



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRE EKSOZOMLARININ YARA İYİLEŞMESİ  
ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

Simge MALKOÇ

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

İZMİR  
2023

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRE EKSOZOMLARININ YARA İYİLEŞMESİ  
ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

Simge MALKOÇ

Danışman: Prof. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı  
Biyomedikal Teknolojiler Yüksek Lisans Programı

İZMİR  
2023



## KABUL ONAY SAYFASI

Simge Malkoç tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Yara İyileşmesi zerine Olan Etkisi” başlıklı bu çalışma E Lisansüstü Eğitim ve ğretim Yönetmeliği ile E Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve ğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.02.2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

### **Jüri yeleri:**

### **İmza**

**Jüri Başkanı :** Prof. Dr. Emel yk ÇETİN UYANIKGİL

**Raportör ye :** Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

**ye :** Türker ÇAVUŞOğLU

## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Yara İyileşmesi Üzerine Olan Etkisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

07 / 02 / 2023

Simge MALKOÇ

## ÖZET

# KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

MALKOÇ, Simge

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL

Şubat 2023, 61 sayfa

Her yıl milyonlarca insan, bir enfeksiyonun eşlik ettiği iyileşmeyen bir yara, anormal yara izi veya yaralanmalardan muzdariptir. Bu vakalar için bilim adamları, en umut verici olanlardan birisinin hücre dışı veziküllerin (EV'ler) olduğu yeni terapötik müdahalelere yönelmektedirler. Doğal olarak EV tabanlı sinyalleşme, dört yara iyileşme fazları olan hemostaz, iltihaplanma, proliferasyon ve yeniden şekillenmenin her basamağında yararlı etkileri görülmüştür. Yara iyileşme aşamasını modüle etmek için eksozomların rolü birçok çalışma ile desteklenmiştir. Bu tez kapsamında hücre kültüründe *in vitro* olarak çoğaltılan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden (BMSC) ultrasantrifüjleme yoluyla izole edilen hücre dışı vezikül olarak bilinen eksozomların rolü *in vitro* yara iyileşme deneyi yapılarak gösterilmiştir. Farklı stres koşulları uygulanarak hazırlanan eksozomların yara iyileştirmesindeki hızları kıyaslanmıştır. Sonuç olarak LPS ve hipoksi ile koşullandırılan eksozomların, kontrol ve indüklenmemiş grupta edilen eksozomlara göre yara kapanmasında daha başarılı olduğu görülmüştür.

**Anahtar Sözcükler:** Yara, BMSC, Eksozom

## ABSTRACT

# EFFECT OF BONE MARROW TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL EXOSOMES ON WOUND HEALING

MALKOÇ, Simge

MSc in Biomedical Technologies

Supervisor: Prof. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL

February 2023, 61 pages

Every year, millions of people suffer from a non-healing wound, abnormal scar or injury accompanied by an infection. For these cases, scientists are turning to new therapeutic interventions, of which one of the most promising is extracellular vesicles (EVs). Naturally, EV-based signaling has shown beneficial effects at each step of the four wound healing phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. The role of exosomes to modulate the wound healing phase has been supported by many studies. In this thesis, the role of exosomes, known as extracellular vesicles, isolated by ultracentrifugation from BMSCs grown *in vitro* in cell culture, in wound healing has been demonstrated by scratch experiment. The wound healing rates of exosomes prepared by applying different stress conditions were compared. As a result, it was observed that exosomes conditioned with LPS and hypoxia were more successful in wound closure than exosomes in the control and uninduced groups.

**Keywords:** *Wound, BMSC, Exosome*

## ÖNSÖZ

Ulu Önder Mustafa Kemal Atatürk'ün "Bütün ümidim gençliktedir" sözüyle kendime güvendim ve bilimin ışığında yürüyerek her zaman araştırmacı olmaya gayret gösterdim. Ege Üniversitesi'nde lisans dönemlerinde öğrendiklerimi bir üst seviyeye taşımaya karar verip yüksek lisansa başladım. Yüksek lisansında ilgimi çeken konulara yöneldim. Yara iyileşmesinde geleneksel yöntemlerden ziyade yenilikçi yöntemlere dikkat çekmek istedim.

Bu tez çalışması Aliye Üster Vakfı tarafından desteklenen bir projedir.

İZMİR

07/02/2023

Simge MALKOÇ

# İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI .....	
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Yara İyileşmesi.....	2
2.2 Eksozom Biyogenezi.....	3
2.3 Eksozom .....	4
2.4 Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozom.....	6
2.5 Eksozom İzolasyon Yöntemleri .....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
3.1 GEREÇ.....	12
3.2 YÖNTEM.....	13
<b>3.2.1 Hücre kültürü</b> .....	13
3.2.1.1 Altkültürleme/ Pasajlama .....	13
3.2.1.2 Hücre konsantrasyonu tayini.....	14
<b>3.2.3 Eksozom Karakterizasyonu</b> .....	18
3.2.3.1 Bikinkoninik asit testi (BCA) kullanılarak örnek protein konsantrasyonu tayini.....	18

3.2.3.2 Western Blotting .....	19
3.2.3.3 Eksozom örneklerinin taramalı elektron mikroskobu .....	21
3.2.3.4 Dinamik ışık saçılımı ile eksozom boyutunun belirlenmesi ve miktarının belirlenmesi .....	22
<b>3.2.4 In vitro yara iyileşmesi / hücre hareketliliği analizi .....</b>	<b>22</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Eksozom Karakterizasyon sonuçları.....</b>	<b>23</b>
4.1.1 Western Blot ile Eksozomal Antikor Tespiti .....	23
4.1.2 Taramalı Elektron Mikroskobu ile Eksozom Görselleştirme.....	24
4.1.3 Dinamik Işık Saçılımı ile Eksozom Boyutu Belirleme .....	26
<b>4.2 In vitro yara iyileşmesi / hücre hareketliliği analizi sonuçları.....</b>	<b>29</b>
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>32</b>
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>38</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>41</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>47</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>48</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Yara iyileşme süreci (Bian et al., 2022).....	2
<b>Şekil 2.</b> Eksozom biyogenezinin ve bileşiminin şematik gösterimi (Wei et al., 2021). 4	4
<b>Şekil 3.</b> Fetal Bovine Serum (FBS)'in eksozomlarından uzaklaştırılması işlemi.....	15
<b>Şekil 4.</b> Eksozom salgılanmasını artırmak için kurulan deneyin işlem basamaklarının gösterilmesi. (A) Deney boyunca çoğaltmış olduğumuz BMSC hücrelerinin 10X mikroskop görüntüsü.....	16
<b>Şekil 5.</b> Hipoksi inkübatöründe hücrelerin inkübasyonunun gösterilmesi .....	17
<b>Şekil 6.</b> Hücrelere uygulanan LPS'nin farklı konsantrasyonları.....	17
<b>Şekil 7.</b> Eksozom izolasyonu için yapılan yüksek devirli santrifüjleme basamakları.. .....	18
<b>Şekil 8.</b> Santrifüjleme adımlarından sırasıyla elde edilen pelletlerin gösterimi .....	23
<b>Şekil 9.</b> Western Blot ile CD63 antikorunun işaretlenmesi. ....	24
<b>Şekil 10.</b> SEM ile eksozom görüntülenmesi. (A) Trehaloz ile liyofilize edilen numune görüntüsü.. (B)Direkt PBS ile resüspanse edilen numune görüntüsü. (C) HMDS gibi çeşitli kimyasallarla hazırlanan numune görüntüsü. ....	25
<b>Şekil 11.</b> DLS ile Eksozom hacim dağılımı.....	26
<b>Şekil 12.</b> DLS ile eksozom sayısı dağılımı .....	27
<b>Şekil 13.</b> DLS ile eksozom yoğunluğunun belirlenmesi.....	28
<b>Şekil 14 .</b> Kontrol grubu, indüklenmemiş grup, hipoksi grubu, LPS grubunun in vitro yara iyileşmesi deneyinde fibroblast göçünün 0, 24, 48,72. saatlerinde karşılaştırılması. ....	29
<b>Şekil 15.</b> <i>In vitro</i> yara iyileşmesi / hücre hareketliliği analizi sonuçlarının karşılaştırılması. ....	30
<b>Şekil 16.</b> In vitro yara iyileşmesi deneyinde yara arası uzaklıkların gösterilmesi (µm). .....	30

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Eksozom İzolasyon Yöntemleri (Yang et al., 2020) .....	8
<b>Tablo 2.</b> Malzemeler ve Cihazlar .....	12
<b>Tablo 3.</b> Ayırma Jeli Bileşenleri (Smith, 2003).....	19
<b>Tablo 4.</b> Depolama Jeli Bileşenleri (Smith, 2003) .....	20
<b>Tablo 5.</b> DLS ile eksozom hacim dağılımı .....	27
<b>Tablo 6.</b> DLS ile eksozom sayısı dağılımı.....	28
<b>Tablo 7.</b> DLS ile eksozom yoğunluğunun belirlenmesi .....	28
<b>Tablo 8.</b> In vitro yara iyileşmesi / hücre hareketliliği deneyinde yara iyileşme (%) oranlarının gösterimi .....	29

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler      Açıklama

---

$\mu$ l      Mikrolitre

$\mu$ m      Mikrometre

g      g kuvveti

Kısaltmalar

MEM  $\alpha$       Minimum essential medium  $\alpha$

FBS      Fetal sığır serumu

PBS      Fosfat tampon solüsyonu

BMSC      Kemik iliği mezenkimal kök hücresi

DMSO      Dimetilsülfoksit

EV      Hücre dışı vezikül

ILV      İntralüminal veziküller

MVB      Multiveziküler cisimler

## 1.GİRİŞ

Deri dokusu, patojenlere ve mekanik strese karşı koruyucu bariyer etkisi, vücut termoregülasyonu ve ayrıca dokunma, basınç, titreşim ve ağrı hissi gibi birçok temel fonksiyona sahip olan insan vücudunun en büyük organıdır (Li et al., 2021). Yara, travma sonucu deri ya da mukozanın bütünlüğünün bozulması yara olarak tanımlanır (Ha et al., 2020).

Yara iyileşmesi, plastik cerrahide veya diyabetik ayak ülserleri, epidermolizis bülloza gibi diğer patolojik durumlarda önemli bir tıbbi sorundur (Tottoli et al., 2020). Kronik yaralar, hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkiler ve aynı zamanda ağrıyı, stresi ve depresyonu artırarak belirgin hasta morbiditesine neden olmaktadır (Eaglstein et al., 1997). Mevcut yara bakımı standartları; enflamasyonun azalması, ardından iyileşme sürecinin hızlanması ve ortadan kaldırılmasını vurgulamaktadır. Bu tür terapötik modaliteler esas olarak pahalı, zaman alıcı ve verimsizdir. Ayrıca, kronik yaraların çoğu konvansiyonel tedavilere karşı önemli direnç gösterir ve bu stratejiler yara izini düzeltemez (Yager et al., 1999).

Mezenkimal stromal hücreler (MSC'ler), derideki yarayı iyileştirmek için etkili bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Ayırt edici yetkinliğine ek olarak, MSC'nin doğal yara iyileşme fizyolojisindeki nihai rolüyle birlikte hızlı çoğalması, düşük immünojenisite gibi diğer özellikleri, onlara rasyonel, güvenli ve aynı zamanda etkili bir terapötik yaklaşım sunmaktadır (Zou et al., 2012). Aslında MSC'ler, granülasyon dokusu oluşumu ile birlikte keratinosit hücresi göçünü, anjiyogenezi, yeniden epitelizeasyonu teşvik ederek yaranın daha hızlı kapanmasına yol açar. İlginç bir şekilde, rejeneratif, ancak fibrotik olmayan, yara iyileştirme ortamını desteklerler. MSC'ler terapötik etkilerini büyük ölçüde çok sayıda hücre tipi üzerinde ve hemostazdan yeniden şekillenmeye kadar tüm yara iyileşme fazları arasında çeşitli eylemler yoluyla ortaya çıkarmaktadır (Hocking et al., n.d.). MSC'lerden türetilen eksozomlar, ana hücreler gibi biyolojik rolleri ifade etmekte ve böylece içeriklerini çevreleyen hücrelere yeniden yerleştirmenin bir sonucu olarak doku rejenerasyonunu desteklemektedir (Rani et al., 2015). Zorlu klinik deneyler, MSC bazlı tedavilerin güvenli, uygulanabilir ve etkili olduğunu söylemektedir, bu deneyler sınırlı örneklem büyüklüğü ve uzun süreli takip eksikliği nedeniyle yetersizdir.

Çapları 30-150 nm aralığında olan hücre dışı veziküllerin (EV'ler) bir türü olarak eksozomlar; lipitler, proteinler, haberci RNA (mRNA'lar), transfer RNA (tRNA), uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) içeren çeşitli biyoaktif molekülleri çevrelemektedir (Jeppesen et al.,

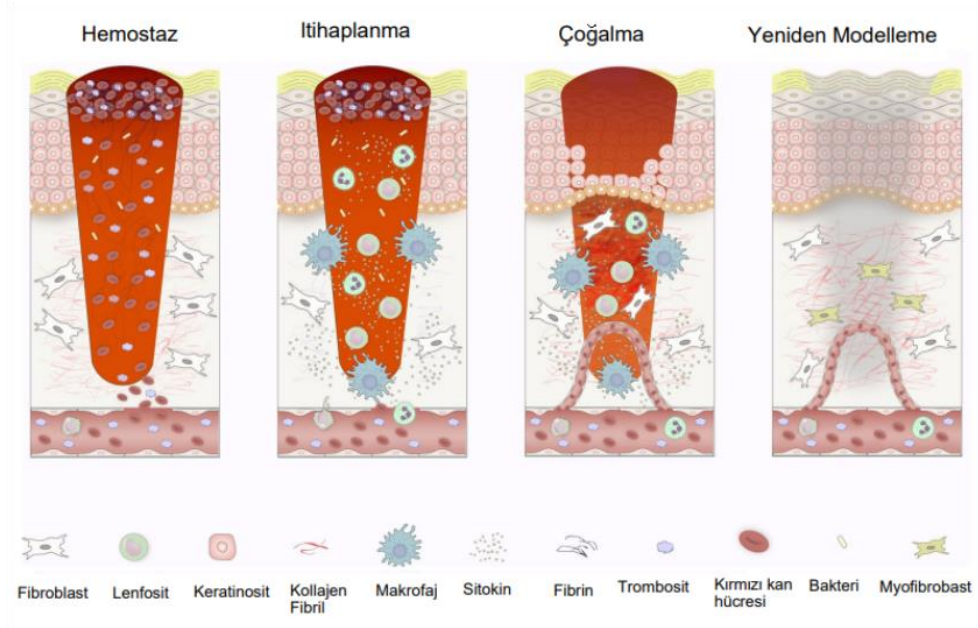
n.d.). Bazı genel moleküllere ek olarak, kökenlerini yansıtan özel doku tipine özgü proteinler de içerirler. Ölçülebilir bir düzeyde, eksozom sekresyonu, bağışıklık hücreleri, tümör hücreleri ve ayrıca MSC'ler gibi çeşitli hücre tiplerinden güçlü bir şekilde doğrulanmıştır (Hassanzadeh et al., 2021). MSC'den türetilen eksozomlar, mRNA'ları, miRNA'ları, sitokinleri ve büyüme faktörlerini içermektedir (Rajan et al., 2017). Artan kanıtlar, MSC'den türetilen eksozomların, ana MSC'lere göre önemli yararları olan alternatif bir hücresiz yaklaşımı örnekleyebileceğini, daha da önemlisi, daha düşük immünojenisite ile birlikte tümör oluşumu riskinin azaldığını önermektedir (Moghadasi et al., 2021).

