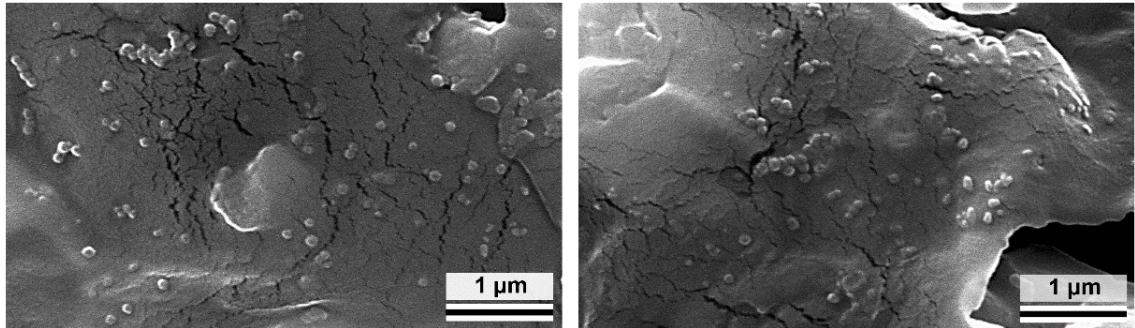
Tüm deney gruplarından (K, B, BH50, BH100) belirli zaman noktalarında izole edilen eksozomların zeta potansiyellerinin belirlenmesi için +4 °C’de gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde edilen veriler Çizelge 3.3’te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Eksozomların ortalama zeta potansiyelleri

Deney grupları	Standart ortam			EMA maruziyeti	
	0. gün	3. gün	7. gün	3. gün	7. gün
Kontrol	-6,46 mV ± 2,61	-3,74 mV ± 3,48	-10,75 mV ± 4,28	-6,12 mV ± 6,32	-14,55 mV ± 7,12
B	-1,76 mV ± 0,71	-9,72 mV ± 6,83	-0,36 mV ± 0,12	0,87 mV ± 0,41	-5,72 mV ± 3,58
BH50	-21,9 mV ± 1,68	-223,16 mV ± 383,51	-1,457 mV ± 1,59	-7,82 mV ± 6	-9,41 mV ± 5,39
BH100	-36,6 mV ± 1,96	-36,6 mV ± 10,68	-7,50 mV ± 4,95	-15,94 mV ± 11,29	-0,50 mV ± 0,51

3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

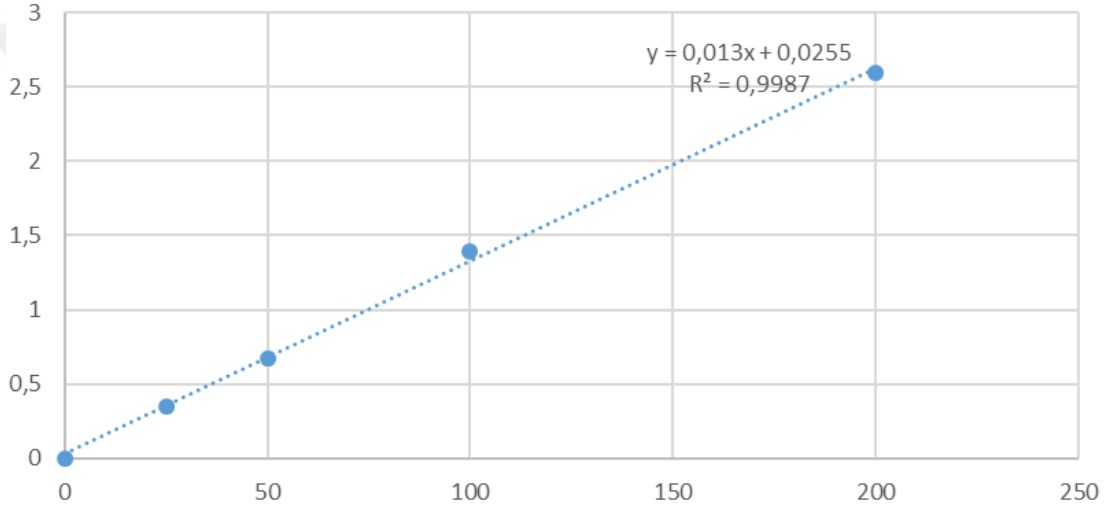
Eksozomların morfolojik özelliklerini değerlendirmek için taramalı elektron mikroskopisi kullanılmıştır. SEM analizi sonucunda, eksozomların küresel yapıda oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.32).



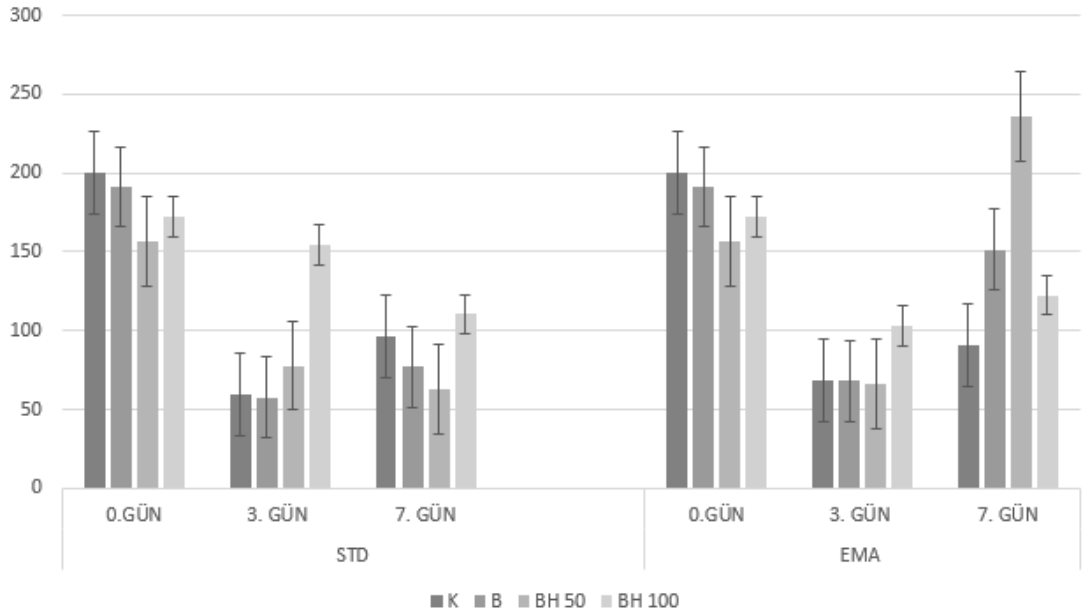
Şekil 3.32. Eksozomlara ait SEM görüntüleri

3.3.4. Eksozom Yüzey Belirteçlerinin Analizi (Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi)

CD9 ve CD63 yüzey belirteçlerinin varlığı ve miktarları, ELISA yöntemi ile 3 tekrarlı ölçümler ile belirlenmiştir. Tekrarlanan ölçümler arasında önemli bir fark gözlenmemiş olup, veriler aşağıdaki şekillerde paylaşılmıştır. 0. günden sonra yüzey belirteçlerinin miktarlarında genel bir azalma görülmüştür. 0. günde ifade edilen yüzey belirteci miktarlarını sadece 7. gün ve EMA maruziyetindeki BH50 grubunun yüzey belirteci ifadesi geçmiştir (Şekil 3.34).