Bu tez kapsamında farklı stres koşulları altında indüklenen BMSC kaynaklı eksozomların yara iyileşmesi üzerinde etkisini göstermek amaçlanmaktadır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 Yara İyileşmesi

İnsan vücudunun en büyük organı olan deri, vücudun iç ve dış ortamı arasındaki dengeyi sağlar. Derinin normal anatomik yapısı ve fonksiyonel bütünlüğü bozulduğunda, vücudun kendi koruma mekanizması altında yara iyileşmesi ile ilgili bir dizi fizyolojik ve patolojik onarım mekanizması devreye girmektedir. İyileşme, karmaşık ve dinamik bir hücresel sinyal yanıtıdır ve temel olarak örtüşen bazı aşamalardan oluşan bir tür biyolojik ve moleküler aktivitedir: hemostaz, inflamatuvar, proliferatif, migrasyon ve doku onarımını sağlamak için yeniden şekillenme (Qiu et al., 2020).



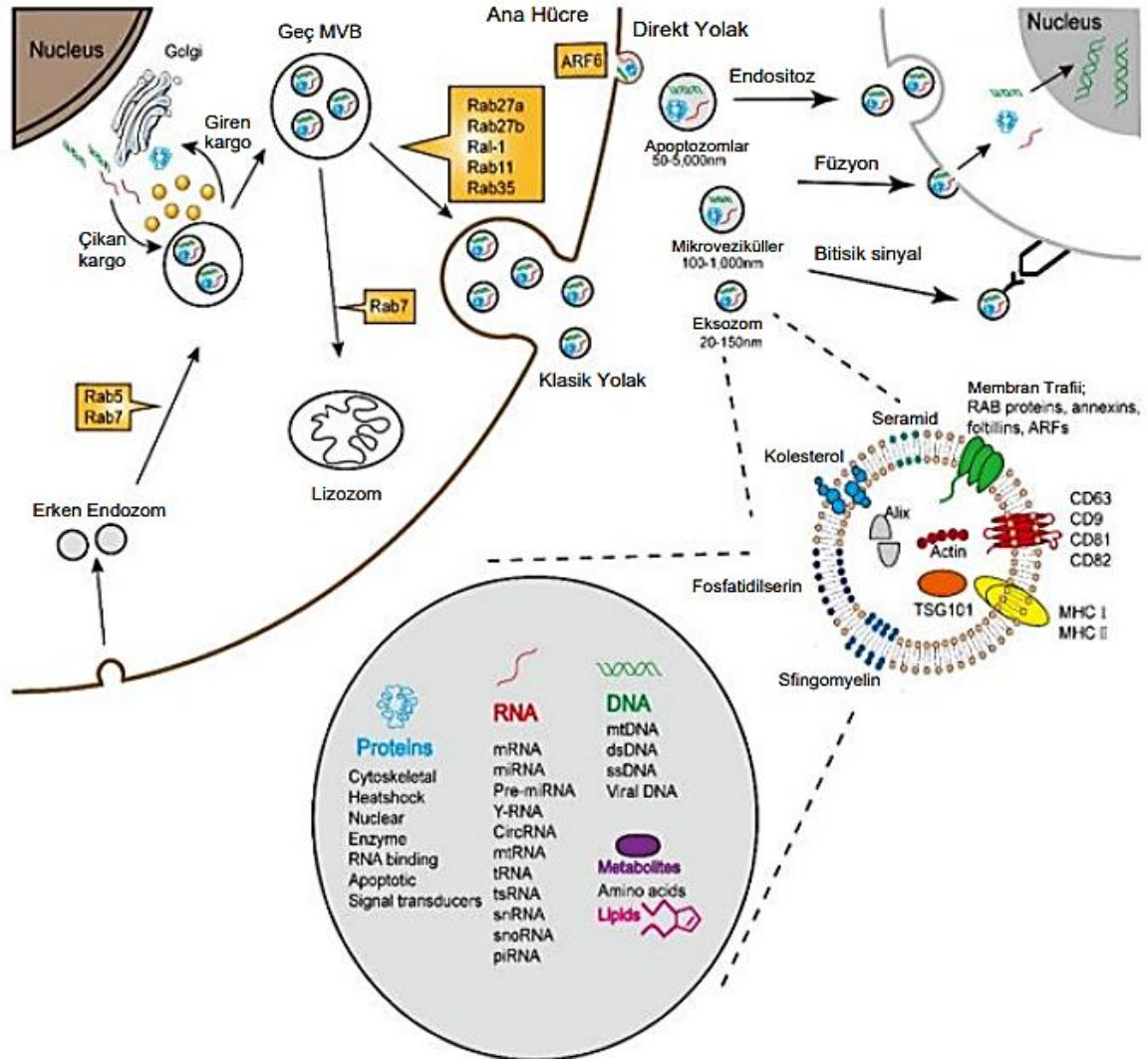
Şekil 1. Yara iyileşme süreci (Bian et al., 2022)

Deri hasarını takiben, iyileşmenin birincil basamağı olan hemostaz hemen harekete geçerek kanamayı durdurmaktadır. Trombositler ile kolajen arasındaki arayüzler, trombosit aktivasyonuna yol açmakta ve böylece agregasyonlarını desteklemektedir (Zhu et al., 2018). Son olarak, trombosit kümeleri, trombin tarafından bir pıhtıya dönüşerek büyük ölçüde bir fibrin ağının oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Yara iyileşmesinin ikinci aşaması olan inflamatuvar aşama, yeni doku oluşumu için yara yatağını sunarak, bozulan bakterilerin ve kalıntıların yok edilmesine odaklanır (Ellis et al., 2018). Enfeksiyonu azaltan nötrofillerin ve makrofajların aktivasyonuna bağlıdır (Tottoli et al., 2020). Yara onarımının proliferatif aşaması, yaranın doldurulmasını, miyofibroblast fonksiyonları aracılığıyla yara kenarlarının daralmasını ve ayrıca epitelizasyon olarak adlandırılan yaranın örtülmesini içermektedir (Ansell et al., 2011). Bu arada, taze granülasyon dokusuna yeterli oksijen ve besin sağlamak için yeni bir kan damarı kompleksinin oluşturulması kritik öneme sahiptir. Yeniden modelleme fazında inflamatuvar fazın yavaş çözülmesi, kolajen birikimi ve yara yerinin tamamen taze dokularla kaplanması ve son olarak skar dokusunun oluşumu tamamlanır. Yapılı doku yavaş yavaş güç ve esneklik kazanır. Kolajen tip III'ten tip I'e yeniden şekillenir ve yara tamamen kapanır (Young et al., n.d.).

## **2.2 Eksozom Biyogenezi**

Multiveziküler cisimler (MVB'ler) ve geç endozomlar, spesifik proteinleri, lipitleri ve sitozolik bileşenleri tutan intralüminal veziküller (ILV'ler) açısından zengin, özelleşmiş endozomal bölmelerin bir alt kümesidir. Salgılanan ILV'ler eksozom haline gelir. ILV'ler, endozomal membranların içe doğru tomurcuklanmasıyla üretilmektedir (Pan et al., 1983). MVB'ler, hücre iskeleti ve mikrotübül ağı yoluyla plazma zarına taşınır ve hücre yüzeyi ile füzyon sonrası ekzositoza uğrar. Bu sayede ILV'ler eksozomlar olarak salgılanmaktadır (Colombo et al., 2014). Diğer MVB'ler, ya lizozomlarla doğrudan füzyonla ya da otofagozomlarla füzyonla ve ardından lizozomlarla bir bozunma yolunu takip etmektedir. MVB'ler heterojen bir popülasyondur. Salgılayıcı ve parçalayıcı MVB yollarının farklı olup olmadığı spekülasyonları devam etmektedir. Bazı belirli işaretlerin veya kargoların bu yolları etkileyip etkilemediği de bilinmemektedir. Bugüne kadar, eksozom biyogenezinde yer alan çoklu mekanizmalar tanımlanmıştır. ESCRT mekanizması, SNARE proteinleri ve bunların salgılanmasında önemli rol oynayan RAB GTPazlar gibi efektörleri ile bu süreçte önemli bir rol oynamaktadır (Mashouri et al., 2019). Ayrıca, tetraspaninlere ve lipitlere dayanan mekanizmaların önemi büyüktür. Eksozom oluşumu ve salımının dinamiklerini anlamamıza

yardımcı olmuştur. ILV biyogenezi ve salgılanması, esas olarak, MVB'lerde vezikül tomurcuklanmasını ve kargo sınıflandırmasını sağlayan ve beş çekirdekli ESCRT kompleksine dayanan, zarın yeniden modellenmesi için gerekli olan sitoplazmik çok alt birimli bir sistem olan ESCRT kompleksi tarafından yürütülmektedir: ESCRT-0, -I, -II, -III ve Vps4 (Schmidt et al., 2012)



Şekil 2. Eksozom biyogenezinin ve bileşiminin şematik gösterimi (Wei et al., 2021).

### 2.3 Eksozom

Hücre dışı veziküller (EV'ler), hücreler tarafından aktif olarak salınan ve hücreden hücreye iletişime aracılık etmede önemli bir rol oynayan, zarla sınırlı veziküllerin heterojen bir grubudur. Boyut ve hücre altı orijine göre hücre dışı veziküller; eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimler olarak üç alt popülasyona ayrılmaktadır (Lu & Huang, 2020). Eksozomlar, 30-150 nm çapa sahiptir. Mikroveziküller (50 ila 1000 nm), dinlenme koşulları altında veya ATP ve sitozolik kalsiyum seviyelerindeki değişiklikler gibi spesifik uyarılara

yanıt olarak plazma zarından dışı doğru tomurcuklanmadan kaynaklanmaktadır. Hücre dışı veziküllerin en büyük ve en heterojen popülasyonu, hücreler programlanmış ölüme uğradığında hücre parçalanmasıyla üretilen apoptotik cisimlerdir (50-5000 nm) (Lu & Huang, 2020).

Eksozom salgılanması doğal olarak meydana gelmektedir. Hücresel stres ve aktivasyon sinyalleri ilgili süreçleri modüle edebilmektedir. Eksozomlar tüm hücre tipleri tarafından salgılanır ve plazma, idrar, meni, tükürük, bronş sıvısı, beyin-omurilik sıvısı, anne sütü, serum, amniyotik sıvı, eklem sıvısı, gözyaşı, lenf, safra ve mide asidinde bulunmaktadır (He et al., 2018).

Çeşitli EV'ler arasındaki birincil farkın, kargo içeriklerini ve işlevlerini belirleyen özel biyogenez modu olduğu düşünülmektedir (Tkach & Théry, 2016). Eksozomal olmayan EV'ler, plazma zarlarının doğrudan tomurcuklanmasından kaynaklanırken, eksozomlar, endozomların MVB'lere içe doğru tomurcuklanmasından kaynaklanmaktadır. Oradan, bazı MVB'ler, bozunma ve geri dönüşüm için lizozomal bölmeğe yönlendirilirken, diğerleri, hücrelerin dışında vücut sıvılarına eksozomlar olarak salgılanacak ILV'ler oluşturmaktadır. Bu işlem sırasında, lipitler, proteinler ve nükleik asitler biçimindeki ana hücre bilgisi, eksozomlara paketlenmektedir ve bu da daha sonra alıcı hücrelerin işlevlerini, hücreye alım yaparken manipüle edebilmektedir. Bu nedenle eksozomların içeriği, menşei hücreye özeldir. Ana hücre sinyallerinin hücreden hücreye doğrudan temas olmaksızın komşu hücrelere iletilmesine izin vermektedir. Ana hücreden bağımsız olarak, eksozomlar, belirli tetraspaninler (CD9, CD63 ve CD81), ısı şoku proteinleri (Hsp 60, Hsp 70 ve Hsp 90), biyogenez ile ilgili proteinler (Alix ve TSG 101), zar taşıma ve füzyon proteinleri (GTPazlar, anneksinler ve Rab proteinleri), nükleik asitler (mRNA, miRNA ve uzun kodlamayan RNA'lar ve DNA'lar) ve lipitler (kolesterol ve seramid) gibi ortak özellikleri paylaşmaktadır. Eksozomların bu benzersiz özellikleri teşhis ve tedavilerde yenilikler için fırsatlar sağlamaktadır (Kalluri, 2016).

Bir hücre gibi, eksozom zarı da sinyal molekülleri ve yüzey antijenleri bakımından zengindir ve bildirildiğine göre hem proteinleri hem de genetik materyalleri içermektedir, ancak çekirdek veya mitokondri gibi herhangi bir organel içermez. Eksozomların yoğunluğu 1,1-1,18 g/ml'dir. Endozomal orijini ile uyumlu olarak, eksozom membranı, lipid yapısı için tipik olan kolesterol, sfingomiyelin ve seramidten zengindir. Genel olarak, tüm eksozomlar, tetraspaninler gibi ortak bir protein grubunu paylaşırlar, ancak aynı zamanda hücre kaynağının kökenini ve patofizyolojik durumlarını yansıtan özel proteinler de içerirler. Exocarta'ya göre, eksozomlarda en yaygın olarak bulunan 25 protein HSPA8, CD9,

gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), ACTB, CD63, CD81, ANXA2, enolaz 1 (ENO1), HSP90AA1, EEF1A1, PKM2, YWHAZ, SDCBP, PDCD6IP, ALB, YWHAZ, EEF2, ACTG1, LDHA, HSP90AB1, ALDOA, MSN, ANXA5, fosfogliserat kinaz 1 (PGK1) ve CFL1 ([http://exocarta.org/exosome\\_markers](http://exocarta.org/exosome_markers)).

## 2.4 Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozom

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), rejeneratif tıp alanında en yaygın olarak kullanılan kök hücrelerdir. Popülerliklerinin başlıca nedenleri, hayvan modellerinde birçok hastalığa karşı yaygın olarak bildirilen terapötik etkinlik, kemik iliği gibi birçok yetişkin dokusundan ve göbek kordonu gibi tıbbi atık dokulardan kolay erişilebilirlik, büyük *ex vivo* genişleme kapasitesi ayrıcalıklı bir statüdür. Bu, MSC'leri allojenik transplantasyona uygun hale getirir (Toh et al., 2018).