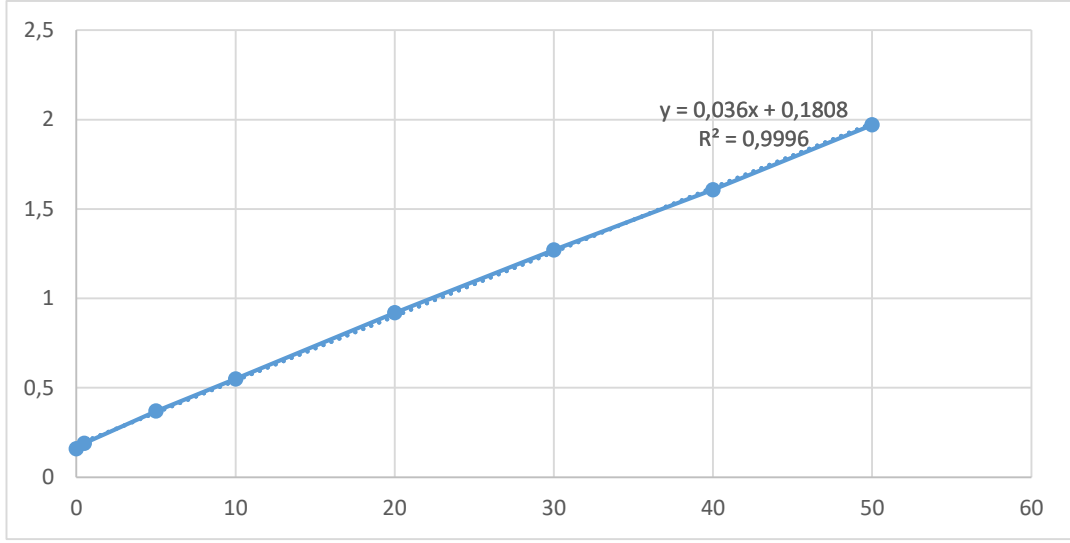
Şekil 3.33. Standart protein eğrisi



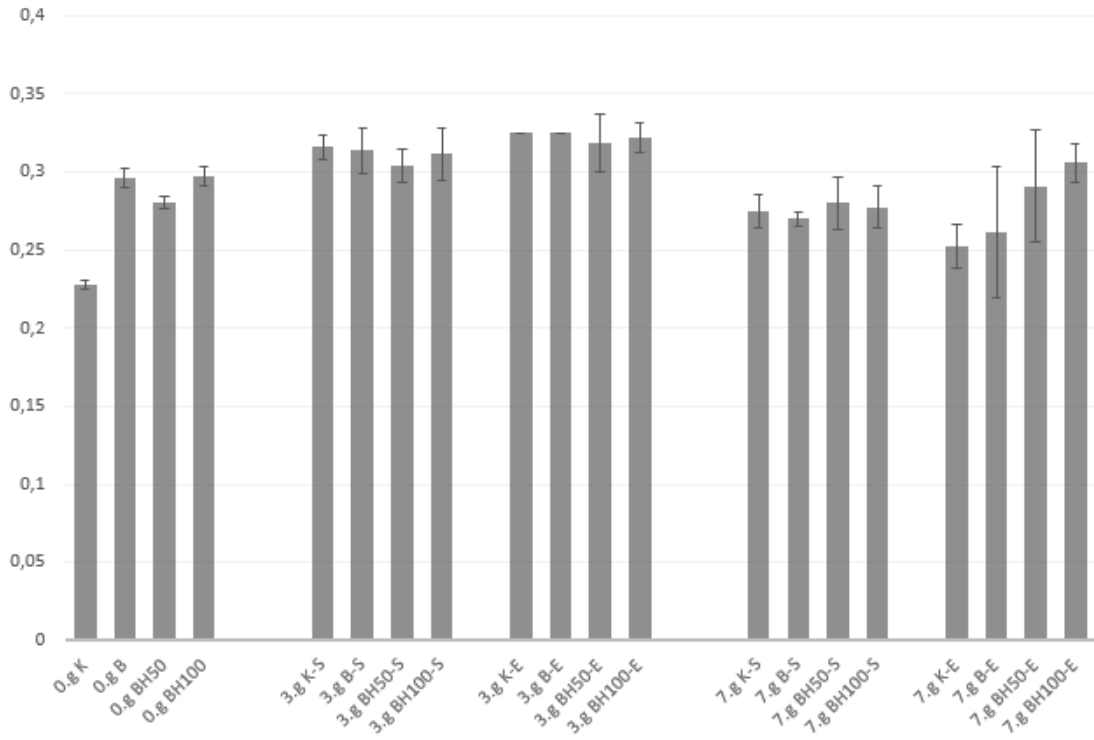
Şekil 3.34. Standart kültür ve EMA maruziyetinde 0., 3. ve 7. gün gruplarına ait CD9/CD63 ifadeleri

3.3.5. Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Farklı biyokompozit substrat yüzeylerde kültürü yapılan hücrelerden elde edilen ekstrasellüler veziküllerin toplam protein içeriklerinin belirlenmesi amacıyla proteinaz inhibitörü içeren lizis tamponu ile ekstraksiyon basamağı tamamlanan numuneler QuantiPro™ BCA tayin kiti (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılarak bikinkoninik (BCA) asit yöntemi ile tayin edilmiş ve spektrofotometrik ölçümlere dayalı elde edilen kantitatif bulgular Şekil 3.36'da görüldüğü gibi grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 3.35. Standart protein eğrisi



Şekil 3.36. Deney gruplarının 0., 3. ve 7. günlerdeki standart koşullar ve EMA maruziyetinde toplam protein içeriklerinin karşılaştırılması

Elde edilen bulgular, standart koşullar ve EMA maruziyetinde kültür edilen gruplardan 3. gündeki örneklerin toplam protein içeriklerinin diğer gün ve gruplar ile karşılaştırıldığında bir miktar daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir.



4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında farklı biyokompozit substrat yüzeyler üzerinde kültürü yapılan insan adipoz mezenkimal kök hücrelerin standart şartlar altında ve EMA etkisi altındaki kültürlerinde gerçekleşen ekstrasellüler vezikül oluşumu ve bu veziküllerin içeriğindeki etkileri araştırılmıştır. Deneyler, B, BH50, BH100 olmak üzere üç farklı biyokompozit substrat yüzey üzerinde gelişen hücreler ile, standart plastik kültür kaplarında gelişen hücreler ile oluşturulan kontrol grubu beraberinde karşılaştırmalı olarak yürütülmüştür. Çalışmada, farklı biyokimyasal bileşimde ve yüzey özelliklerine sahip substratların etkisinin yanısıra, düşük frekanslı darbeleri elektromanyetik alanın olası mekanotransdüktif etkileri incelenmiştir. Farklı yüzey kaplamaları ve farklı koşullar ile oluşturulan deney gruplarının ürettikleri ekstrasellüler vezikül miktarları ve içerikleri karşılaştırılmış ve çeşitli analizler ile değerlendirilmiştir.

Bu tezde kullanılmak üzere kemik hücre dışı matriks eldesi ile ilgili yöntemler geliştirilerek kullanılmıştır (Emami ve ark., 2021). Yüksek verimli kHDM eldesi için HCl ile deselülerizasyon yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Biyokompozit substrat yüzeylerin oluşturulması için sıgır femur kemiğinden çıkarılmış süngerimsi kemik doku demineralizasyon işlemine tâbi tutularak kemik dokusunda doğal olarak bulunan minerallerin içerisinde gömülü kalan kemik hücrelerinin açığa çıkması sağlanmış ardından da deselülerizasyon işlemi ile hücreler uzaklaştırılarak kemik hücre dışı matriksi elde edilmiştir. Elde edilen kemik HDM liyofilizasyon işlemi ile jelasyon basamağı için işlenebilir duruma getirilmiş ve pepsin enzimi ile sindirilerek jelasyon sağlanmıştır. Sadece kemik HDM ile elde edilen jel formuna (B grubu), farklı oranlardaki hidroksiapatit mikropartiküllerin katkılanması ile kemik benzeri hidrojel grupları (BH50 ve BH100 grupları) oluşturulmuştur.

Gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları için kemik HDM kaynaklı hidrojel grupları UV ışın kaynağı kullanılarak sterilize edildikten sonra hücreler ile muamele için hazırlanmış ve hücrelerin biyomalzemeler ile etkileşimleri detaylı olarak incelenmiştir. Kültür deneylerinde mikrobiyal kontaminasyonlar ile karşılaşılması

olup bu sterilizasyon yönteminin kültür kabı yüzeyinde ince formda oluşturulan biyokompozit substrat kaplamaları için yeterli etkinlikte olduğu anlaşılmıştır.

Hazırlanan farklı bileşimlerdeki biyokompozit substrat yüzeylerinin morfolojik, kimyasal ve hücre çalışmalarına yönelik sitotoksosite analizleri ile karakterizasyonu yapılmıştır. Biyokompozit substrat yüzeylerin morfolojilerinin incelenmesi için taramalı elektron mikroskopisi (SEM), kimyasal bağ yapısı ile içeriklerinin belirlenmesi için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometrisi (FT-IR) ve *in vitro* sitotoksosite durumlarının belirlenmesi için hücre kültürlerinde indirekt yöntemeye dayalı MTT analizi yapılmıştır.

Taramalı elektron mikrografları, hazırlanan kemik HDM kaynaklı hidrojel biyomalzemenin uygulanan yüzeylere kaplanabildiğini ve hücre kültürü şartlarında yapısal olarak kararlı kalarak dağılmadığı belirlenmiştir. Hidroksiapatit mikropartikülleri ile katkılanan hidrojellerde hidroksiapatit dağılımının homojen olduğu, hücre tohumlanarak hazırlanan numunelerin mikrograflarında hücrelerin hidrojel ile bütünlük sağladığı, çoğalarak gelişim gösterebildiği izlenmiştir.

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometrisi analizinde kemik HDM için beklenen piklerin görüldüğü ve katkılanmış biyokompozit gruplarda hidroksiapatite ait piklerin literatüre uygun şekilde (Schliephake ve Scharnweber, 2008, Campos, Anselme ve Soares, 2012) izlenebildiği görülmüştür.

In vitro sitotoksosite analizleri sonucunda hücre kültürü çalışmaları için eşik değer olarak kabul edilen % 60 oranının çok üzerinde hücre canlılığı ölçülmüş ve böylece geliştirilen substratların sitotoksik etkilerinin bulunmadığı teyit edilmiştir. Uygulanan prosedürün, bu konuda yapılmış daha önceki çalışmalar ile örtüştüğü görülmektedir (Sawkins ve ark., 2013).