Eksozomların MSC'lerin geniş kapsamlı terapötik etkinliğine aracılık ettiği keşfi, canlı hücre bazlı bir MSC tedavisini canlı olmayan bir MSC terapötikine radikal bir şekilde dönüştürdüğü için canlı replikatif hücrelerin kullanımıyla ilgili birçok zorluğu ortadan kaldırır. Çeşitli çalışmalarda belgelendiği gibi (Bartolucci et al., 2017), MSC tedavileri genellikle güvenli kabul edilirken, nispeten büyük canlı MSC'lerin kullanımı, mikrovaskülerde tıkanıklık (Furlani et al., 2009), nakledilen hücrelerin uygun olmayan hücre tiplerine veya kansere dönüşmesi gibi doğal riskler taşır (Jeong et al., 2011). MSC'lerin kondrositlere ve osteositlere farklılaşma kapasitesi, bazı hayvan çalışmalarında bildirildiği gibi, dokularda ektopik ossifikasyon ve/veya kalsifikasyon ile ilgili uzun vadeli güvenlik endişelerini de gündeme getirmiştir (Breitbach et al., 2007). Operasyonel olarak, hücre bazlı MSC terapötiklerinin üretimi, hücre canlılığı, potans ve transformasyonun üretim sürecinde, depolamada ve hastaya verilmesinin izlenmesi ve sürdürülmesi gibi süreçlerde önemli zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Büyük canlı hücrelerin aksine, nano boyutlu, canlı olmayan eksozomlar mikro damarları tıkamaz, uygun olmayan hücre tiplerine dönüşmez veya tedavinin kesilmesinden sonra kalıcı greftler olarak kalmaz (Chen et al., 2011) Sonuç olarak, MSC eksozom bazlı terapötik, hücre bazlı MSC terapötiklerinden potansiyel olarak daha güvenli, daha ucuz ve daha etkili bir tedavi yöntemi olabilir.

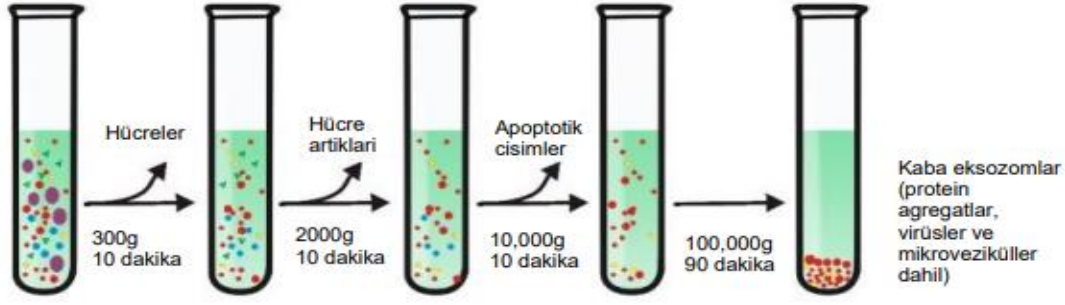
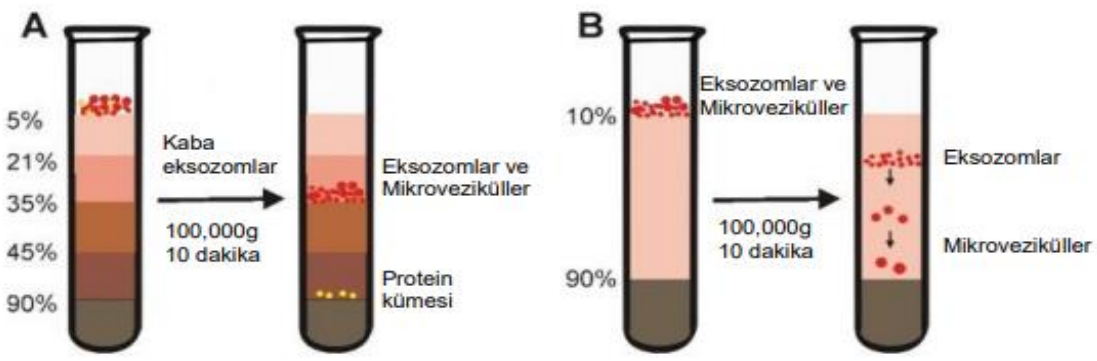
En önemlisi, eksozomlarda paketlenmiş biyoaktif varlıklar, hücreler arasında transfer edilebilmektedir. Böylece alıcı hücrelerin fenotipinde bir değişikliğe yol açmaktadır (Vader et al., 2016). Bu nedenle, eksozomlar, hücreler arasında kısa ve uzun mesafeli iletişimlerin biyolojik olarak kararlı bir biçimini oluşturarak çoklu fizyolojik ve patolojik süreçlerde kilit

bir rol oynamaktadır (Salehi et al., 2018). Son yirmi yılda, eksozomlar teşhis ve tedavi amaçlı olarak yoğun ilgi çekmiştir. Eksozomların içeriğinin hem sağlıklı gönüllülerin hem de farklı hastalıkları olan hastaların fizyopatolojik durumunu yansıttığı doğrulanmıştır. Bu nedenle, eksozomlar, hastalıkların ilerlemesini izlemek için biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır. Eksozomlarda taşınan biyoaktif moleküllerin vücuttaki bir konumdan diğerine işlevsel olarak aktarılabilmesinin keşfi, eksozomların potansiyel terapötikleri ve ilaç dağıtım araçları olarak kullanılması fikrini desteklemektedir. Sentetik nanopartiküllerle karşılaştırıldığında, eksozomlar istenen birkaç özelliği kapsamaktadır: RNA'ları, DNA'ları ve proteinleri taşımaya yönelik yetenek, otolog türevli eksozomlar kullanıldığında bağışıklık toleransı, vücut sıvılarında istenen stabilite, üreten hücrelerin doğal hedefleme özelliği ve kan beyin bariyeri (BBB) gibi biyolojik bariyerleri aşma yeteneği (Morad et al., 2019). Doğal bileşim nedeniyle, hastaların hücrelerinden toplanan eksozomların, sentetik nanopartiküllerden daha az immünojenik ve daha uyumlu olduğu bildirilmektedir. Eksozom membranı, ilaçları mononükleer fagosit sistemi (MPS) tarafından hızlı eliminasyondan korumak için bir “görünmezlik pelerini” görevi görebilir (Clayton et al., 2003). Öte yandan, eksozomların küçük bir çapı vardır ve bu da, dolaşan monositlerle azaltılmış fagositoz, tümör damarlarından ekstravazasyon yeteneği, tümör dokularına pasif birikim ve biyolojik bariyerler arasında artan geçirgenlik dahil olmak üzere ilaç dağıtımı için faydalar sağlar (Haney et al., 2015). Ek olarak, eksozomlar, üretici hücrelerin zar proteinlerinin topolojisini korur, böylece progenitörlerin içsel hedefleme özelliklerine sahiptir. Son olarak, eksozomlar, eksozomlar ve alıcı hücreler arasında doğrudan zar füzyonunu destekleyebilen spesifik lipitler ve zar proteinleri (yani CD9) içermektedir. Bu giriş modu, endozomal-lizozomal yolu büyük ölçüde atlamakta, böylece eksozom yüklerinin doğrudan sitozolik girişine izin vermektedir (Lu & Huang, 2020).

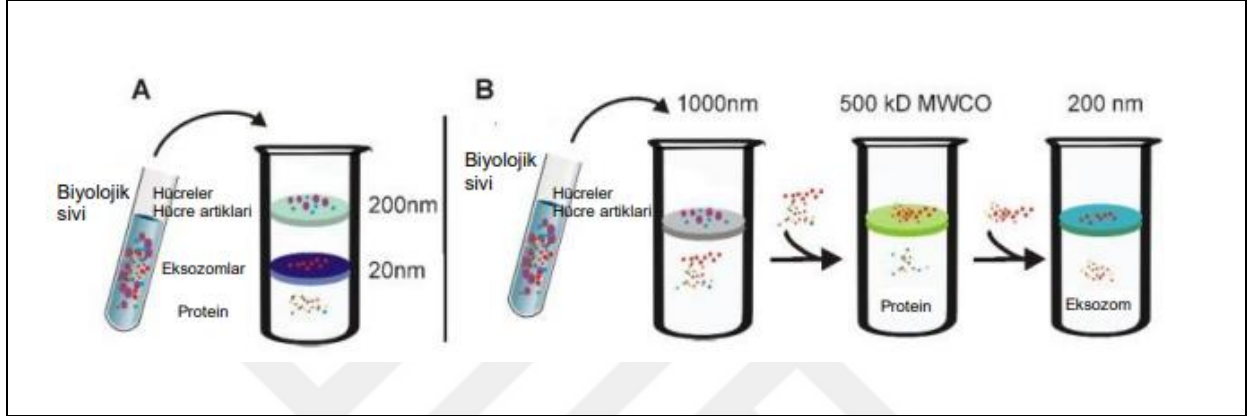
## **2.5 Eksozom İzolasyon Yöntemleri**

Eksozomlar, son derece karmaşık vücut sıvıları yoluyla dağıtılan nano boyutlu hücre dışı keseciklerdir. Çeşitli numune kaynaklarına uyan tek bir yöntem uygulanabilir olmadığından, eksozomların farklı fizyokimyasal ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanmak için çalışmalar yapılmıştır. Ultrasantrifüjleme, ultrafiltrasyon, immünoafinite yakalama, yük nötrleştirmeye dayalı polimer çökeltme, boyut dışlama kromatografisi ve mikroakışkan teknikleri dahil olmak üzere benzersiz avantaj ve dezavantajlarıyla birlikte altı sınıf eksozom ayırma stratejisi rapor edilmiştir (Yang et al., 2020).

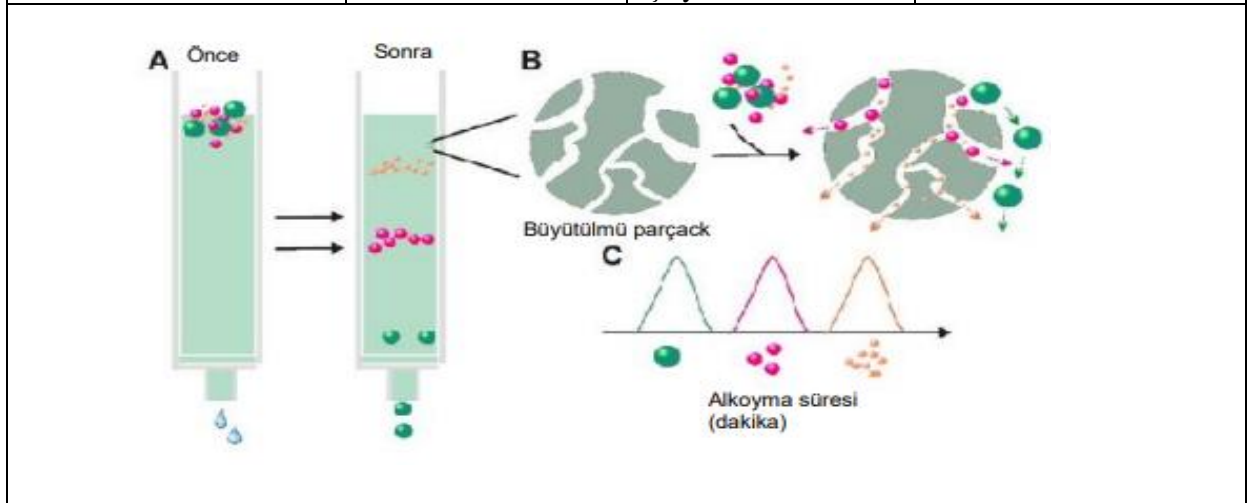
**Tablo 1.** Eksozom İzolasyon Yöntemleri (Yang et al., 2020).

İzolasyon Yöntemi	Prensip	Avantajlar	Dezavantajlar
Diferansiyel ultrasantrifüjleme	Farklı yoğunluğa ve boyuta sahip parçacıklar, merkezkaç kuvveti altında farklı tortu hızı gösterir.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Düşük maliyetli</li> <li>• Ekstra izolasyon reaktifleri ile düşük kontaminasyon riski</li> <li>• Büyük hacimli hazırlıklar için uygun</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek ekipman gereksinimi</li> <li>• Zaman alıcı</li> <li>• Yoğun emek</li> <li>• Yüksek hızlı santrifüjleme nedeniyle potansiyel mekanik hasar</li> <li>• Protein toplanması</li> <li>• Küçük hacimli teşhis için uygun değildir</li> <li>• Düşük taşınabilirlik</li> </ul>
			
Gradyan ultrasantrifüjleme	Yoğun bir ortamda santrifüjlemeden sonra, tüpteki nesnelere benzer yoğunluğa sahip ortamın konumunda kalabilir.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ürünlerin yüksek saflıkta olması</li> <li>• Eksozomların alt popülasyonunun ayrılmasına izin verilmesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Daha düşük hacimli işlenebilirlik</li> <li>• Yüksek ekipman gereksinimi</li> <li>• Zaman tüketiyor</li> <li>• Yoğun Emek</li> <li>• Yüksek hızlı santrifüjleme nedeniyle potansiyel mekanik hasar</li> <li>• Küçük hacimli teşhis için uygun değil</li> <li>• Düşük taşınabilirlik</li> </ul>
			

Ultrafiltrasyon	Tanımlanmış boyut dışlama limiti veya moleküler ağırlık derecesine ile filtre membranı kullanma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Düşük ekipman maliyeti</li> <li>• Hızlı prosedür</li> <li>• İyi taşınabilirlik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Orta derecede saflık</li> <li>• Kesme geriliminin neden olduğu potansiyel bozulma</li> <li>• Tıkanma ve membran sıkışması nedeniyle olası kayıp</li> </ul>
-----------------	---	--	---

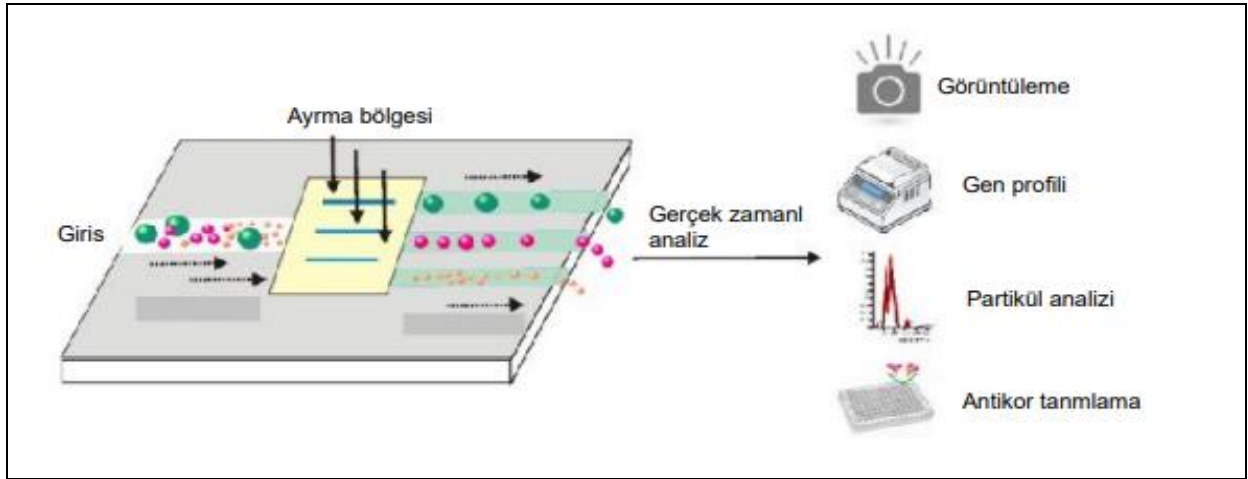


Boyut kromatografisi	dışlama	Gözenekli malzemelere eklendikten sonra, büyük parçacıklar daha önce ayrılacak şekilde partikül boyutlarına göre ayrıştırılan maddeler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek saflık</li> <li>• Hızlı hazırlık</li> <li>• Eksozomların doğal biyolojik aktivitelerini koruma yeteneği</li> <li>• İyi tekrarlanabilirlik</li> <li>• Hem küçük hem de büyük numune kapasitesi potansiyeli;</li> <li>• Her tür numuneyi işleyebilir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nispeten yüksek cihaz maliyetleri</li> <li>• Eksozom zenginleştirme için ek yöntem gerekli</li> </ul>
----------------------	---------	--	---	--