Bu tez kapsamında kullanılan mezenkimal kök hücre tipi olan adipoz mezenkimal kök hücrelerin (AMKH) kullanılma sebebi, diğer çoğu hücre tipine göre daha yüksek miktarlarda ve görece olarak kolay elde edilebilen, büyük miktarlarda kültürü yapılabilen, proliferasyon hızı yüksek olan hücreler olmasıdır (Zuk ve ark., 2002, Peng ve ark., 2008). Hücre kaynağına bağlı farklılıklar bulunması olasılığı gözönüne

alınarak, hücre hatlarından oluşan ve P6-P10 arasındaki pasajlardan elde edilen karma hücre havuzu oluşturularak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Mezenkimal kök hücreler, farklılaşma koşullarında çeşitli hücre soylarına dönüşebilmektedirler (Gimble ve Guilak, 2003). Tez çalışmasında kullanılan hücrelerin hedeflenen hücre soylarına farklılaşabildikleri histolojik boyamalar ile gösterilmiştir. Mikroskopik incelemeler ve yine histolojik boyamalar ile kültürlerde kullanılan hücrelerin CFU-f oluşturabildikleri gözlenmiş ve CFU-f oluşturma frekansları hesaplanmıştır. Bunlara ek olarak, kullanılan hücre grubunun ifade ettiği yüzey antijenleri akan hücre ölçer yöntemi ile saptanmıştır. Bu hücrelerin karakteristik özellikleri, ISCT'nin belirlemiş olduğu mezenkimal kök hücre olma kriterleri olan CFU-f oluşturma, belirli yüzey antijenlerinin ifadesi ve farklı soylara dönüşebilme başlıkları altında incelenmiş ve literatür ile uyumlu oldukları belirlenmiştir (Dominici ve ark., 2006).

Farklı hastalıkların tedavisi için manyetizma ve mıknatısların kullanımı manyetik alan tedavisi teriminin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Manyetik alan tedavisinin ilk kullanımının İsviçreli hekim olan Paracelsius tarafından gerçekleştirildiği ve 1500'lü yıllara dayandığı bilinmektedir. Paracelsius manyetik alan tedavisinin, vücut fonksiyonlarını düzenleyebileceğini, yara iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceğini ve epilepsi, diare, hemoraji gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini ileri sürmüştür (Kirsch ve Smith, 2004). İlerleyen dönemlerde manyetik alan tedavisi birçok farklı hastalıkların/rahatsızlıkların tedavisine yönelik olarak uygulanmıştır. Bu rahatsızlıkların başlıcaları zehirlenmeler, artritler, alopesi ve gut hastalığıdır. İkinci Dünya Savaşı sonrasında Japonlar tarafından manyetik alan tedavisi klinikte kullanılmaya başlanmış ve sonrasında hızla Avrupa'ya yayılmıştır (Ramey, 1998, Markov, 2007).

1970'lerde Albert Roy Davis; pozitif-negatif yüklerin canlılar üzerindeki etkilerini araştırmış ve manyetik alan tedavisinin hayvanlarda kanser, kısırlık, glokom gibi farklı hastalıkları tedavi edebildiğini savunmuştur.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, kaynamayan kırıkların iyileştirilmesinde düşük frekanslı akım tedavisinin kullanılabilirliği onaylanmış (Bassett, ve ark., 1974, Bassett ve ark., 1977), ardından geçen 10 yıl içinde de yumuşak

doku hasarlarında manyetik alan tedavilerinin kullanılabilirliği kabul edilmeye başlamıştır (Ramey, 1998, Kirsch ve Smith, 2004, Markov, 2007).

Bu çalışmada hazırlanan farklı biyokompozit substrat yüzeyler üzerinde, farklı Şartlandırma etkilerinin temin edilmesi amacıyla düşük frekanslı-darbeli elektromanyetik alan maruziyeti kullanılmıştır. Çalışmamız için düşük frekanslı-darbeli elektromanyetik alan uygulaması, 1,3 mT'lik bir manyetik akı yoğunluğunda ve 15 Hz'de bir patlama frekansı (5 ms-uzun puls patlamaları) olacak Şekilde literatür ile bağ kurularak oluşturulmuştur (Diniz ve ark., 2002, Zhang ve ark., 2006, Parmaksiz ve ark., 2021). Farklı yüzey kaplamalarına ek olarak hidrojel kullanılmayan kontrol grubunun da dahil edildiği deney grupları (kontrol, B, BH50, BH100) kültür süresi boyunca devamlı olarak, düşük frekanslı-darbeli elektromanyetik alana maruz bırakılmıştır.

Düşük frekanslı-darbeli elektromanyetik alan maruziyetinin, belirli hücre gruplarında hücre proliferasyonunu (Diniz ve ark., 2002, Sun ve ark., 2009), mineralleşmeyi, hücre yoğunluğunu arttırdığı ve hücre bölünmesini tetiklediği (Esposito ve ark., 2013) bildirilmiş olmasına karşın, farklı çalışmalarda kalsiyum fosfat kaplı yüzeylerde kültürü yapılan osteoblast benzeri hücrelerde hücre sayısını azalttığı (Schwartz ve ark., 2009) ve kök hücrelerin proliferasyon hızını azalttığı da (Chang ve ark., 2006, Yan ve ark., 2010, Cho ve ark., 2012) bildirilmiştir.

Çalışmamız kapsamında kullanılan jel formundaki substrat kaplamalar (B, BH50, BH100) zerine tohumlanan insan kaynaklı adipoz mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon ve canlılık düzeyleri her iki koşuldaki kültürler (standart koşul/ düşük frekanslı- darbeli elektromanyetik alan maruziyeti) için 0., 1., 3. ve 7. günlerde Alamar Blue™ testi kullanılarak izlenmiştir. Elde edilen bulgular incelendiğinde, her iki koşuldaki kültürlerde bulunan 3 grupta da kültür süresine bağlı olarak canlılık ve proliferasyon oranında 1. günden itibaren bir miktar azalma sonrası kültürün 7. gününe geldiğinde maksimum seviyeye ulaştığı görülmektedir. Sonuç olarak, tez çalışmasında kullanılan farklı biyokompozit substrat yüzeylerde kültürlenen hücrelere uygulanan düşük frekanslı- darbeli elektromanyetik alan maruziyetinin, hücre canlılığı ve proliferasyonunda kritik değerlerde olumsuz etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Eksozomlar; salındıkları hücre kaynağına ve hücrenin bulunduğu koşullara göre, içerikleri ve fonksiyonları farklılık gösterebilen, spesifik proteinler, mRNA'lar, miRNA'lar, lipitler ve metabolitlerden oluşan endositik kökenli ekstrasellüler veziküllerdir (Wai ve ark., 2003, Subra ve ark., 2007, Simpson ve ark., 2008, Mayr ve ark., 2009, Raimondo ve ark., 2011, Bellingham ve ark., 2012, de Jong ve ark., 2012, Duprethuy ve ark., 2013, Choi ve ark., 2014). Eksozomlar; kan (Caby ve ark., 2005), idrar (Pisitkun ve ark., 2004), tükürük (Ogawa ve ark., 2011), amniyotik sıvı (Asea ve ark., 2008), beyin omurilik sıvısı (Vella ve ark., 2007), safra (Masyuk ve ark., 2010), sinoviyal sıvılar, nazal salgılar, anne sütü (Admyre ve ark., 2007), serum, plazma gibi tüm vücut sıvılarında bulunmaktadır (Raposo ve ark., 2013). Eksozomların; hücreler arası iletişimde çok yönlü rollerinin olması (Lee ve ark., 2008, Cocucci ve ark., 2009, Simons ve Raposo, 2009, They ve ark., 2009), bu iletişimin evrimsel olarak korunan bir yapı olması (Lee ve ark., 2008,2009, Deatherage ve Cookson, 2012), çeşitli hastalıkların tanı ve teşhisi için kullanılabilir biyobelirteçler için zengin bir kaynak olması (Shedden ve ark., 2003, Chaput ve ark., 2005, Simpson ve ark., 2009, Choi ve ark., 2013, D'Souza-Schorey ve Clancy, 2012, Mullier ve ark., 2013, Sarlon-Bartoli ve ark., 2013), düşük immün yanıt oluşturma ihtimallerinin yanı sıra yüksek stabilite ile doğal nanopartikül olmaları ve aşı, kemoterapötik ilaç salımı gibi çeşitli terapötik yaklaşımlar için potansiyellerinin olması (Chaput ve ark., 2005, Simpson ve ark., 2009, Sun ve ark., 2010, Lai ve ark., 2010, Alvarez-Erviti ve ark., 2011, Lee ve ark., 2012, Jang ve ark., 2013, Kordelas ve ark., 2014) bakımlarından son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Artan ilgi ile birlikte eksozomların yeterli miktarda izole edilebilmeleri, biyolojik özelliklerinin anlaşılması, çeşitli izolasyon yöntemlerinin geliştirilmesi, elde edilen ürünün saflığı ve kalitesi ile ilgili önemli verilerin elde edilmesine yönelik çalışmalar hız ve önem kazanmıştır.

Farklı koşullarda ve kültür yüzeylerinde EV oluşumunu inceleme aşamasında ISEV'in 2018 tarihli çalıştay raporundan faydalanılmıştır. Bu tez çalışmaları Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Doku Mühendisliği, Biyomalzemeler ve Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı'nda (DMBNL) yapılmış ve oluşan biyokompozit kaplama materyallerinin hücre etkileşimleri ve temel karakterizasyonları tamamlanmıştır.

Farklı biyokompozit substrat yüzeyler (kontrol grubu, B, BH50, BH100) üzerine tohumlanan insan adipoz mezenkimal kök hücreler, standart kültür ve darbeli elektromanyetik alan maruziyeti ile iki farklı koşulda incelenmiştir. Hazırlanan hücre kültür gruplarının besiyerleri 0., 3. ve 7. günlerde toplanarak, ekstrasellüler veziküller izole edilmiştir.

EV izolasyonu için kullanılan çeşitli protokoller ve ticari kitler bulunmaktadır. İzolasyon metodu için tercih edilen protokol/ kit, araştırmanın ve elde edilen ürünlerin kullanım amacına yönelik özellikler göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Çalışmamızda, diğer protokol ve kitler ile (101Bio, Wako, iZON ve geleneksel ultrasantrifüj temelli yöntem) kıyaslandığında elde edilecek ürün veriminin yüksek olması (Patel ve ark., 2019), uygulanabilirliğinin imkanlarımıza uyması ve izolasyon için gerekli olan sürenin kısa olması gibi sebeplerle Invitrogen firmasının üretmiş olduğu çökeltme temelinde çalışan izolasyon kiti (Total Exosome Isolation, ABD) tercih edilmiştir. Kit, üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Elde edilen ekstrasellüler veziküller, analizler için kullanılmak üzere gerekli miktarlarda porsiyonlara ayrılmış ve önerilen depolama koşullarına uygun şekilde saklanmıştır.

İzole edilen ekstrasellüler veziküller, boyutları, yüzey yükleri, morfolojik özellikleri ve yüzey belirteçleri incelenerek karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Ekstrasellüler veziküllerin boyut incelemeleri zeta ölçer cihazı ile, yüzey yükleri ve kolloidal kararlılıkları zeta potansiyel ölçümü ile, morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile, yüzey belirteçlerinin varlığı ise enzim bağımlı immünosorbent analizi [ELISA, (CD 9 / CD 63)] ile değerlendirilmiştir.

Ekstrasellüler veziküller içerisinde yer alan eksozomların boyutları literatürde 30-150 nm aralığında kabul edilmektedir (Lobb ve ark., 2015), fakat kullanmayı tercih ettiğimiz izolasyon kiti ile elde edilen eksozomlar kabul edilen boyut aralığı dışında sonuçlar vermektedir ve Total eksozom izolasyon kiti ile daha geniş bir boyut dağılımı ($182 \pm 13,92$ nm) elde edeceğimiz belirtilmiştir (Patel ve ark., 2019). Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz partiküllerin boyut analizinin literatürde verilen sonuçlar ile örtüştüğü ve kabul edilen boyut aralığından daha geniş bir boyut dağılımı gösterdikleri belirlenmiştir.

Ekstrasellüler veziküller fizyolojik şartlarda net negatif yüzey yüküne sahiptirler (Beit-Yannai ve ark., 2018). Tez çalışmasında, ekstrasellüler veziküllerin yüzey yüklerinin belirlenmesi ve koloidal kararlılıklarının anlaşılması için zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. İzolasyon için tercih edilen metodolojiye göre farklılık gösteren bir diğer değişken ise zeta potansiyelidir. Eksozomal preparatlardan elde edilen zeta potansiyelleri ortalama negatif yüzey yükü ($\sim -6,3/-34,3$ mV) (Soares Martins ve ark., 2018) gösterirken kullanmayı tercih ettiğimiz izolasyon kiti ile elde edilen ürün en az negatif yüzey yükünü ($\sim -2,82$ mV) göstermektedir (Patel ve ark., 2019). Partiküllerin zeta potansiyeli analizleri sonucunda elde ettiğimiz veriler daha az negatif yüzey yükü göstermek suretiyle literatürle örtüşmektedir.

Elde edilen eksozomların, morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla SEM görüntülemeleri yapılmıştır. Elde edilen SEM mikrograflarında, eksozomların beklenildiği gibi küresel şekle sahip oldukları (Wu ve ark., 2015) ve yüzeylerinin düzgün yapıda olduğu belirlenmiştir.

Farklı biyokompozit substrat yüzeylerde geliştirilen hücrelere uygulanan düşük frekanslı- darbeli elektromanyetik alan maruziyeti sonucunda elde edilen nanometre boyutlarındaki veziküllerin karakterizasyonu için yapılan bir başka analiz de yüzey belirteçlerinin varlığı ve bu belirteçlerin ne ölçüde ifade edildiğinin belirlenmesidir. Eksozomlar için spesifik yüzey belirteçleri olarak CD 9, CD 63 ve CD 81 bilinmektedir (Jeppesen ve ark., 2019). Çalışmamız kapsamında bu yüzey belirteçleri içerisinde CD 9 ve CD 63'un mevcudiyetinin ve ne derecede ifade edildiğinin anlaşılması için enzim bağımlı immünosorbent analizi (ELISA, (CD 9 / CD 63)) yapılmıştır. Analiz sonucunda farklı yüzey kaplamaları ve farklı koşullarda kültür edilen hücrelerden elde edilen veziküllerin eksozomlara özgü yüzey belirteçlerini ifade ettiği gözlenmiştir. Deney grupları içerisinde bu belirteçlerin en güçlü ifade edildiği grubun ise düşük frekanslı – darbeli elektromanyetik alan maruziyetinde ve BH50 grubu yüzey kaplaması üzerinde gelişimleri gerçekleştirilen hücrelerden elde edilen veziküller olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, biyokompozit substrat yüzeylerden BH50 grubuna uygulanan, düşük frekanslı–darbeli elektromanyetik alan maruziyeti sonucunda *in vitro* şartlarda elde edilen ekstrasellüler

veziküllerin eksozomlara özgü yüzey belirteçlerini daha çok ifade etmiş olmalarına rağmen bu veziküllerin içeriklerinin belirlenerek değerlendirilmesi amacıyla daha çok analize ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Ekstrasellüler veziküllerin homojen bir şekilde yüksek miktarlarda izolasyonunun gerçekleştirilmesi ise prelinik çalışmalar ve hüresiz hüresel tedavilerin uygulanabilir hale gelmesi için zorunlu bir basamaktır. Farklı koşullar uygulanan ve farklı biyokompozit substrat yüzeylerden elde edilen veziküllerin doku mühendisliği ve yenileyici tıptaki yeni yaklaşımların önünü açması da gelecekte beklenebilecektir.



ÖZET

Biyokompozit Substratlarda Kültürün Mezenkimal Kök Hücre-Kaynaklı Ekstrasellüler Veziküllere Olan Etkilerinin İncelenmesi

Bu çalışmada, ilk önce kemik hücre dışı matriksi (K-HDM) kaynaklı hidrojeller ile biyokompozit substrat yüzeyler hazırlanmıştır. K-HDM, sığır femur kemiğinden elde edilen spongiyöz dokunun deselülerizasyonu ile elde edilmiş ve liyofilizasyon ile işlenebilir hale getirilmiştir. Bundan sonra, asidik pepsin çözeltisinde gerçekleştirilen sindirme işlemi sonrasında çözelti nötralleştirilerek pH değeri 7,4 olarak ayarlanmıştır. Fizyolojik sıcaklıkta jelasyon davranışı gösteren hidrojelin, farklı oranlarda [%50 ve %100; (a:a)] hidroksiapatit ile katkılanmak suretiyle biyokompozitleri (BH50 ve BH100) oluşturulmuştur.

Elde edilen hidrojellerin fizikokimyasal karakterizasyonu basamağında, SEM analizleri ile yüzey morfolojileri, FT-IR analizleri ile fonksiyonel grupları ve kimyasal bağ bilgileri elde edilmiştir. Biyokompozit substratların *in vitro* sitotoksosite özelliği, ISO 10993-5 indirekt yöntemine dayalı MTT analizi ile belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları, insan adipoz mezenkimal kök hücreleri (iAMKH'leri) ile yürütülmüştür. iAMKH'lerin karakterizasyonu, invert mikroskopik incelemeler, immüfenotiplendirme, farklılaşma çalışmaları ve CFU-f oluşturma yeteneğinin incelenmesine dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler biyokompozit substratlar üzerine ekildikten sonra, standart koşullar altında ve şartlandırma etkisi amacıyla düşük frekanslı darbeleri elektromanyetik alan (EMA) maruziyetinde kültürleri sürdürülmüştür. *In vitro* hücre canlılığı ve proliferasyon durumu, mitokondriyel dehidrojenaz aktivitesine dayalı Alamar mavisi yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Farklı substrat yüzeyler üzerinde ve farklı koşullar altındaki sürdürülen hücre kültürlerinin besiyerleri toplanarak ekstrasellüler veziküller (EV'ler) izole edilmiştir. İzole edilen EV'lerin, zetasizer parçacık boyut dağılımları ve zeta potansiyelleri belirlenmiş, SEM analizi ile morfolojileri incelenmiştir. Bunların yanısıra, spesifik yüzey belirteçlerinin varlığı ELISA yöntemi ile, toplam protein içerikleri ise bikinkoninik asit (BCA) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, farklı bileşim ve özelliklere sahip substrat yüzeylerin ve EMA maruziyetinin, iAMKH'lerin EV içeriği üzerinde etkilere yol açtığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: kHDM, biyokompozit substrat, adipoz mezenkimal kök hücre, düşük frekanslı elektromanyetik alan, ekstrasellüler vezikül, eksozom

SUMMARY

Evaluation Of The Influence Of Culture On Biocomposite Substrates On Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles

In this study, firstly, biocomposite substrate surfaces were prepared using bone extracellular matrix (bECM)-derived hydrogels. bECM was obtained by decellularization of the cancellous tissue of the bovine femur and rendered workable by lyophilization. The product was digested in acidic pepsin, then neutralized and the pH value was adjusted to 7.4. This hydrogel, which shows gelling behavior at physiological temperature, was blended with different ratios of hydroxyapatite [50% and 100%; (w:w)] to obtain BH50 and BH100 biocomposites.