Polimer Çöktürmesi	Yüksek hidrofilik su içermeyen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kullanımı kolay</li> <li>• Sıradan ekipman</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein agregatlarının, diğer hücre dışı</li> </ul>
--------------------	--------------------------------	--	--





### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 GEREÇ

Tablo 2. Malzemeler ve Cihazlar

<b>Hücre Kültürü</b>	
Sarf Malzemeler	T25 kültür kabı (707003 Nest), T75 kültür kabı (708003 Nest), T175 kültür kabı (709003 Nest), Minimum essential medium $\alpha$ (MEM $\alpha$ ), Fetal sığır serumu (FBS) (10270106 Thermo), 2.0 mM L-glutamine (25030081 Gibco), Penisilin-streptomisin (PS-B Capricorn), Fosfat tamponlu salin (PBS) (311010 Nest), Tripsin-EDTA (TRY-3B Capricorn), Tripkan mavisi, Gözenek boyutu 0.22 $\mu$ m olan bir şırınga filtresi (321015 Nest), 5 mL Serolojik Pipet, Steril (326001 Nest), 10 mL Serological Pipette, Steril (326003 Nest), 25 mL Serological Pipette, Steril (326004 Nest), Dimetil sülfoksit (DMSO) (D 12345 Invitrogen)
Cihazlar	Ters Mikroskop (Olympus, CKX41), Derin Dondurucular (-80 0 C), (Eppendorf Company, Model U410-86), Derin Dondurucular (-20 0 C), Buzdolabı (2 adet) Altus AL 366, CO <sub>2</sub> İnkübatör (Binder ve Eppendorf), Sınıf II Laminar Hava Akış Kabini (ESCO), Su banyosu (Nüve, BM 402), Santrifüj (Eppendorf Centrifuge, 5804R), Vorteks (Dragonlab, MX-F), Tri gaz inkübatörü (New Brunswick Galaxy, 170R)
<b>Eksozom İzolasyonu</b>	
Sarf Malzemeler	
Cihazlar	Santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-15R) Yüksek devirli santrifüj (Beckman Coulter, Avanti J-E ve Optima L-100 XP)
<b>Eksozom Karakterizasyonu</b>	
Sarf Malzemeler	BCA kit (Thermo Fisher Scientific), CD63/MLA1 Poliklonal Antikor, 100ul (Bioss-USA, BS-1523R), CD9/MRP-1 Polyclonal Antibody, 100ul (Bioss-USA, BS-2489R), Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 2.0 ml (Jackson Immuno Research, 111-035-003), Santrifüj Tüpü (Beckman Coulter), 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu: 1.5 M Tris/HCl (Sigma, T5941), % 0.4 SDS (Sigma, L4390), pH 8.8, 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu: 0.5 M Tris/HCl (Sigma, T5941), % 0.4 SDS (Sigma, L4390), pH 6.8
Cihazlar	Poliakrilamid jel yürütme aparatı (C.B.S. Scientific, MGV-202 ve Biorad), Western blot transfer aparatı (C.B.S. Scientific, EBX-700), DLS partikül analizi (Particulate Systems), SEM görüntüleme cihazı Thermo Fischer Scientific Apreo S.
<b>Yara Modeli</b>	
Sarf Malzemeler	6 kuyulu hücre kültürü plakası (Nest)

## 3.2 YÖNTEM

### 3.2.1 Hücre kültürü

*In vitro* çalışmada, daha öncesinde tez kapsamında çalışma için planlamış ve temin ettiğimiz ve stokta yedeği olmayan adipoz kökenli mezenkimal kök hücre hattının, laboratuvarında bulunan hücre kültürü için kullanılan inkübatörün arızası sebebiyle bir başka tip kök hücre olan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (BMSC) kullanılmıştır, Hücrelerinin canlılıklarını sağlıklı şekilde devam ettirebilmeleri ve çoğalmaları için gerekli besin içerikleri için optimal koşullar sağlanmıştır.

Besi yeri olarak kullanılan Minimum essential medium  $\alpha$  (MEM  $\alpha$ ) içerisine %10 oranında fetal sığır serumu (FBS) ve %1 oranında penisilin-streptomisin eklenerek hazırlanan kültür besiyerinden 5 ml eklenip pipetaj yapılarak 25cm<sup>2</sup> 'lik kültür kabına ekimi yapıldı. Hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortamda kültüre edildi. 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek yüzen ölü hücreler ve hücresel atıklar fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Haftada iki kez besiyeri değişimi tekrarlandı. Flaskın tabanı yaklaşık %70- 80 oranında hücreler ile kaplandığında tripsin-EDTA işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edildi ve bu ilk pasaj olarak değerlendirildi. Hücre kültürü işlemlerinin sonunda 3. pasaja kadar gelmiş hücrelere koşullandırma uygulanarak diğer adımlara geçildi.

#### 3.2.1.1 Altkültürleme/ Pasajlama

BMSC'lerin birleşme derecesinin değerlendirilmesi, 100X büyütme kullanılarak bir ters mikroskobu altında her iki ila üç günde bir gerçekleştirildi. Kültürler yaklaşık %70- 80 oranında birleştiğinde, kullanılmış ortam atıldı ve taze 37°C'ye ısıtılmış ortamla değiştirildi. Kültürler >%70- 80 birleşik olduğunda, hücre büyümesini sürdürmek için pasajlandı. Kullanılmış besi ortam atıldı ve hücre tabakası PBS ile yıkandı. PBS, hücrelerinin hücre katmanını yıkamak için kullanıldı. % 0.25 Tripsin/EDTA şişe yüzey alanının 25 cm<sup>2</sup>'si başına 1.0 mL kullanıldı ve şişe 2–10 dakika süreyle 37°C'lik inkübatöre geri döndürüldü. Kaldırılan hücreler, 37°C'ye ısıtılmış taze besi ortamda yeniden süspanse edildi; Hücreleri yeniden süspanse etmek için kullanılan minimum hacim ortam, en azından başlangıçta kullanılan tripsin / EDTA hacmine eşittir. Bu, ortamda tripsin / EDTA'yı etkin bir şekilde etkisiz hale gelir. Gerekli sayıda hücre, önceden ısıtılmış tam ortam içeren yeni bir şişeye aktarıldı. Hücreler 37°C inkübatörüne geri döndürülmüştür.

### 3.2.1.2 Hücre konsantrasyonu tayini

Yapışan hücreler, 3.2.1.1'de anlatıldığı gibi tripsin / EDTA kullanılarak süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonu, santrifüjünde 4°C 1300 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek konsantre edildi ve hücre pelleti, daha küçük bir hacimde yeniden süspansiyon edildi. Alikotlanan hücre süspansiyonu hacmi kadar 1:1 tripan mavisi ile 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 10-15 µL hücre süspansiyonu çıkarıldı ve bir hemositometreye yüklendi. 5 x 5 kare içindeki hücreler, 100X büyütme kullanılarak bir (Olympus, CKX41) invert mikroskop altında sayıldı. Hücre sayımının doğruluğunu artırmak için minimum 100 hücre sayıldı. En az üç sayım kaydedildi. Hücre konsantrasyonu, üç hücre sayısının ortalaması alınarak ve 10<sup>4</sup> ile çarpılarak 1.0 mL hücre süspansiyonunda bulunan hücre sayısı elde edilerek hesaplanmıştır.

### 3.2.1.3 Hücrelerin muhafazası

Tripsin/EDTA eklenerek kaldırılan hücreler, 4°C 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjleme sonrasında hücreler tüp başına 1x10<sup>6</sup>/ml hücre olacak şekilde sayıldı ve bu sayma işlemi sonrasında %90 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma solüsyonu içerisinde çözündürülerek kriyotüplere koyuldu. Ardından içleri doldurulmuş olan kriyotüpler -80°C'deki buzdolabında saklandı.

### 3.2.1.4 Eksozom içermeyen besiyeri için fetal sığır serumu temizliği

Eksozomlar, hücre kültürü ortamının süpernatantlarından toplandı. Tüm eksozom araştırma deneyleri için hücreler, eksozom içermeyen ortamda kültürlendi. Bu adımda, FBS'nin sığır eksozomlarından temizlenmesi sağlandı. Bu, gece boyunca 4°C'de ultrasantrifüj kullanılarak FBS'nin 120.000 g'de ultrasantrifüjlenmesiyle sağlandı (Eldh et al., 2012). 18 saat boyunca 120.000g'de santrifüj edildi Yaklaşık 1 cm yukarıdan, eksozomu temizlenmiş FBS, dikkatlice enjektöre alındı (Schwartz et al., 2017). Temizlemenin ardından ortam, gözenek boyutu 0.22 µm (Thermo Fisher Scientific) olan bir şırınga filtresinden geçirilerek sterilize edildi. Temizlenmiş FBS, hücrelerin koşullandırılması esnasında kullanıldı.



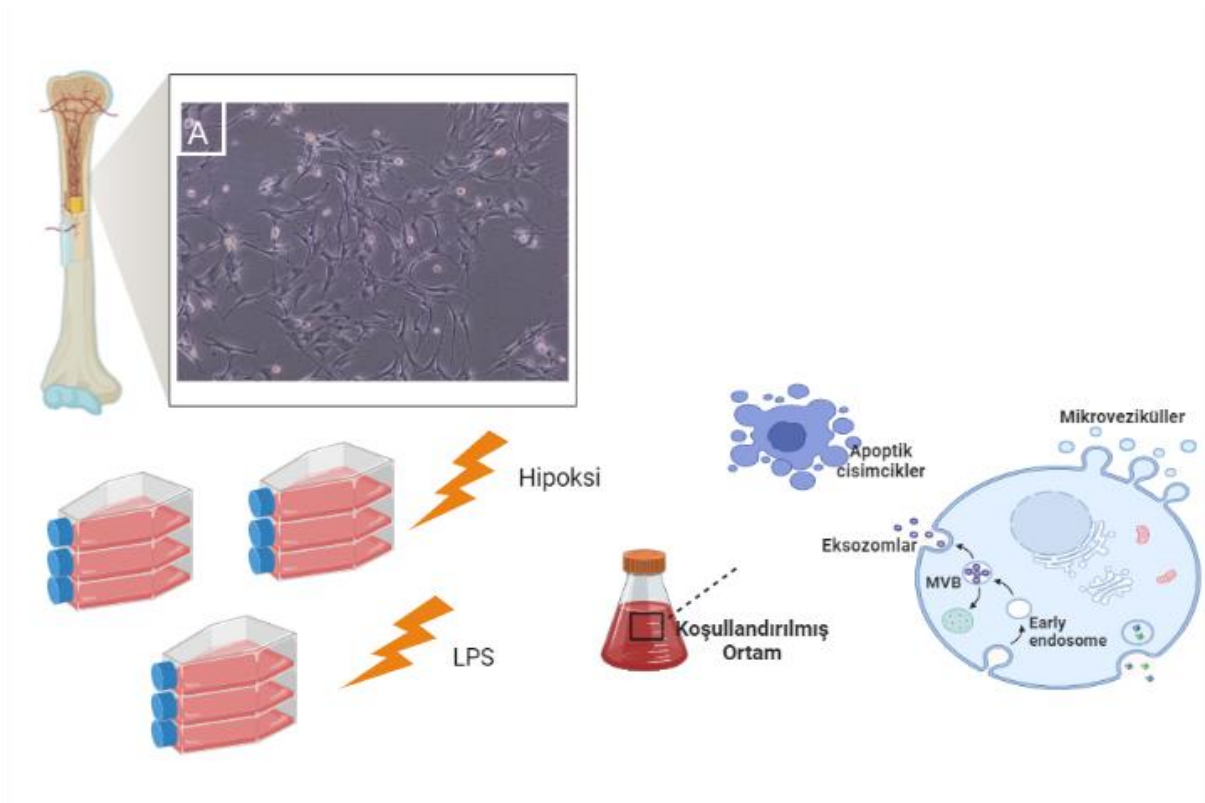
Şekil 3. Fetal Bovine Serum (FBS)'in eksozomlarından uzaklaştırılması işlemi

### 3.2.2 Eksozom İzolasyonu

#### 3.2.2.1 Hücrelerin koşullandırılması

BMSC hücrelerinden eksozom izolasyonu için hücreler T75 hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler hücre kültür kabının % 70'ini kapladıktan sonra mevcut besiyeri alınarak yerine FBS içermeyen besiyeri eklendi. Hücre kültürü için kullanılan fetal sığır serumu yüksek oranda eksozom içerdiğinden çapraz kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla hücreler serumsuz besiyerinde iki gece inkübe edildi. Hücreler, serumsuz kültür ortamında indüklenmemiş grup, hipoksi ve LPS altında 48 saat daha kültürlendi. İki gece serum eksozomlarından arı FBS ile hazırlanan besiyerinde kültüre edildikten sonra besiyeri toplandı.

İndüklenmemiş grup hiçbir stres koşullandırmasına tabi tutulmadan izole edilen eksozomları ifade etmektedir.



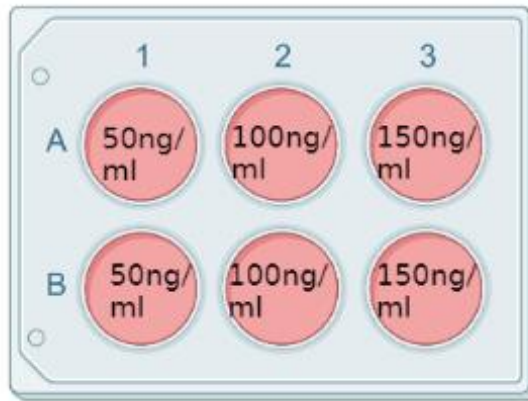
**Şekil 4.** Eksozom salgılanmasını artırmak için kurulan deneyin işlem basamaklarının gösterilmesi. (A) Deney boyunca çoğaltmış olduğumuz BMSC hücrelerinin 10X mikroskop görüntüsü.

Hipoksi tedavisi, bir üç gazlı inkübatörü kullanılarak gerçekleştirildi. Oksijen konsantrasyonu,% 5 CO<sub>2</sub> ve dengelenmiş nitrojenden oluşan bir artık gaz karışımı ile % 5'te tutuldu (Han et al., 2019). Deney setimizde % 5 CO<sub>2</sub>, % 5 O<sub>2</sub> gaz karışımı içeren tri gaz inkübatörü (New Brunswick Galaxy,170R) kullanıldı.