For the physicochemical characterization of the obtained hydrogels, surface morphology was investigated by SEM analysis, and functional groups and chemical bond information were obtained by FT-IR analysis. *In vitro* cytotoxicity of biocomposite substrates was determined by an indirect MTT method based on ISO 10993-5. Cell culture studies were conducted with human adipose mesenchymal stem cells (hAMSCs). hAMSCs were characterized by inverted microscopy, immunophenotyping, differentiation studies and the ability to generate CFU-f. After the cells were seeded on biocomposite substrates, they were cultured under standard conditions and under exposure to a low frequency pulsed electromagnetic field (EMF) for creating a mechano-transductive conditioning effect. *In vitro* viability and proliferation status of cells were examined using Alamar blue method based on mitochondrial dehydrogenase activity.

Extracellular vesicles (EVs) were isolated by collecting the media of cell cultures maintained on different substrates and under different conditions. Zetasizer particle size distributions and zeta potentials of isolated EVs were determined and their morphology was examined by SEM analysis. In addition, the presence of specific surface markers was determined by ELISA, and the total protein contents were determined using the bicinchoninic acid (BCA) method. The findings obtained in the study support the notion that substrate surfaces with different composition and properties, and EMF exposure cause effects on the EV content of hAMSCs.

Keywords: bECM, biocomposite substrate, adipose mesenchymal stem cell, low frequency electromagnetic field, extracellular vesicle, exosome

5. KAYNAKLAR

- AALBERTS, M, VAN DÏSSEL-EMİLİANİ, F. M, VAN ADRIÇHEM, N. P, VAN WÏJNEN, M, WAUBEN, M. H, STOUT, T. A, & STOOVVOGEL, W. (2012). Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. *Biology of reproduction*, **86**(3), 82-1.
- AARDEN, E. M, NÏJWEÏDE, P. J, & BURGER, E. H. (1994). Function of osteocytes in bone. *Journal of cellular biochemistry*, **55**(3), 287-299.
- ABELS, E. R., & BREAKFIELD, X. O. (2016). Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cellular and molecular neurobiology*, **36**(3), 301-312.
- ADMYRE, C, JOHANSSON, S. M, QAZÏ, K. R, FÏLÉN, J. J, LAHESMAA, R, NORMAN, M, & GABRIELSSON, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *The Journal of immunology*, **179**(3), 1969-1978.
- AGRAHARÏ, V, AGRAHARÏ, V, BURNOUF, P. A, CHEW, C. H, & BURNOUF, T. (2019). Extracellular microvesicles as new industrial therapeutic frontiers. *Trends in biotechnology*, **37**(7), 707-729.
- ALBUQUERQUE, P. C., NAKAYASU, E. S., RODRÏGUES, M. L., FRASES, S., CASADEVALL, A., ZANCOPE-OLÏVEÏRA, R. M., & NOSANCHUK, J. D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cellular microbiology*, **10**(8), 1695-1710.
- AN, Q., VAN BEL, A. J., & HÏCKELHOVEN, R. (2007). Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies?. *Plant signaling & behavior*, **2**(1), 4-7.
- ANDALOUSSÏ, S. E, MÄGER, I, BREAKFIELD, X. O, & WOOD, M. J. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, **12**(5), 347-357.
- ANDERSEN, T. L, SONDERGAARD, T. E, SKORZYNSKA, K. E, DAGNAES-HANSEN, F, PLESNER, T. L, HAUGE, E. M, ... & DELAÏSSE, J. M. (2009). A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *The American journal of pathology*, **174**(1), 239-247.
- ANNAZ, B, HÏNG, K. A, KAYSER, M, BUCKLAND, T, & DÏ SÏLVÏO, L. (2004). An ultrastructural study of cellular response to variation in porosity in phase-pure hydroxyapatite. *Journal of microscopy*, **216**(2), 97-109.
- APER, R. L, SALTZMAN, C. L, & BROWN, T. D. (1996). The effect of hallux sesamoid excision on the flexor hallucis longus moment arm. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, **325**, 209-217.
- ASEA, A, JEAN-PIERRE, C, KAUR, P, RAO, P, LÏNHARES, I. M, SKUPSKÏ, D, & WÏTKÏN, S. S. (2008). Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *Journal of reproductive immunology*, **79**(1), 12-17.

- AUBIN, J. E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **2**(1), 81-94.
- BAHNEY, C. S, ZONDERVAN, R. L, ALLISON, P, THEOLOGIS, A, ASHLEY, J. W, AHN, J, ... & HANKENSON, K. D. (2019). Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research®*, **37**(1), 35-50.
- BANCROFT, J. D, & GAMBLE, M. (Eds). (2008). *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier health sciences.
- BARON, R. (2003). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. *General Principles of Bone Biology*, 1-8.
- BARRÈRE, F, VAN BLITTERSWIJK, C. A, & DE GROOT, K. (2006). Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International journal of nanomedicine*, **1**(3), 317.
- BASSETT, C. A, PILLA, A. A, & PAWLUK, R. J. (1977). A non-operative salvage of surgically-resistant pseudarthroses and non-unions by pulsing electromagnetic fields. A preliminary report. *Clinical orthopaedics and related research*, **124**, 128-143.
- BASSETT, C. A. L, PAWLUK, R. J, & PILLA, A. A. (1974). Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields. A surgically noninvasive method. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **238**(1), 242-262.
- BEÏT-YANNAÏ, E, TABAK, S, & STAMER, W. D. (2018). Physical exosome: exosome interactions. *Journal of cellular and molecular medicine*, **22**(3), 2001-2006.
- BELLINGHAM, S. A, COLEMAN, B. M, & HILL, A. F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic acids research*, **40**(21), 10937-10949.
- BERMAN JD, STRAUS SE. Implementing a research agenda for complementary and alternative medicine. *Annu Rev Med*. 2004;**55**:239-54.
- BEYAZOVA, M, & KUTSAL, Y. G. (Eds). (2016). *Fiziksel tıp ve rehabilitasyon. Güneş Tıp Kitabevleri*.
- BIANCONE, L, BRUNO, S, DEREGİBUS, M. C, TETTA, C, & CAMUSSI, G. (2012). Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **27**(8), 3037-3042.
- BLANC, L, & VIDAL, M. (2018). New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases*, **9**(1-2), 95-106.
- BLAND, Y. S, & ASHURST, D. E. (1997). Fetal and postnatal development of the patella, patellar tendon and suprapatella in the rabbit; changes in the distribution of the fibrillar collagens. *Journal of Anatomy*, **190**(3), 327-342.
- BORGES, F. T, REIS, L. A, & SCHOR, N. (2013). Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **46**(10), 824-830.

- BOSKEY, A. L, & POSNER, A. S. (1984). Bone structure, composition, and mineralization. *The Orthopedic clinics of North America*, **15**(4), 597-612.
- BRUNO, S, GRANGE, C, DEREGIBUS, M. C, CALOGERO, R. A, SAVIOZZI, S, COLLINO, F, ... & CAMUSSI, G. (2009). Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, **20**(5), 1053-1067.
- BUCKWALTER, J. A, GLIMCHER, M. J, COOPER, R. R, & RECKER, R. (1995). Bone biology. *J Bone Joint Surg Am*, **77**(8), 1256-1275.
- CABY, M. P, LANKAR, D, VINCENDEAU-SCHERRER, C, RAPOSO, G, & BONNEROT, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*, **17**(7), 879-887.
- CAMPLEJOHN, K. L, ALLARD, S. A. (1988). Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry*, **89**(2), 185-188.
- CAMPOS, D. M., ANSELME, K., & SOARES, G. D. D. A. (2012). In vitro biological evaluation of 3-D hydroxyapatite/collagen (50/50 wt.(%)) scaffolds. *Materials Research*, **15**(1), 151-158.
- CHANG, K., CHANG, W. H. S., TSAI, M. T., & SHIH, C. (2006). Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. *Connective tissue research*, **47**(4), 222-228.
- CHAPLIN, A. J. (1985). *Manual of histological techniques*. JD Bancroft and HC Cook. Churchill
- CHEKANOVA, J. A, GREGORY, B. D, REVERDATTO, S. V, CHEN, H, KUMAR, R, HOOKER, T, ... & BELOSTOTSKY, D. A. (2007). Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the Arabidopsis transcriptome. *Cell*, **131**(7), 1340-1353.
- CHO, H., SEO, Y. K., YOON, H. H., KIM, S. C., KIM, S. M., SONG, K. Y., & PARK, J. K. (2012). Neural stimulation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by extremely low frequency electromagnetic fields. *Biotechnology progress*, **28**(5), 1329-1335.
- CHRISTODOULOU, C, SPENCER, J. A, YEH, S. C. A, TURCOTTE, R, KOKKALIARIS, K. D, PANERO, R, & CAMARGO, F. D. (2020). Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells. *Nature*, **578**(7794), 278-283.
- COCUCCI, E., & MELDOLESÍ, J. (2011). Ectosomes. *Current Biology*, **21**(23), R940-R941.
- COLOMBO, M, & MOITA, C. (2013). van NG, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, vd.. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*, **126**(Pt 24), 5553-65.