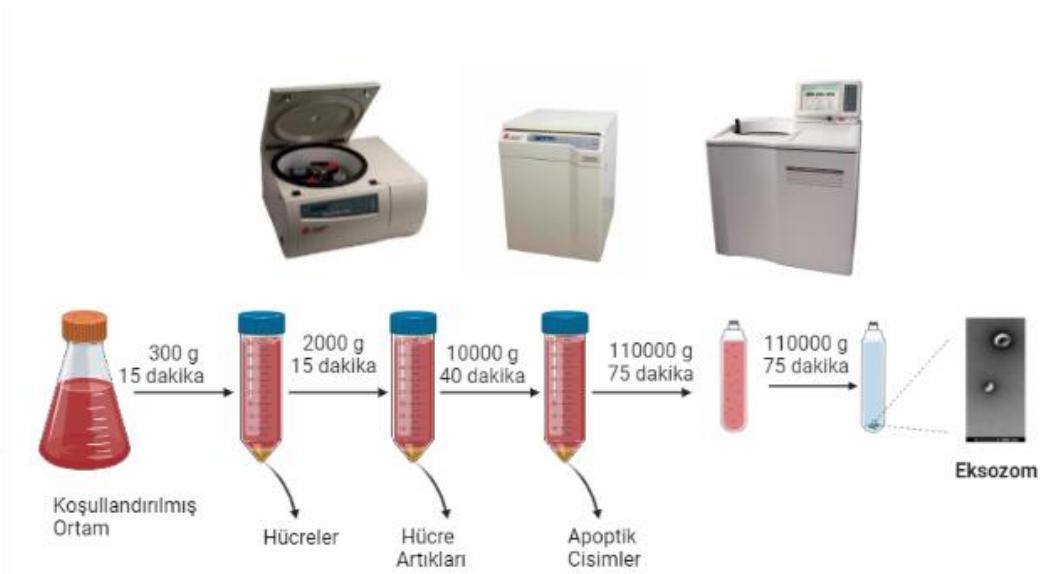
Şekil 5. Hipoksi inkübatöründe hücrelerin inkübasyonunun gösterilmesi

Lps koşullandırması için optimizasyon çalışması gerçekleştirildi. 6 kuyulu hücre kültür kabına Optimum LPS konsantrasyonunun belirlenmesi için sırasıyla 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml denemeleri yapılmıştır. Optimum doz 100 ng/ml seçilmiştir.



Şekil 6. Hücelere uygulanan LPS'nin farklı konsantrasyonları

### 3.2.2.2 Ultrasantrifüjleme



Şekil 7. Eksozom izolasyonu için yapılan yüksek devirli santrifüjleme basamakları..

Toplanan hücre kültürü süpernatanı, santrifüj tüplerine bölündü ve 4 ° C'de diferansiyel santrifüjlemeye tabi tutuldu. Örnekler 15 dakika süreyle 300 g'de santrifüjlenir ve süpernatant toplanır ve daha sonra ilave örnekler, 15 dakika daha 2.000 g'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant tekrar toplanır ve geri kalan örnekler 40 dakika 10.000 g'de santrifüjlenir. Her bir numuneden alınan süpernatant, hücreleri ve hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için 0.22 µm'lik bir filtreden süzüldü. Orijinal çözelti kalır. Çözeltiyi resüspanse etmek ve dengelemek için PBS eklendi. Daha sonra bu numuneler, başka bir 75 dakika boyunca 110.000 g'de tekrar santrifüjlenir. Son olarak, süpernatant tamamen atıldı ve pellet, 1 ml PBS içinde yeniden süspanse edildi (Cheng et al., 2019).

Hücreler, eksozom konsantrasyonunun, ekstrakte edildikleri hücre sayısı ile ilişkilendirmek için bir hemositometre kullanılarak sayıldı. Eksozom pelletleri, PBS içinde yeniden süspanse edilir ve -80 ° C'de saklandı.

### 3.2.3 Eksozom Karakterizasyonu

#### 3.2.3.1 Bikinkoninik asit testi (BCA) kullanılarak örnek protein konsantrasyonu tayini

Eksozom protein ekstraksiyonunu takiben, lizatlar bikinkoninik asit (BCA) test kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak ölçüldü; 0-2000 µg / mL BSA (kitte sağlanan ampul ) 1X RIPA

tamponu kullanılarak yapılmıştır. Çalışma reaktifi, 50 kısım BCA reaktifi A ve bir kısım BCA reaktifi B kullanılarak yapıldı.

Lizatlardaki protein miktarını ölçmek için BCA ölçüm kiti kullanılmıştır. Öncelikle eppendorf tüplere 149 µl RIPA modifiye tamponu ardından 1 µl protein lizatı örneği eklendi. Örnekler ve kör için BCA kitinde olan her numune başına 75 µl A, 75 µl B ve 3 µl BSA olacak şekilde toplam karışım hazırlandı. Hazırlanan BCA çalışma reaktifi vorteks edilerek örneklerin bulunduğu tüplere her örnek için 150 µl eklendi. Kör numune için sadece 150 µl RIPA eklendi. Tüpler vorteks edilip, kısa santrifüjden sonra 60°C’de ısıtıcı blokta 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Spektrofotometrede 562 nm’de numunelerin absorbanları ölçüldü. Elde edilen absorban değerleri protein standart eğrisine göre hesaplanarak protein miktarları µg /µl olarak belirlendi.

### 3.2.3.2 Western Blotting

- Proteinlerin SDS-PAGE ile Ayrılması

Camlar sırasıyla su-etanol-izopropanol ile silindi. Çerçeve ve jel kaset tutucusu monte edildi. Hazırlanan jel kasetine %15 yüzdede ayırma jelleri döküldü. Jelin düzgün bir şekilde donabilmesi için üzerine izopropanol döküldü. Jel daha sonra 15-20 dakika katılaşmaya/donmaya bırakıldı. Donan ayırma jelinin üzerindeki izopropanol bir peçete yardımıyla uzaklaştırıldı ve depolama jeli dökülerek tarak yerleştirildi. Kullanımdan önce gerekli hacimde 4×yükleme tamponu içerisine %10 oranında β-merkaptoetanol eklendi ve karıştırıldı. Protein lizatlarından her örnekten 30 µg-50 µg miktarlarına karşılık gelen hacimler yeni tüplere örnekler koyuldu. Su ile eşit hacme tamamlandı ve 4x yüklem tamponu ilave edildi. Hazırlanan protein örnekleri 95°C’de 5 dakika disülfür bağları denatüre edildi. Protein numuneleri jele yüklenmeden önce 5 dakika buz üzerinde soğutuldu ve kısa santrifüj yapıldı. Kuyucuklara yüklenen örnekler ve bir moleküler ağırlık cetveli (Precision Plus Protein™ Standartları, Opti protein marker, G252) ile birlikte eklendi. Uygun voltajda (80 V) ve sürede (3-4 saat) yürütüldü. Jel boyunca negatif yüklü proteinlerin jelden anoda doğru göç etmesi sağlandı.

**Tablo 3.** Ayırma Jeli Bileşenleri (Smith, 2003)

Ayırma Jeli (10ml)	%6	%8	%10	%12	%15
dH <sub>2</sub> O (ml)	5.4	4.7	4.1	3.4	2.4
%30 Akrilamid karışımı	2.0	2.7	3.3	4	5
4X Ayırma jeli tamponu	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
%10 APS (ml)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
TEMED (ml)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

**Tablo 4.** Depolama Jeli Bileşenleri (Smith, 2003)

Depolama Jeli (ml)	10	5	2,5
dH <sub>2</sub> O (ml)	5,7	2,85	1,425
%30 Akrilamid karışımı	1,7	0,85	0,425
4X Depolama jeli tamponu	2,5	1,25	0,625
%10 APS (ml)	0,1	0,05	0,025
TEMED (ml)	0,010	0,005	0,005

- **Membrana transfer**  
Metanol içerisinde PVDF membran daldırıldı. Sünger, Whatman kağıdı, proteinlerin yürüdüğü jel, PVDF membran, Whatman kağıdı ve sünger ard arda gelecek şekilde Western-blot transfer kasetine yerleştirilmek üzere transfer örneği hazırlandı. Transfer kaseti, transfer tankına yerleştirilerek gece boyu +4 °C’de 90 mA’de transfere bırakıldı.
- **Primer Antikor ile İşaretleme**  
TBS-T içerisinde transfer tankından çıkarılan membran 2 kez çalkalandı. TBS-T’de hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklama işleminin ardından membran TBS-T ile 2 defa çalkalandı. Eksozomlara özel birincil antikorlar, CD63, CD9 ile gece boyunca inkübe edildi. Birincil antikor, blokaj tamponu ile 1: 1000 oranında seyreltildi. Kullanım oranı belirlenmiş primer antikorlar, % 0,5 süt tozu ya da % 5 BSA içeren TBS-T’de hazırlandı. Membran gece boyu kalmak suretiyle primer antikor solüsyonu içinde +4°C’de yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Membran 2 kez çalkalandı, 1 kez 15 dakika ve 3 kez 5 dakika TBS-T adımlarıyla yıkama işlemlerine tabi tutuldu.
- **Sekonder Antikor ile İşaretleme**  
1/5.000 veya 1/10.000 olarak optimize edilen horsedish peroksidazı (HRP)- bağlı tavşan sekonder antikorunu % 0,5 süt tozu içeren TBS-T içinde hazırlandı. Sekonder antikor solüsyonuna atılan membran, oda sıcaklığında 1 saat yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Membran 2 kez çalkalama, 1 kez 15 dakika ve 3 kez 5 dakika TBS-T adımlarıyla yıkama işlemlerine tabi tutuldu.
- **Bantları Görüntüleme İşlemi**  
Işık görmeyen odada membran üzerine hazırlanan ECL-plus kiti solüsyonu (B:A solüsyonu 1:40 oranında membran büyüklüğüne uygun hacimde hazırlandı) döküldü ve 5 dakika inkübe edildi. Kasetin içinde iki asetat kağıdı arasına konulmuş membran üzerine film yerleştirilerek farklı sürelerde pozlama gerçekleştirildi. Filmin görüntülenmesi

için sırasıyla 2 dakika developer ve 5 dakika fikser solüsyonundan geçirilme işlemleri uygulandı.

### 3.2.3.3 Eksozom örneklerinin taramalı elektron mikroskobu

- Gridlerin hazırlanması

3 farklı yöntem denenerek numune hazırlandı.

İlk olarak Charoenviriyakul ve ark. liyofilizasyonla eksozomların özelliklerini  $-80^{\circ}\text{C}$  'de saklananlarla karşılaştırdıklarında eksozomların daha stabil kaldıkları görüldü (Charoenviriyakul et al., 2018). PBS içerisinde numune örneği %3 trehalozlu olarak hazırlandı. Cam lamel üzerinde hazırlanan eksozom örneği liyofilizasyonla hazırladıktan sonra SEM görüntüleme işlemlerine geçildi.

İkinci yöntemde herhangi bir kimyasal kullanmadan PBS içerisindeki eksozom resüspanse edildikten sonra alüminyum folyo üzerine konuldu. Oda sıcaklığında PBS'in uçması sağlandı. Ardından ertesi gün SEM görüntüleme işlemlerine geçildi.

Son yöntemde, ilk olarak lamel altı kuyulu hücre kabının içine yerleştirildi. Daha sonra PBS içindeki eksozomlar, lamelin üstüne konuldu ve oda sıcaklığında 30-45 dakika çökmeye bırakıldı. Bundan sonra fazla PBS, bir filtre kağıdı ile emildi. Daha sonra lamelin üzerine 0.5 mL gluteraldehit, 9.5 mL 0,1 M sodyum kakodilat çözeltisi içerisine eklenerek tampon A hazırlanmış oldu. Örnekler tampon A' da 30 dk bekletildi. Tampon A çekildikten sonra Tampon B olarak, %7 sükröz içeren 1 M sodyum kakodilat çözeltisi koyulur ve 30 dk bekletildi. Tampon B çekildikten sonra 1 M sodyum kakodilat içinde %2 osmiyum tetroksit içeren Tampon C eklenir ve 30 dk bekletildi. Lamele, soğuk PBS ile üç kez, her seferinde 15 dakika süreyle yıkanarak her yıkamadan sonra PBS, filtre kağıdı ile alındı. Lamel daha sonra gradyan yüzdesi (% 30,% 40,% 50,% 60,% 70,% 90 ve % 100) etanol ile her seferinde 15 dakika süreyle bir dizi dehidrasyon aşamasına tabi tutuldu. Fazla etanol, filtre kağıdı ile emildi. Bundan sonra 20µl HMDS (hekzametildisilazan) çözeltisi 15 dakika inkübe edilir. Daha sonra altı kuyulu hücre kabı, oda sıcaklığında gece boyunca çeker ocak içerisinde kurumaya bırakıldı. Ertesi gün eksozom numunesi elektron mikroskopisine tabi tutuldu.

- Numunelerin Kaplanması

Kaplama cihazında (Leica EM ACE600, Almanya), argon gazı ve küçük bir elektrik alanı kullanılmaktadır. Vakum içerisindeki küçük odaya numune yerleştirildi. Elektriksel alan yardımıyla argon atomlarından elektron uzaklaştırılarak iyon haline getirildi. Sonrasında negatif yüklü bir altın-paladyum folyo parçasına iyonlar çekildi. Ar iyonları, bir kumlama

makinesinden çıkan kum tanesi gibi hareket eder ve folyo yüzeyinden altın atomlarını vurmaktadır. Bu altın atomları numune yüzeyine yerleşmiş ve %80 Au ve %20 Pd oranlarını içeren kaplama elde edilmiştir. Hedef plaka ile 7 nm kalınlığında yüzey kaplama işlemi yapılmıştır.

- Görüntüleme

Tüm numuneler daha sonra Thermo Fischer Scientific Apreo S elektron mikroskobu kullanılarak 50K ila 100K büyütme için görselleştirildi.

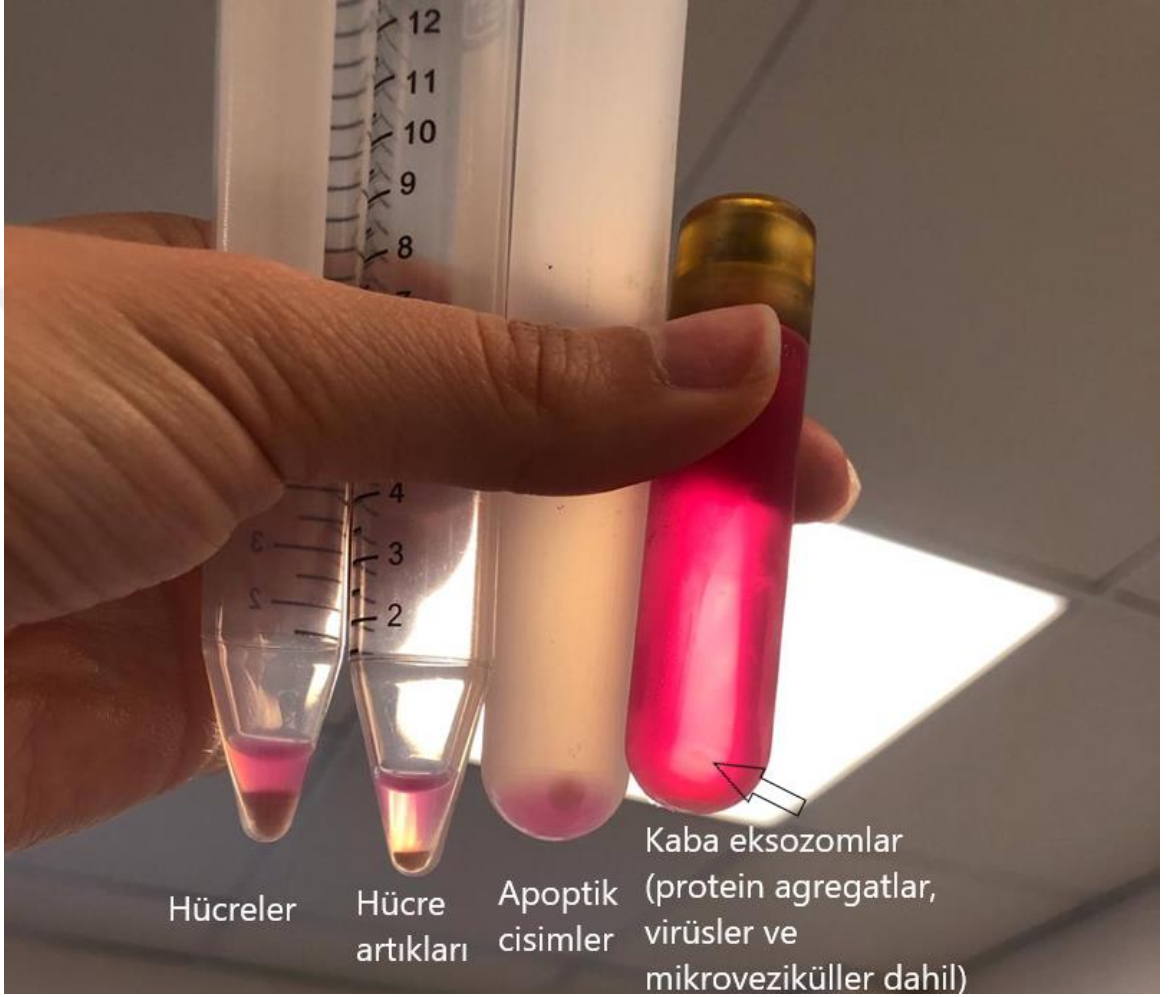
3.2.3.4 Dinamik ışık saçılımı ile eksozom boyutunun belirlenmesi ve miktarının belirlenmesi Eksozom peletleri 50 µL PBS içinde yeniden süspansiyon edilir ve 100'de 1 oranında seyreltilir. Her yakalamadan önce otomatik enjeksiyon için bir şırınga pompası kullanılır. Eksozom boyutu ve konsantrasyonu, Nanoplus cihazı ile (Particulate Systems) belirlendi. Her numune üç tekrar olacak şekilde, kaydedildi. Eksozomların sayısı, ortalama çap (nm), konsantrasyonları hesaplandı. Ortalamanın standart hatası tüm veriler için hesaplandı.

### 3.2.4 *In vitro* yara iyileşmesi / hücre hareketliliği analizi

Yara iyileşmesini 6 kuyulu hücre kültürü kabında fibroblast hücreleriyle gösterildi. Besi yeri olarak kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içerisine %10 oranında fetal sığır serumu (FBS) ve %1 oranında penisilin-streptomisin eklenerek besi ortamı hazırlanmıştır. Serum, 3.2.1.4 başlığında yer alan eksozom temizliği basamağından geçirildi. WI38 fibroblast hücre hattı, 6 kuyucuklu hücre kültürü kabında optimal bir konsantrasyonda ekildi. Plakalar, her veri toplama noktasında kuyunun aynı alanının görüntülediğinden emin olmak için plakanın mikroskop üzerinde hizalanmasını sağlamak için altta üç yatay çizgi ile işaretlendi. Hücreler 48 saat süreyle 37 ° C'de % 5 CO<sub>2</sub>'de tutuldu. Bu süre zarfında hücreler çoğalır ve %100 birleşmeye ulaştı, yani her bir kuyunun alt yüzeyi üzerinde bir hücre tabakası oluştu. Bir P200 pipet ucu kullanılarak her hücre tipinin üç kuyucuğunun ortasındaki düz bir çizgide bir çizik yapıldı. Yüzen hücreleri içeren ortam dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve hücre tek tabakası, çizik kenarlarını yumuşatmak için 1.0 mL önceden ısıtılmış ortam ile yıkandı. Her oyuk, 2.0 mL önceden ısıtılmış ortam ile dolduruldu. 0. saatte 0,5 µg/ml eksozom olacak şekilde DMEM ile birlikte hücre kültürüne eklendi. Çizik boyunca her nokta 4X büyütme kullanılarak bir ters mikroskop altında fotoğraflandı. Fibroblast arasındaki mesafeler (µm) cellSens görüntüleme programıyla hesaplandı. Hücreler 37 ° C'de, % 5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. Çizik yapıldıktan 24 saat sonra çekilen son fotoğraf ile aksi belirtilmedikçe 24 saatte bir fotoğraf çekildi.

## 4. BULGULAR

Ultrasantrifüjleme metoduyla elde edilen eksozomların karakterizasyon ve yara iyileşmesindeki sonuçları gösterildi.

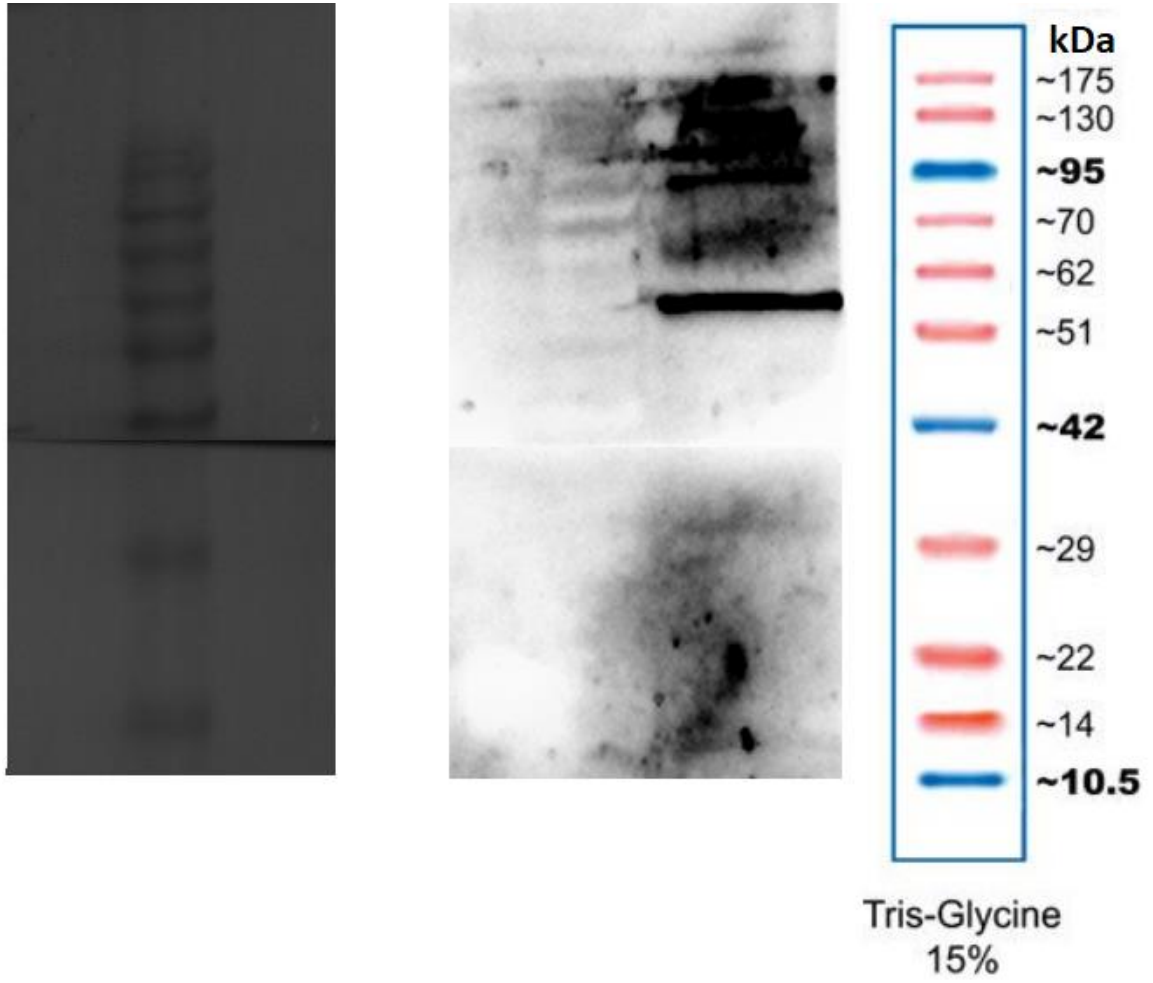


Şekil 8. Santrifüjleme adımlarından sırasıyla elde edilen pelletlerin gösterimi

### 4.1 Eksozom Karakterizasyon sonuçları

#### 4.1.1 Western Blot ile Eksozomal Antikor Tespiti

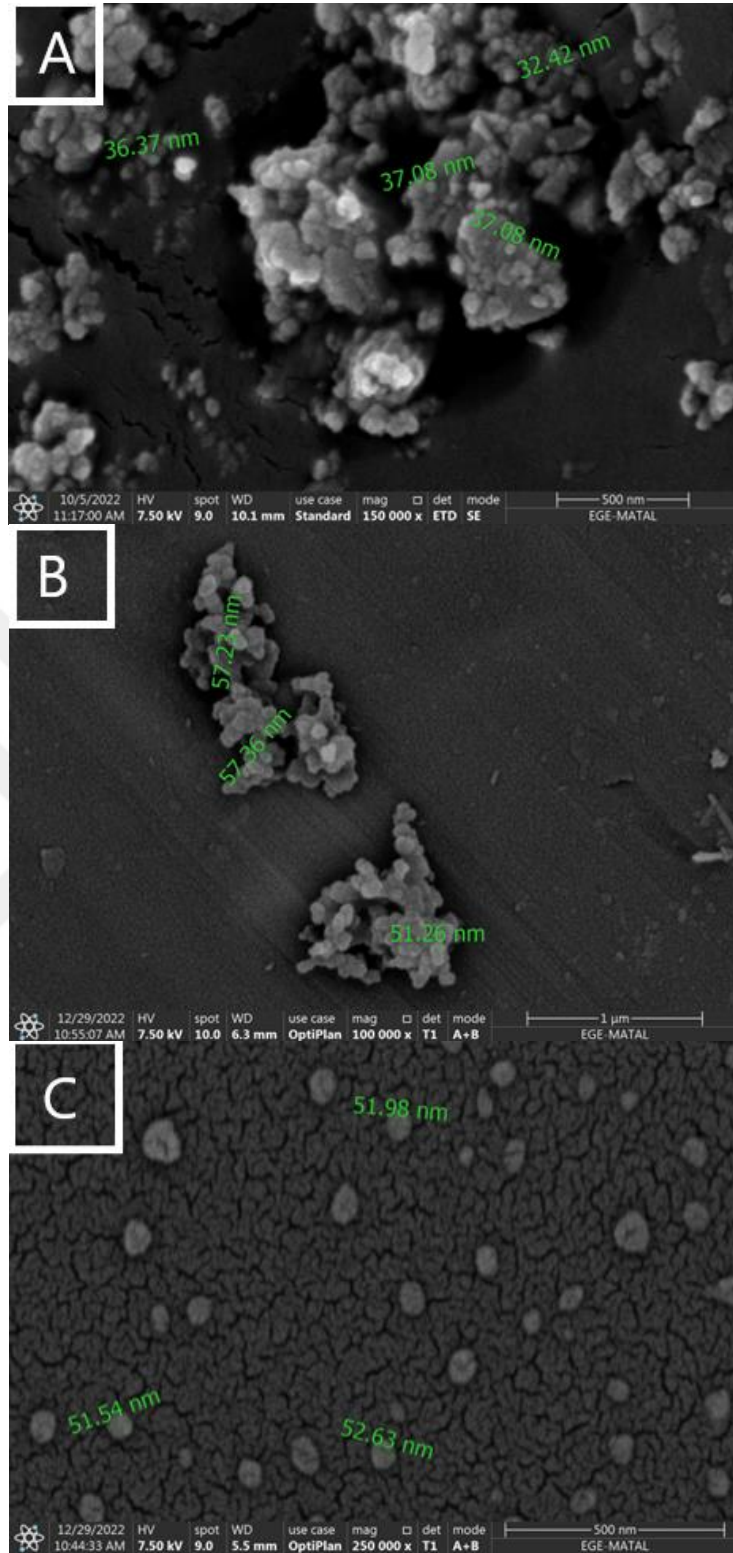
Eksozoma özgü antikor analizi yapılarak CD63'ün tespiti yapıldı. CD63/MLA1 poliklonal antikor (Bioss, USA) için verilen bilgilerde 63 kDa ile 48 kDa arasında yer aldığı belirtilmiştir. Yapılan western blot analizinde ~60 kDa ağırlığında bant elde edilmiştir.



Şekil 9. Western Blot ile CD63 antikorunun işaretlenmesi.

#### 4.1.2 Taramalı Elektron Mikroskobu ile Eksozom Görselleştirme

Eksozomların boyutu küçük olduğundan, standart bir ışık mikroskobu kullanılarak görselleştirilmeleri imkansızdır, bu nedenle eksozomları SEM kullanarak görselleştirilmiştir. Beklenen boyut aralığındaki eksozomlar tanımlanmıştır.