- COLOMBO, M, RAPOSO, G, & THÉRY, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, **30**, 255-289.
- COOPER, K. L, OH, S, SUNG, Y, DASARÍ, R. R, KIRSCHNER, M. W, & TABÍN, C. J. (2013). Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature*, **495**(7441), 375-378.
- COOPER, R. R, MILGRAM, J. W, & ROBINSON, R. A. (1966). Morphology of the osteon: an electron microscopic study. *JBJS*, **48**(7), 1239-1271.
- COWIN, S. C. (2001). *Bone mechanics handbook*. CRC press.
- DATTA, H. K, NG, W. F, WALKER, J. A, TUCK, S. P, & VARANASÍ, S. S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical pathology*, **61**(5), 577-587.
- DEMİR, A. K, ELÇİN, A. E, ELÇİN, Y. M. (2018). Osteogenic differentiation of encapsulated rat mesenchymal stem cells inside a rotating microgravity bioreactor: in vitro and in vivo evaluation. *Cytotechnology*, **70**(5), 1375-1388.
- DEVHARE, P. B, & RAY, R. B. (2018). Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Molecular aspects of medicine*, **60**, 115-122.
- DÍAZ-FLORES, L. U. C. I. O, GUTIÉRREZ, R. I. C. A. R. D. O, LOPEZ-ALONSO, A, GONZALEZ, R, & VARELA, H. (1992). Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clinical orthopaedics and related research*, (275), 280-286.
- DÌNG, M, WANG, C, LU, X, ZHANG, C, ZHOU, Z, CHEN, X, & ZHANG, C. (2018). Comparison of commercial exosome isolation kits for circulating exosomal microRNA profiling. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **410**(16), 3805-3814.
- DÌNÍZ, P., SHOMURA, K., SOEJÍMA, K., & ITO, G. (2002). Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*, **23**(5), 398-405.
- DOMÍNÍCÍ, M. L. B. K., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARÍNÍ, F. C., KRAUSE, D. S., & HORWÍTZ, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8**(4), 315-317.
- DONAHUE, H. J, MCLEOD, K. J, RUBÍN, C. T, ANDERSEN, J, GRÍNE, E. A, HERTZBERG, E. L, & BRÍNK, P. R. (1995). Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: Cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *Journal of bone and mineral research*, **10**(6), 881-889.

- DOWNEY, P. A., & SIEGEL, M. I. (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical therapy*, **86**(1), 77-91.
- DOYLE, L. M., & WANG, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, **8**(7), 727.
- DWEK, J. R. (2010). The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence?. *Skeletal radiology*, **39**(4), 319-323.
- EGEA-JIMENEZ, A. L., & ZIMMERMANN, P. (2018). Thematic Review Series: Exosomes and Microvesicles: Lipids as Key Components of their Biogenesis and Functions: Phospholipase D and phosphatidic acid in the biogenesis and cargo loading of extracellular vesicles. *Journal of Lipid Research*, **59**(9), 1554.
- EMAMI, A., TALAEI-KHOZANI, T., VOJDANI, Z., & ZAREI FARD, N. (2021). Comparative assessment of the efficiency of various decellularization agents for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **109**(1), 19-32.
- EMİN, N., KOÇ, A., DURKUT, S., ELÇİN, A. E., ELÇİN, Y. M. (2008). Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: Effects of TGF- β 1 and microgravity bioreactor culture. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*, **36**(2), 123-137.
- ESCOLA, J. M., KLEIJMEER, M. J., STOORVOGEL, W., GRIFFITH, J. M., YOSHIE, O., & GEUZE, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(32), 20121-20127.
- ESCREVENTE, C., KELLER, S., ALTEVOGT, P., & COSTA, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC cancer*, **11**(1), 1-10.
- ESPOSITO, M., LUCARIELLO, A., COSTANZO, C., FIUMARELLA, A., GIANNINI, A., RICCARDI, G., & RICCIO, I. (2013). Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs, into chondrogenic cells in the presence of pulsed electromagnetic fields. *In Vivo*, **27**(4), 495-500.
- EVERTS, V., DELAÏSSE, J. M., KORPER, W., JANSEN, D. C., TIGCHELAAR-GUTTER, W., SAFTIG, P., & BEERTSEN, W. (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, **17**(1), 77-90.
- FADER, C. M., SÁNCHEZ, D. G., MESTRE, M. B., & COLOMBO, M. I. (2009). 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*, **1793**(12), 1901-1916.
- FLORENCIO-SILVA, R., SASSO, G. R. D. S., SASSO-CERRI, E., SIMÕES, M. J., & CERRI, P. S. (2015). *Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells*. BioMed research international, 2015.

- FORDJOUR, F. K, DAABOUL, G. G, & GOULD, S. J. (2019). A shared pathway of exosome biogenesis operates at plasma and endosome membranes. *BioRxiv*, 545228.
- FRANZ-ODENDAAL, T. A, HALL, B. K, & WITTEN, P. E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **235**(1), 176-190.
- FRÜHBEIS, C, HELMIG, S, TUG, S, SIMON, P, & KRÄMER-ALBERS, E. M. (2015). Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *Journal of extracellular vesicles*, **4**(1), 28239.
- FUTTER, C. E, PEARSE, A, HEWLETT, L. J, & HOPKINS, C. R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *The Journal of cell biology*, **132**(6), 1011-1023.
- GANAPATHI, M, BOLES, N. C, CHARNIGA, C, LOTZ, S, CAMPBELL, M, TEMPLE, S, & MORSE, R. H. (2018). Effect of Bmi1 over-expression on gene expression in adult and embryonic murine neural stem cells. *Scientific reports*, **8**(1), 1-10.
- GANGODA, L, BOUKOURIS, S, LIEM, M, KALRA, H, & MATHIVANAN, S. (2015). Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic?. *Proteomics*, **15**(2-3), 260-271.
- GHOSSOUB, R, LEMBO, F, RUBIO, A, GAÏLLARD, C. B, BOUCHET, J, VITALE, N, & ZIMMERMANN, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nature communications*, **5**(1), 1-12.
- GIMBLE, J. M., & GUILAK, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytherapy*, **5**(5), 362-369.
- GRABOWSKI, P. (2015). Physiology of bone. *Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents*, **28**, 33-55.
- GROSS, J. C, CHAUDHARY, V, BARTSCHERER, K, & BOUTROS, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature cell biology*, **14**(10), 1036-1045.
- GUESCINI, M, GENEDANI, S, STOCCHI, V, & AGNATI, L. F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of neural transmission*, **117**(1), 1-4.
- HAGE, I. S, & HAMADE, R. F. (2017). Intracortical stiffness of mid-diaphysis femur bovine bone: lacunar–canalicular based homogenization numerical solutions and microhardness measurements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **28**(9), 1-14.
- HARDING, C, HEUSER, J, & STAHL, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, **97**(2), 329-339.

- HE, X, BOUGIOUKLÍ, S, ORTEGA, B, AREVALO, E, LIEBERMAN, J. R, & MCMAHON, A. P. (2017). Sox9 positive periosteal cells in fracture repair of the adult mammalian long bone. *Bone*, **103**, 12-19.
- HENDERSON, M. C, & AZORSA, D. O. (2012). The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. *Frontiers in oncology*, **2**, 38.
- HENNE, W. M, BUCHKOVICH, N. J, & EMR, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Developmental cell*, **21**(1), 77-91.
- HESSVIK, N. P, & LLORENTE, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **75**(2), 193-208.
- HICKFORD, F. H. (1997). Serum xanthine oxidase activity in dogs with ischaemic disorders: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Veterinary Science at Massey University (Doctoral dissertation, Massey University).
- HONG, P, YANG, H, WU, Y, LI, K, & TANG, Z. (2019). The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells: a comprehensive review. *Stem Cell Research & Therapy*, **10**(1), 1-12.
- HRISTOV, M, ERL, W, LINDER, S, & WEBER, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, **104**(9), 2761-2766.
- HSU, C, MOROHASHI, Y, YOSHIMURA, S. I, MANRIQUE-HOYOS, N, JUNG, S, LAUTERBACH, M. A, & SIMONS, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *Journal of Cell Biology*, **189**(2), 223-232.
- HYENNE, V, APAYDIN, A, RODRIGUEZ, D, SPIEGELHALTER, C, HOFF-YOESSLE, S, DIEM, M, & LABOUESSE, M. (2015). RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *Journal of Cell Biology*, **211**(1), 27-37.
- IBRAHIM, A, & MARBÁN, E. (2016). Exosomes: fundamental biology and roles in cardiovascular physiology. *Annual review of physiology*, **78**, 67-83.
- IBSIRLIOGLU, T, ELÇİN, A. E, ELÇİN, Y. M. (2020). Decellularized biological scaffold and stem cells from autologous human adipose tissue for cartilage tissue engineering. *Methods*, **171**, 97-107.
- JANAS, T., JANAS, M. M., SAPONÍ, K., & JANAS, T. (2015). Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS letters*, **589**(13), 1391-1398.
- JEPPESEN, D. K., FENIX, A. M., FRANKLIN, J. L., HIGGINBOTHAM, J. N., ZHANG, Q., ZIMMERMAN, L. J., & COFFEY, R. J. (2019). Reassessment of exosome composition. *Cell*, **177**(2), 428-445.
- KAHVECİ, Z, MİNBAY, F. Z, & CAVUSOGLU, I. (2000). Safranin O staining using a microwave oven. *Biotechnic & Histochemistry*, **75**(6), 264-268.

- KALLURÌ, R., & LEBLEU, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, **367**(6478).
- KAPUSTÌN, A. N., CHATROU, M. L., DROZDOV, I., ZHENG, Y., DAVIDSON, S. M., SOONG, D., & SHANAHAN, C. M. (2015). Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circulation research*, **116**(8), 1312-1323.
- KARTSOGIANNÌS, V., & NG, K. W. (2004). Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and cellular endocrinology*, **228**(1-2), 79-102.
- KEERTHÌKUMAR, S., CHÌSANGA, D., ARIYARATNE, D., AL SAFFAR, H., ANAND, S., ZHAO, K., & MATHIVANAN, S. (2016). ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of molecular biology*, **428**(4), 688-692.
- KÌRSCH, D., & SMÌTH, R. B. (2004). Cranial electrotherapy stimulation for anxiety, depression, insomnia, cognitive dysfunction, and pain. *Bioelectromagnetic medicine*, 727-740.
- KORKUT, C., ATAMAN, B., RAMACHANDRAN, P., ASHLEY, J., BARRÌA, R., GHERBESÌ, N., & BUDNÌK, V. (2009). Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell*, **139**(2), 393-404.
- KORMELÌNK, T. G., ARKESTEÌJN, G. J., VAN DE LEST, C. H., GEERTS, W. J., GOERDAYAL, S. S., ALTELAAR, M. A., & WAUBEN, M. H. (2016). Mast cell degranulation is accompanied by the release of a selective subset of extracellular vesicles that contain mast cell-specific proteases. *The Journal of Immunology*, **197**(8), 3382-3392.
- KOUREMBANAS, S. (2015). Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annual review of physiology*, **77**, 13-27.
- KRÌEBEL, P. W., BARR, V. A., RERÌCHA, E. C., ZHANG, G., & PARENT, C. A. (2008). Collective cell migration requires vesicular trafficking for chemoattractant delivery at the trailing edge. *The Journal of cell biology*, **183**(5), 949-961.
- LÁZARO-IBÁÑEZ, E., SANZ-GARCÌA, A., VÌSAKORPÌ, T., ESCOBEDO-LUCEA, C., SÌLJANDER, P., AYUSO-SACÌDO, Á., & YLÌPERTTULA, M. (2014). Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *The Prostate*, **74**(14), 1379-1390.
- LEA, J., SHARMA, R., YANG, F., ZHU, H., WARD, E. S., & SCHROÌT, A. J. (2017). Detection of phosphatidylserine-positive exosomes as a diagnostic marker for ovarian malignancies: a proof of concept study. *Oncotarget*, **8**(9), 14395.
- LÌ, N., SONG, J., ZHU, G., LÌ, X., LÌU, L., SHÌ, X., & WANG, Y. (2016). Periosteum tissue engineering—a review. *Biomaterials science*, **4**(11), 1554-1561.

- LÌ, P, KASLAN, M, LEE, S. H, YAO, J, & GAO, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, **7**(3), 789.
- LÌLLÌE, R. D, & ASHBURN, L. L. (1943). Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Arch Pathol*, **36**, 432-440.
- LÌLLÌE, R. D, & CONN, H. J. (1991). HJ Conn's biological stains. Sigma Chemical Co..
- LÌLLÌE, R. D, & LÌLLÌE, R. D. (1977). Quinone-imines dyes, azines. HJ Conn's biological stains, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Md, 376-392.
- LOBB, R. J., BECKER, M., WEN WEN, S., WONG, C. S., WÌEGMANS, A. P., LEÌMGRUBER, A., & MÖLLER, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of extracellular vesicles*, **4**(1), 27031.
- LOTVALL, J, & VALADÌ, H. (2007). Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell adhesion & migration*, **1**(3), 156-158.
- LÖTVALL, J., HÌLL, A. F., HOCHBERG, F., BUZÁS, E. I., DÌ VÌZÌO, D., GARDÌNER, C., & THÈRY, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.
- LU, X, JERBAN, S, WAN, L, MA, Y, JANG, H, LE, N, & DU, J. (2019). Three-dimensional ultrashort echo time imaging with tricomponent analysis for human cortical bone. *Magnetic resonance in medicine*, **82**(1), 348-355.
- MARKOV, M. S. (2007). Expanding use of pulsed electromagnetic field therapies. *Electromagnetic biology and medicine*, **26**(3), 257-274.
- MAROTO, R, ZHAO, Y, JAMALUDDÌN, M, POPOV, V. L, WANG, H, KALUBOWÌLAGE, M, & BRASÌER, A. R. (2017). Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *Journal of extracellular vesicles*, **6**(1), 1359478.
- MASHOURÌ, L, YOUSEFÌ, H, AREF, A. R, MOHAMMAD AHADÌ, A, MOLAEÌ, F, & ALAHARÌ, S. K. (2019). Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular cancer*, **18**(1), 75.
- MATHÌEU, M., MARTÌN-JAULAR, L., LAVÌEU, G., & THÈRY, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature cell biology*, **21**(1), 9-17.
- MATHÌVANAN, S, FAHNER, C. J, REÌD, G. E, & SÌMPSON, R. J. (2012). ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic acids research*, **40**(D1), D1241-D1244.

- MATHIVANAN, S, JI, H, & SIMPSON, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*, **73**(10), 1907-1920.
- MAYERS, J. R, & AUDHYA, A. (2012). Vesicle formation within endosomes: An ESCRT marks the spot. *Communicative & integrative biology*, **5**(1), 50-56.
- MILLER, S. C, DE SAINT-GEORGES, L, BOWMAN, B. M, & JEE, W. S. (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning microscopy*, **3**(3), 953-60.
- MITTELBRUNN, M, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C, VILLARROYA-BELTRÍ, C, GONZÁLEZ, S, SÁNCHEZ-CABO, F, GONZÁLEZ, M. Á, & SÁNCHEZ-MADRÍD, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications*, **2**(1), 1-10.
- MOHAMMADI, M. R, RIAZIFAR, M, PONE, E. J, YERİ, A, VAN KEUREN-JENSEN, K, LÄSSER, C, & ZHAO, W. (2020). Isolation and characterization of microvesicles from mesenchymal stem cells. *Methods*, **177**, 50-57.
- MOSLEY, J. R. (2000). Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. *Journal of rehabilitation research and development*, **37**(2), 189.
- MÖBIUS, W, OHNO-IWASHITA, Y, DONSELAAR, E. G. V, OORSCHOT, V. M, SHIMADA, Y, FUJIMOTO, T, & SLOT, J. W. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **50**(1), 43-55.
- NUNEZ, R, SANCHO-MARTÍNEZ, S. M, NOVOA, J. M. L, & LOPEZ-HERNANDEZ, F. J. (2010). Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. *Cell Death & Differentiation*, **17**(11), 1665-1671.
- OGAWA, Y, MIURA, Y, HARAZONO, A, KANAİ-AZUMA, M, AKIMOTO, Y, KAWAKAMI, H, & YANOSHITA, R. (2011). Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **34**(1), 13-23.
- OSTEIKOETXEA, X., BALOGH, A., SZABÓ-TAYLOR, K., NÉMETH, A., SZABÓ, T. G., PÁLÓCZI, K., & BUZÁS, E. I. (2015). Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. *PloS one*, **10**(3), e0121184.
- PARMAKSÍZ, M., LALEGÜL-ÜLKER, Ö., VURAT, M. T., ELÇİN, A. E., & ELÇİN, Y. M. (2021). Magneto-sensitive decellularized bone matrix with or without low frequency-pulsed electromagnetic field exposure for the healing of a critical-size bone defect. *Materials Science and Engineering: C*, **124**, 112065.
- PATEL, G. K, KHAN, M. A, ZUBAIR, H, SRIVASTAVA, S. K, SINGH, S, & SINGH, A. P. (2019). Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific reports*, **9**(1), 1-10.

- PATHAN, M, FONSEKA, P, CHITTI, S. V, KANG, T, SANWLANI, R, VAN DEUN, J, & MATHIVANAN, S. (2019). Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic acids research*, **47**(D1), D516-D519.
- PENG, L., JIA, Z., YIN, X., ZHANG, X., LIU, Y., CHEN, P., & ZHOU, C. (2008). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem cells and development*, **17**(4), 761-774.
- PISITKUN, T, SHEN, R. F, & KNEPPER, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(36), 13368-13373.
- RAMEY, D. (1998). *The Scientific Review of Alternative Medicine*. Spring Issue, Prometheus Books.
- RANI, S, RYAN, A. E, GRIFFIN, M. D, & RITTER, T. (2015). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Molecular Therapy*, **23**(5), 812-823.
- RAPOSO, G, & STOORVOGEL, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, **200**(4), 373-383.
- REN, L, YANG, P, WANG, Z, ZHANG, J, DING, C, & SHANG, P. (2015). Biomechanical and biophysical environment of bone from the macroscopic to the pericellular and molecular level. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, **50**, 104-122.
- ROBLING, A. G, CASTILLO, A. B, & TURNER, C. H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng*, **8**, 455-498.
- SABAPATHA, A, GERCEL-TAYLOR, C, & TAYLOR, D. D. (2006). Specific Isolation of Placenta-Derived Exosomes from the Circulation of Pregnant Women and Their Immunoregulatory Consequences 1. *American Journal of Reproductive Immunology*, **56**(5-6), 345-355.
- SALARPOUR, S, FOROOTANFAR, H, POURNAMDARI, M, AHMADI-ZEIDABADI, M, ESMAEELI, M, & PARDAKHTY, A. (2019). Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **27**(2), 533-539.
- SANSONE, P, SAVINI, C, KURELAC, I, CHANG, Q, AMATO, L. B, STRILLACCI, A, ... & BROMBERG, J. (2017). Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**(43), E9066-E9075.
- SAWKINS, M. J., BOWEN, W., DHADDA, P., MARKIDES, H., SIDNEY, L. E., TAYLOR, A. J., & WHITE, L. J. (2013). Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta biomaterialia*, **9**(8), 7865-7873.