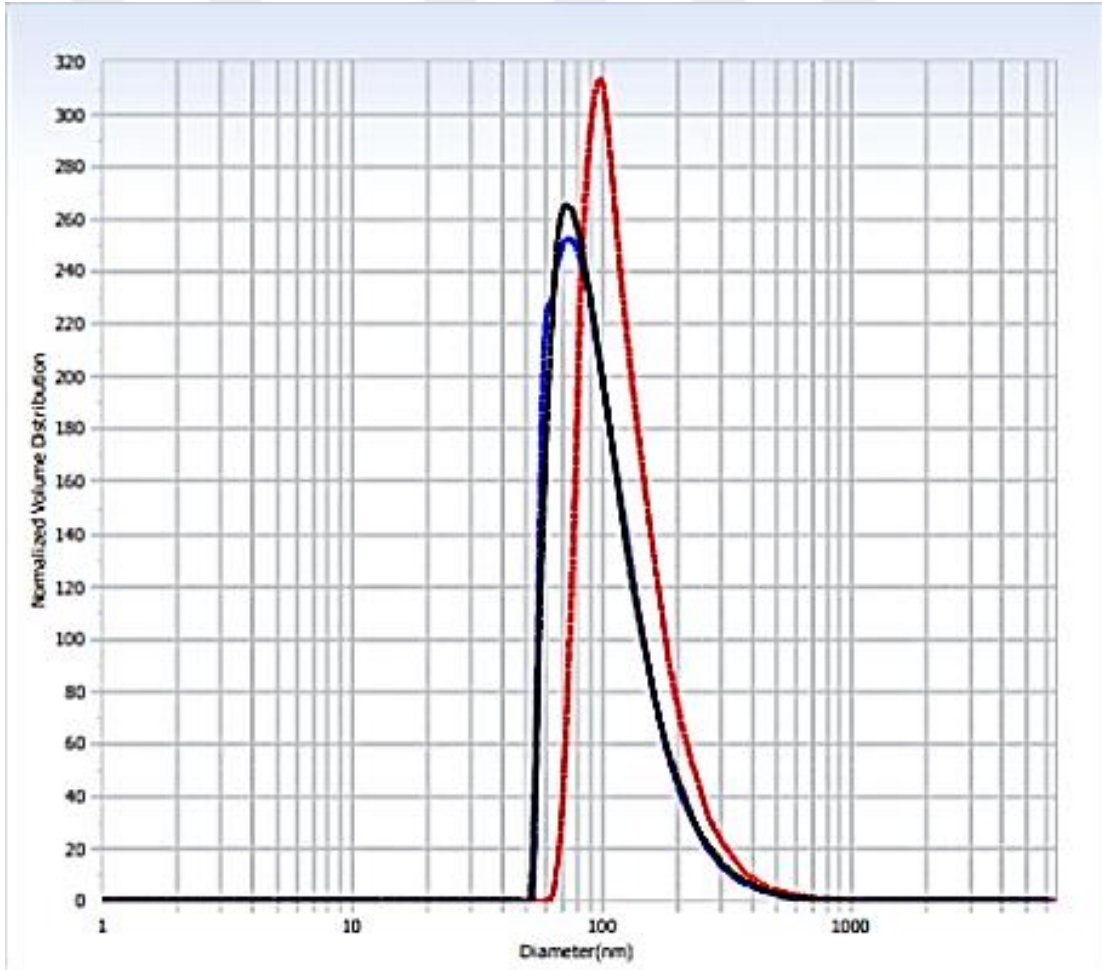
**Şekil 10.** SEM ile eksozom görüntülenmesi. (A) Trehaloz ile liyofilize edilen numune görüntüsü.. (B)Direkt PBS ile resüspanse edilen numune görüntüsü. (C) HMDS gibi çeşitli kimyasallarla hazırlanan numune görüntüsü.

#### 4.1.3 Dinamik Işık Saçılımı ile Eksozom Boyutu Belirleme

Western Blotting ile numune protein tanımlamasına ve SEM ile görselleştirmeye ek olarak, eksozomlar ayrıca DLS ile karakterize edildi.

Grafiklerde eksozom çaplarına karşılık eksozomların hacim, yoğunluk ve sayı ile dağılımı belirtildi. 3 ayrı renk (kırmızı, mavi, siyah) ile belirtilen eğriler, aynı numunenin 3 tekrar okumasını temsil etmektedir.

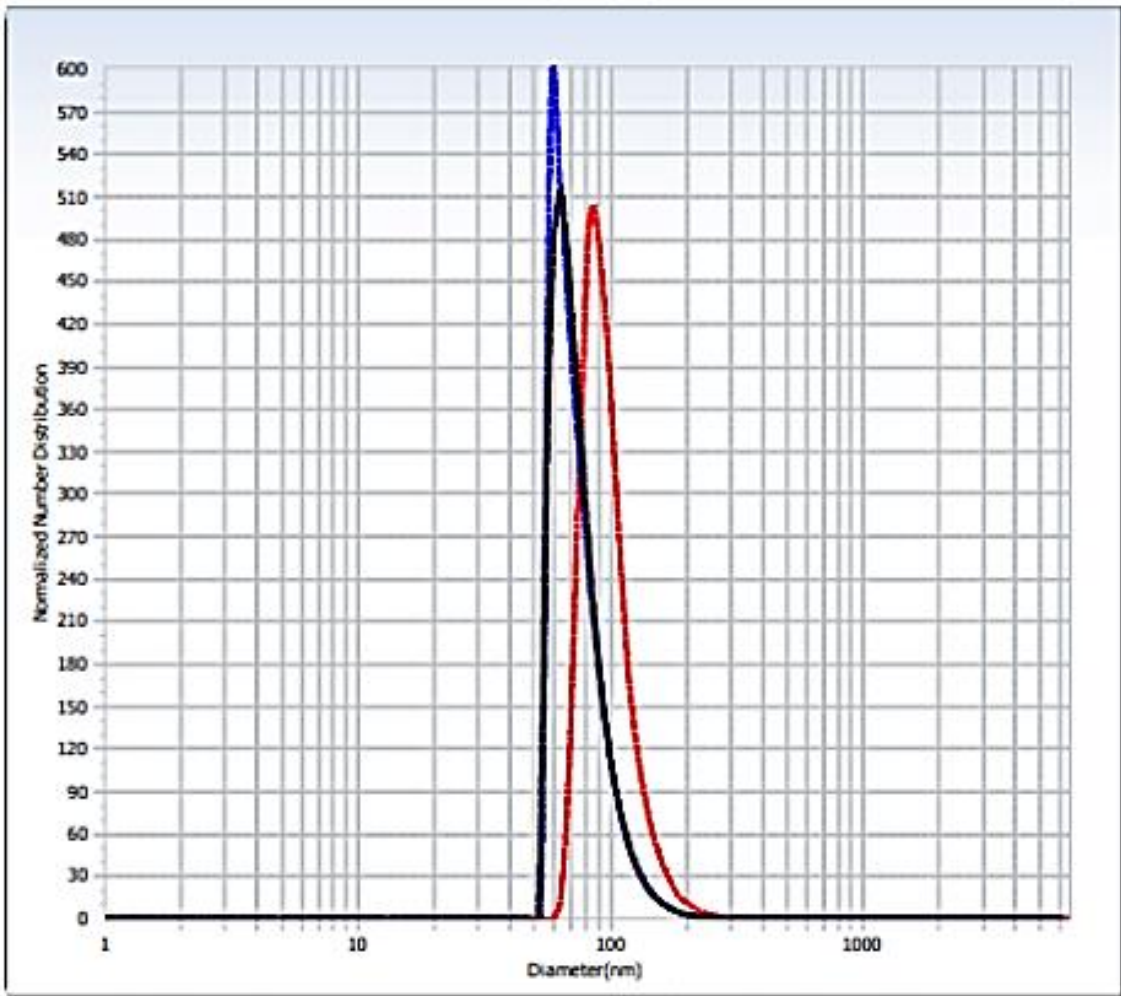
Not: Grafik okumalarda D (%10) ile belirtilen durumda, numunede %10'u belirtilen çaptan daha küçük, D (%50) numunede %50'si belirtilen çaptan daha küçük, D (%90) numunede %90'si belirtilen çaptan daha küçük olarak ifade edildi. Çap eksozom çapı ile karakterizedir.



Şekil 11.DLS ile Eksozom hacim dağılımı.

**Tablo 5.** DLS ile eksozom hacim dağılımı

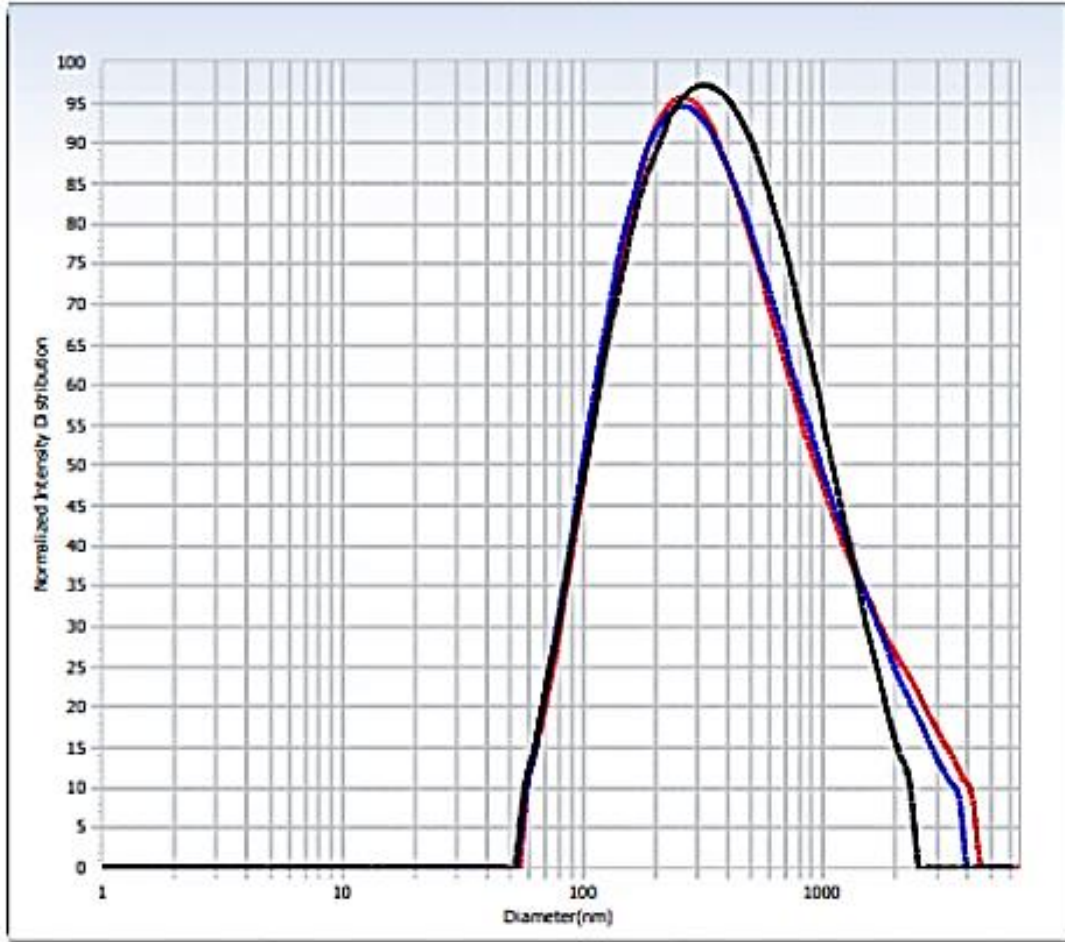
Eksozom Numunesi Tekrar Sayısı	Kümülatif Çap (nm)	PDI	Ortalama (nm)	D (10%)	D (50%)	D (90%)
Çap (nm)_1	350.0	0.224	110.6	60.2	87.0	169.4
Çap(nm)_2	347.9	0.239	108.9	59.2	86.5	165.8
Çap (nm)_3	362.4	0.242	134.1	78.7	108.4	197.5
Ortalama:	353.4	0.235	117.9	66.0	94.0	177.6



**Şekil 12.**DLS ile eksozom sayısı dağılımı

**Tablo 6.**DLS ile eksozom sayısı dağılımı

Eksozom Numunesi Tekrar Sayısı	Kümülatif çap (nm)	PDI	Ortalama (nm)	D (10%)	D (50%)	D (90%)
Çap (nm) 1	350.0	0.224	76.1	55.3	67.0	96.4
Çap (nm) 2	347.9	0.239	75.3	55.1	66.1	96.0
Çap (nm) 3	362.4	0.242	98.2	71.7	87.9	122.7
Ortalama:	353.4	0.235	83.2	60.7	73.7	105.0

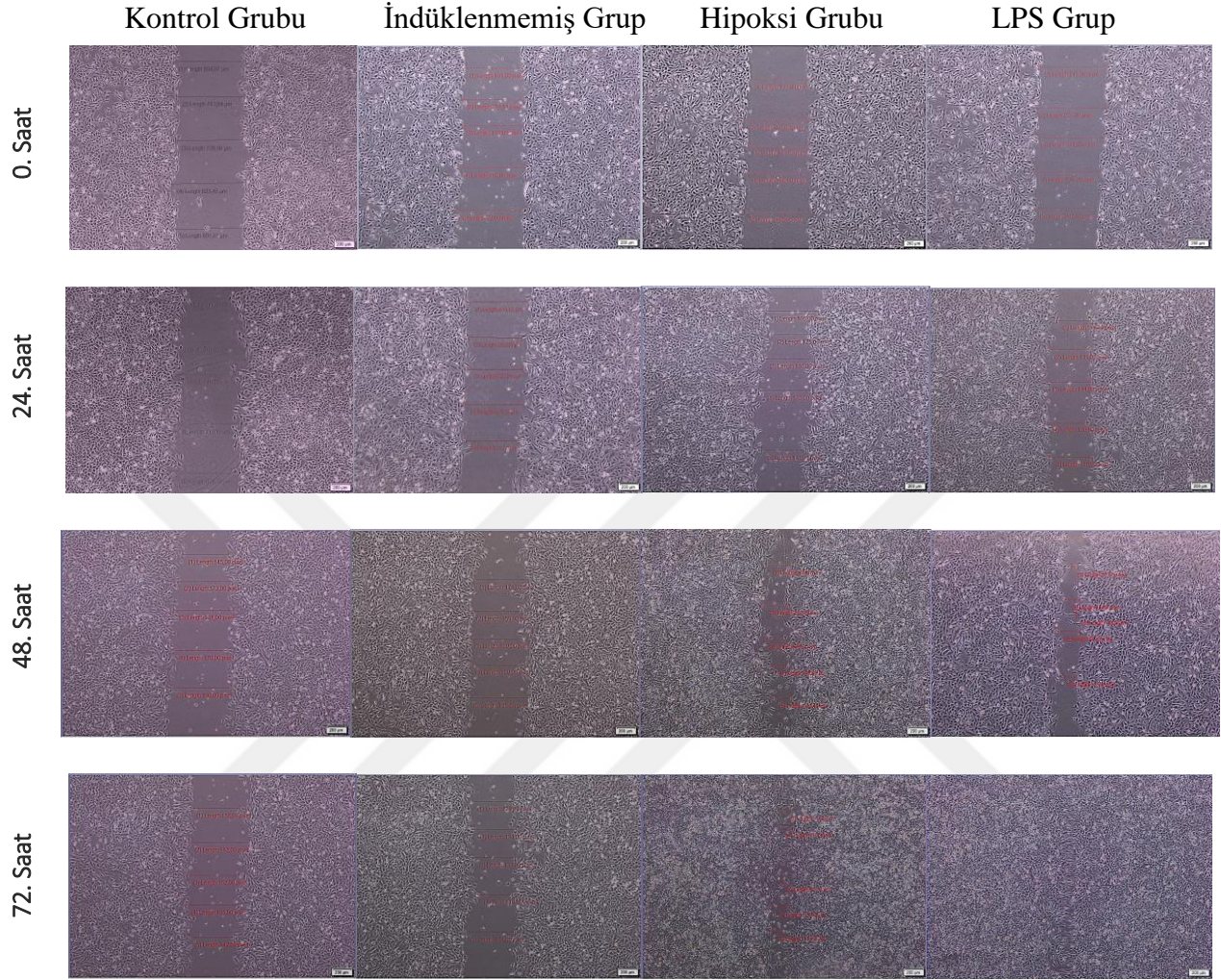


**Şekil 13.**DLS ile eksozom yoğunluğunun belirlenmesi

**Tablo 7.**DLS ile eksozom yoğunluğunun belirlenmesi

Eksozom Numunesi Tekrar Sayısı	Kümülatif Çap (nm)	PDI	Ortalama (nm)	D (10%)	D (50%)	D (90%)
Çap(nm)_1	350.0	0.224	482.0	109.3	324.8	1020.0
Çap(nm)_2	347.9	0.239	561.8	108.6	318.7	1275.5
Çap(nm)_3	362.4	0.242	605.2	111.5	324.8	1408.8
average :	353.4	0.235	549.7	109.8	322.8	1234.7