- SCHLIEPHAKE, H., & SCHARNWEBER, D. (2008). Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *Journal of Materials Chemistry*, **18**(21), 2404-2414.
- SCHOREY, J. S., & BHATNAGAR, S. (2008). Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, **9**(6), 871-881.
- SCHWARTZ, Z., FISHER, M., LOHMANN, C. H., SIMON, B. J., & BOYAN, B. D. (2009). Osteoprotegerin (OPG) production by cells in the osteoblast lineage is regulated by pulsed electromagnetic fields in cultures grown on calcium phosphate substrates. *Annals of biomedical engineering*, **37**(3), 437.
- SEVITT, S. (1981). *Bone repair and fracture healing in man*. Churchill Livingstone.
- SHARMA, P, SCHIAPPARELLI, L, & CLINE, H. T. (2013). Exosomes function in cell–cell communication during brain circuit development. *Current opinion in neurobiology*, **23**(6), 997-1004
- SIKAVITSAS, V. I, TEMENOFF, J. S, & MIKOS, A. G. (2001). Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, **22**(19), 2581-2593.
- SIMONS, M, & RAPOSO, G. (2009). Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*, **21**(4), 575-581.
- SIMS, N. A, & VRAHNAS, C. (2014). Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Archives of biochemistry and biophysics*, **561**, 22-28.
- SKOG, J, WÜRDINGER, T, VAN RIJN, S, MEIJER, D. H, GAÏNCHE, L, CURRY, W. T, & BREAKFIELD, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, **10**(12), 1470-1476.
- SKOTLAND, T, SANDVIG, K, & LLORENTE, A. (2017). Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward. *Progress in lipid research*, **66**, 30-41.
- SLUIJTER, J. P, VERHAGE, V, DEDDENS, J. C, VAN DEN AKKER, F, & DOEVENDANS, P. A. (2014). Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovascular research*, **102**(2), 302-311.
- SLUIJTER, J. P. G., DAVIDSON, S. M., BOULANGER, C. M., BUZAS, E. I., DE KLEIJN, D. P. V., ENGEL, F. B., & FERDINANDY, P. (2018). Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular research*, **114**(1), 19-34.
- SOARES MARTINS, T, CATITA, J, MARTINS ROSA, I, AB DA CRUZ E SILVA, O, & HENRIQUES, A. G. (2018). Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PloS one*, **13**(6), e0198820.
- SQUIER, C. A, GHONEIM, S, & KREMENAK, C. R. (1990). Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *Journal of anatomy*, 171- 233.

- STEEDMAN, H. F. (1950). Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. *Journal of Cell Science*, **3**(16), 477-479.
- STENMARK, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews Molecular cell biology*, **10**(8), 513-525.
- STEVENS, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials today*, **11**(5), 18-25.
- STOORVOGEL, W, KLEIJMEER, M. J, GEUZE, H. J, & RAPOSO, G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, **3**(5), 321-330.
- SUBRA, C, GRAND, D, LAULAGNIER, K, STELLA, A, LAMBEAU, G, PAÏLLASSE, M, & RECORD, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of lipid research*, **51**(8), 2105-2120.
- SUN, L. Y., HSIEH, D. K., YU, T. C., CHIÛ, H. T., LU, S. F., LUO, G. H., & CHIÛ, T. W. (2009). Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*, **30**(4), 251-260.
- TEMENOFF, J. S, LU, L, & MIKOS, A. G. (1999). *Bone engineering*. Em squared, Toronto, 454.
- THAKUR, B. K, ZHANG, H, BECKER, A, MATEI, I, HUANG, Y, COSTA-SILVA, B, & LYDEN, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell research*, **24**(6), 766-769.
- THÉRY, C., WITWER, K. W., AIKAWA, E., ALCARAZ, M. J., ANDERSON, J. D., ANDRIANTSITOHAINA, R., & JOVANOVIĆ-TALISMAN, T. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, **7**(1), 1535750.
- TKACH, M, & THÉRY, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, **164**(6), 1226-1232.
- TRAJKOVIĆ, K, HSU, C, CHIANTIA, S, RAJENDRAN, L, WENZEL, D, WIELAND, F, & SIMONS, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, **319**(5867), 1244-1247.
- TRAN, D, GOLICK, M, RABINOVITZ, H, RIVLIN, D, ELGART, G, & NORDLOW, B. (2000). Hematoxylin and safranin O staining of frozen sections. *Dermatologic surgery*, **26**(3), 197-199.
- UDDSTRÖMER, L. (1978). The osteogenic capacity of tubular and membranous bone periosteum: A qualitative and quantitative experimental study in growing rabbits. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*, **12**(3), 195-205.

- URÍST, M. R. (Ed). (1980). *Fundamental and clinical bone physiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- VALADI, H, EKSTRÖM, K, BOSSIÓS, A, SJÖSTRAND, M, LEE, J. J, & LÖTVALL, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, **9**(6), 654-659.
- VAN NIEL, G., D'ANGELO, G., & RAPOSO, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, **19**(4), 213-228.
- VAZ, M. F., CANHÃO, H., & FONSECA, J. E. (2011). Bone: a composite natural material. *Advances in Composite Materials—Analysis of Natural and Man-Made Materials*.
- VELLA, L. J, SHARPLES, R. A, LAWSON, V. A, MASTERS, C. L, CAPPAI, R, & HILL, A. F. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, **211**(5), 582-590.
- VILLARROYA-BELTRÍ, C, BAIXAULÍ, F, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C, SÁNCHEZ-MADRÍD, F, & MITTELBRUNN, M. (2014, October). Sorting it out: regulation of exosome loading. In *Seminars in cancer biology* (Vol. **28**, pp. 3-13). Academic Press.
- WANG, K, JIANG, Z, WEBSTER, K. A, CHEN, J, HU, H, ZHOU, Y, & WANG, J. A. (2017). Enhanced cardioprotection by human endometrium mesenchymal stem cells driven by exosomal microRNA-21. *Stem cells translational medicine*, **6**(1), 209-222.
- WHITE, I. J, BAILEY, L. M, AGHAKHANI, M. R, MOSS, S. E, & FUTTER, C. E. (2006). EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *The EMBO journal*, **25**(1), 1-12.
- WHITEHEAD, C. A, LUWOR, R. B, MOROKOFF, A. P, KAYE, A. H, & STYLLI, S. S. (2017). Cancer exosomes in cerebrospinal fluid. *Translational Cancer Research*, **6**(8), s1352-s1370.
- WILLEMS, N. M, LANGENBACH, G. E, EVERTS, V, & ZENTNER, A. (2014). The microstructural and biomechanical development of the condylar bone: a review. *European Journal of Orthodontics*, **36**(4), 479-485.
- WU, Y., DENG, W., & KLİNKE II, D. J. (2015). Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*, **140**(19), 6631-6642.
- YAN, J., DONG, L., ZHANG, B., & QI, N. (2010). Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Electromagnetic biology and medicine*, **29**(4), 165-176.
- YÁÑEZ-MÓ, M, SILJANDER, P. R. M, ANDREU, Z, BEDINA ZAVEC, A, BORRÁS, F. E, BUZAS, E. I, & DE WEVER, O. (2015). Biological properties

- of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, **4**(1), 27066.
- YU, B, ZHANG, X, & LI, X. (2014). Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*, **15**(3), 4142-4157.
- ZABOROWSKI, M. P, BALAJ, L, BREAKEFIELD, X. O, & LAI, C. P. (2015). Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience*, **65**(8), 783-797.
- ZAKHAROVA, L, SVETLOVA, M, & FOMINA, A. F. (2007). T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *Journal of cellular physiology*, **212**(1), 174-181.
- ZHANG, H., FREITAS, D., KIM, H. S., FABIJANIĆ, K., LI, Z., CHEN, H., & LYDEN, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature cell biology*, **20**(3), 332-343.
- ZHANG, J, LI, S, LI, L, LI, M, GUO, C, YAO, J, & MI, S. (2015). Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, **13**(1), 17-24.
- ZHANG, M, JIN, K, GAO, L, ZHANG, Z, LI, F, ZHOU, F, & ZHANG, L. (2018). Methods and technologies for exosome isolation and characterization. *Small Methods*, **2**(9), 1800021.
- ZHANG, Y., DING, J., & DUAN, W. (2006). A study of the effects of flux density and frequency of pulsed electromagnetic field on neurite outgrowth in PC12 cells. *Journal of biological physics*, **32**(1), 1-9.
- ZHENG, Y, CAMPBELL, E. C, LUCOCQ, J, RICHES, A, & POWIS, S. J. (2013). Monitoring the Rab27 associated exosome pathway using nanoparticle tracking analysis. *Experimental cell research*, **319**(12), 1706-1713.
- ZHOU, X, VON DER MARK, K, HENRY, S, NORTON, W, ADAMS, H, & DE CROMBRUGGHE, B. (2014). Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet*, **10**(12), e1004820.
- ZHOU, X., LIU, X., LIU, H., DOU, S., CHEN, K., ZHANG, X., & CHE, J. (2021). CD36+/CD61+ Microparticles Correlate with the Risk of Percutaneous Cardiac Interventions in Coronary Artery Disease Patients and the Effects of Ticagrelor. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 1-11.
- ZUK, P. A, ZHU, M, ASHJIAN, P, DE UGARTE, D. A, HUANG, J. I, MIZUNO, H, & HEDRICK, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, **13**(12), 4279-4295.