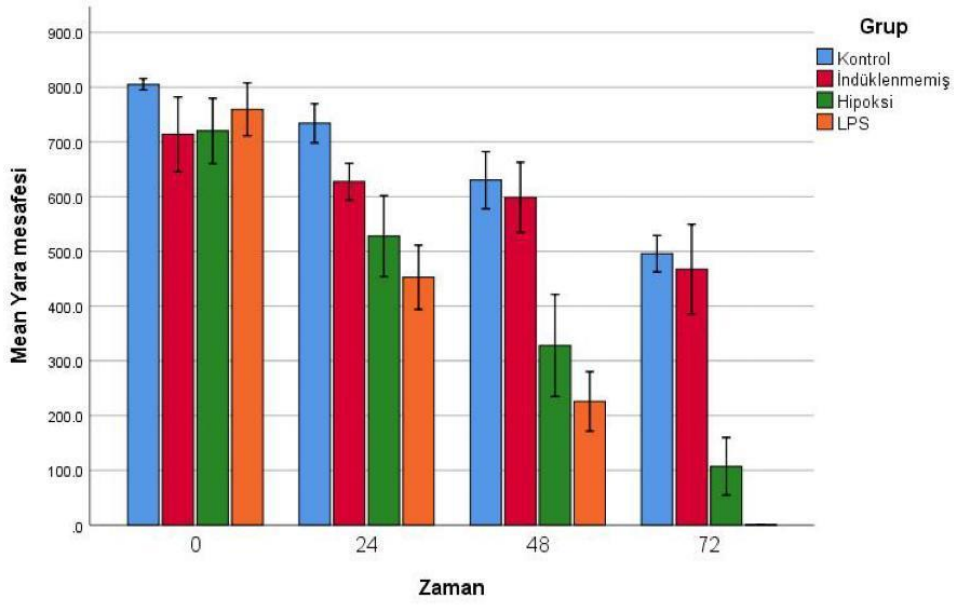
## 4.2 In vitro yara iyileşmesi / hücre hareketliliği analizi sonuçları



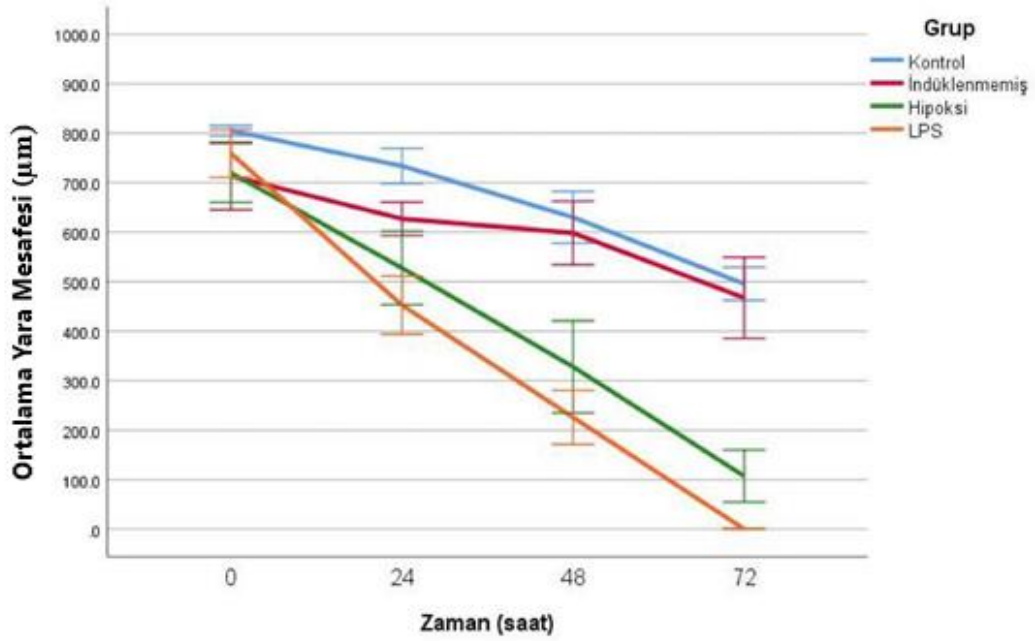
Şekil 14 .Kontrol grubu, indüklenmemiş grup, hipoksi grubu, LPS grubunun *in vitro* yara iyileşmesi deneyinde fibroblast göçünün 0, 24, 48,72. saatlerinde karşılaştırılması.

Tablo 8. In vitro yara iyileşmesi / hücre hareketliliği deneyinde yara iyileşme (%) oranlarının gösterimi

Grup	Kontrol Grubu		İndüklenmemiş Grup		Hipoksi Grubu		LPS Grubu	
	Ortalama (µm)	Yara İyileşme (%)	Ortalama (µm)	Yara İyileşme (%)	Ortalama (µm)	Yara İyileşme (%)	Ortalama (µm)	Yara İyileşme (%)
0	805,098		713,754		720,000		759,298	
24	733,940	8,838%	624,26	12,538%	527,719	26,706%	452,632	40,388%
48	630,194	14,135%	520,596	16,606%	327,998	37,846%	225,928	50,086%
72	495,762	<b>21,332%</b>	384,368	<b>26,168%</b>	107,240	<b>67,305%</b>	0,000	<b>100,000%</b>



Şekil 15. *In vitro* yara iyileşmesi / hücre hareketliliği analizi sonuçlarının karşılaştırılması.



Şekil 16. *In vitro* yara iyileşmesi deneyinde yara arası uzaklıkların gösterilmesi (µm).

*In vitro* yara deneyinde kontrol grubunda fibroblastlara hiçbir eksozom tedavisi uygulanmayan grubu ifade etmektedir. İndüklenmemiş grup hiçbir stres ile koşullandırılmadan elde edilen eksozomların fibroblast üzerindeki etkisinin gösterildiği gruptur. Ardından sırasıyla LPS ve hipoksi ile stres altında koşullandırılan eksozomların fibroblast üzerinde yara iyileşmesi üzerindeki etkisi karşılaştırılmıştır. Fibroblastlar arası yara mesafesi kısaldıkça yara iyileşmesi doğru orantılı olmuştur.

İyileşme oranları sırasıyla kontrol grubunda 21,332%, indüklenmemiş grupta 26,168%, hipoksi grubunda 67,305%, Lps grubunda 100,000% olarak hesaplanmıştır.

*In vitro* yara deneyinde sırasıyla LPS ile koşullandırılan hücreler ardından hipoksi ile koşullandırılan hücrelerin eksozomları, kontrol ve indüklenmemiş olan grubuna nazaran daha hızlı yara iyileşmesi elde edildi.



## 5.TARTIŞMA

Hücrelerden çeşitli ekstraselüler vezikül (EV) türlerinin salgılanması üzerine çalışmalar son 20 yılda giderek artmıştır. İlk çalışmalar, eksozomları, istenmeyen hücre sel bileşenlerin atılması için basit bir araç olarak görüyordu. Artık bunların, protein ve lipid homeostazı için önemli olan nükleik asitlerin, spesifik protein ve lipid repertuarlarının transferi yoluyla hücreler arası iletişimde çok önemli bir rol oynadıkları gösterilmiştir (C. He et al., 2018). Apoptoz sırasında apoptotik cisimlerin salınmasına rağmen (Hristov et al., 2004), sağlıklı hücrelerin aynı zamanda mikroveziküller salgılaması kavramı ancak son zamanlarda geniş çapta kabul görmüştür (Cocucci et al., 2009; György ve et al., 2011; Raposo ve Stoorvogel, 2013). Eksozom araştırmalarına olan ilgi, hücreler arası haberciler olarak benzersiz işlevleri, alıcı hücre biyoaktivitelerini değiştirme yetenekleri ve ayrıca hastalık teşhisi ve hedeflenen ilaç dağıtımındaki terapötik potansiyel nedeniyle son yıllarda çarpıcı bir şekilde artmıştır (X. Li et al., 2019).

Tez boyunca, "eksozom" terimi, kültür ortamının 0.22 µm filtrelerden geçirilmesi ve ardından 110.000 x g'de ultrasantrifüjleme yoluyla izole edilen, boyutu 200 nm'den küçük materyali (vezikülleri) belirtmek için kullanılmıştır.

Eksozom izolasyonu için literatürden belirlemiş olduğumuz ultrasantrifüjleme yöntemi kullanılarak deneyler yapılmıştır. Ultrasantrifüj işlemi sonucundaki ilk denemelerde eksozom pelleti rastlanılmamış olup, 110.0000 g'de kullanılan santrifüjdeki maksimum tüp hacmi 9.5 ml'dir. Bunun sebebini tüp hacminin az olmasıyla ilgili olduğunu düşünülmektedir. Strese maruz bırakılan BMSC'lerden eksozom izolasyon işlemi gerçekleştirdiğimizde stres seviyesiyle birlikte eksozom pelleti-çok küçük de olsa- rastlanılmıştır (Bkz. Şekil 8). Tablo 1'de çeşitli eksozom izolasyon yöntemleri tanımlanmaktadır. Eksozom izolasyonu için diğer yöntemler de tercih edilebilir. Sıralı santrifüj adımlarıyla eksozomun eldesi başarıyla sonuçlanmıştır. Günümüzde gerekli miktarda eksozomu hızlı bir şekilde izole edebilmek mümkün olmadığı ve bu alandaki gelişmeler yakından takip edilmeli ve kısıtlamaları gelecekte aşılacağı ümit edilerek, bu alanda yeni gelişmeler olacağı göz ardı edilmemelidir. Farklı bireylerden elde edilen eksozomlar karşılaştırılmasıyla ilgili farklılıkların olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bir dizi EV'den BMSC'den izole edilen

eksozomları tanımlamak ve eksozomların kalitesini ve saflığını standartlaştırmak için belirli belirteçler henüz mevcut değildir.

Bir 'eksozom' tanımı son birkaç yılda belirgin hale geldi, artık yaygın olarak hücrelerden salgılanan ve özellikle endozomal kökenli 30-150 nm çapında veziküller olarak kabul ediliyorlar (Gould ve Raposo, 2013). Farklı EV türlerini ayırt etmek için mevcut yetersiz araçlar nedeniyle, 30-150 nm çapındaki vezikülleri eksozomlar olarak tanımlamak oldukça yanıltıcıdır çünkü bu boyut aralığındaki veziküllerin endozomdan kaynaklanmaması mümkündür. Mikroveziküller ve apoptotik cisimler de bu aralık içinde olabilir. Eksozom karakterizasyonu, eksozom araştırma alanı için büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir (Théry et al., 2006). Bu sorunun üstesinden gelmek için, eksozomlar en iyi çoklu tekniğe dayalı olarak karakterize edilir (Yáñez-Mó et al., 2015). Kısmen küçük boyutlarıyla sınırlı olan eksozom karakterizasyon yöntemlerinin optimizasyonu devam etmektedir. Alanın uzmanları tarafından üzerinde anlaşmaya varılmış standart bir yöntem yoktur (Raposo ve Stoorvogel, 2013; Taylor, 2015). Bunun yerine, eksozom karakterizasyonu, küçük örnek miktarlarda eksozomlarla (~50 µL) mümkün olduğu kadar çok teknik kullanılarak gerçekleştirilir. Bu genellikle fonksiyonel deneyler için kalan eksozom örneğinin minimum hacmini bırakır.

Ultrasantrifüjleme yöntemiyle izole edilen eksozomlar; WB, SEM, DLS ile karakterize edildi. SEM bulgularımızda 30-150 nm boyutundaki veziküllerin varlığı saptanmıştır. Farklı metotlarla numune hazırlandığında eksozomların görüntüleri birbirinden farklı olmuştur (Bkz. Şekil 10). HMDS ile hazırlanan yöntemde daha net bir görüntü elde edildi.

DLS ile eksozomun sayısı, konsantrasyonu ve boyutu ölçülmüştür. Burada sadece 30-150 nm arasında bir pikin yanı sıra 300 nm arasında veziküllerin varlığı da saptanmıştır (Bkz. Şekil 11, 12, 13). Bunların diğer hücre dışı veziküllerden olan multiveziküllerin boyutlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Eksozomların boyutu, kullanılan metodolojiye göre değişir. Genel olarak, elektron mikroskobu ile tahmin edilen boyutlar, numune hazırlama sırasındaki dehidrasyon nedeniyle genellikle daha küçüktür. Örneklerin susuz kalmadığı dinamik ışık saçılımı veya nanoparçacık izleme analizi gibi metodolojilerle, boyutlar daha büyüktür ve 100-200 nm aralığındadır.

Western Blot analizinde CD9 ve CD63 olarak bilinen eksozomlara özgü olan antikörlerin tespiti western blot yöntemiyle yapılmıştır. Western blot bantlarına bakacak olursak CD63'e karşılık gelen kDa'da CD63'ün konumlandığını görmekteyiz. CD63, yaklaşık olarak 60 kDa bulunmuştur (Bkz. Şekil 9). Fakat CD9 antikörünü okumamıştır. Bunun sebepleri olarak

antikorun depolanma şartlarında problem olması, deney sırasında kişiden kaynaklanan problemlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yara iyileşmesi kapsamında tetraspanin olarak bilinen CD9 ve CD63 belirteçleri haricinde eksozomun sahip olduğu birçok belirtecin rolü büyüktür. Sadece tetraspaninlerle sınırlı kalınmaması, diğer sinyal yollarının araştırılması önemlidir.

Yara iyileşmesi, *in vitro* olarak fibroblastların 6 kuyulu hücre kaplarında P200 ile çizilmesiyle yara modeli oluşturuldu. Fibroblastların göçü 0,24,48,72 saatlerinde fotoğraf çekildi (Bkz. Şekil 14). Hücre motilitesini ölçmek için mevcut diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında *in vitro* yara deneyinin bir takım sınırlamaları vardır. Ana dezavantaj, doğrudan fizyolojik ilişkinin zayıf olmasıdır (Cory, 2011). Ek olarak, tahlil nispeten uzundur, çoğu hücre hattı için hücre tek tabakasının büyümesi için 48 saat ve ardından çiziklerin kapanması için 48 saat daha gerekir (Liang et al., 2007). Diğer bir dezavantaj ise aynı boyuttaki çizikleri iki kez oluşturmanın mümkün olmamasıdır, bu nedenle tüm çiziklerin genişlikleri farklıdır (Liang et al., 2007). Çizik genişliğinin hesaplanması sırasında bunu hesaba katmasına rağmen (verileri zaman = 0 değeri %100'e eşit olacak şekilde normalleştirerek), bu, aynı çizik boyunca birden çok nokta ölçülse bile tutarlı sonuçlara ulaşılmasını engellemekte ve çizikler arasında farklılık yaratmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, hata miktarını kabul edilebilir bir düzeye indirmek için gerekli tekrar sayısını elde etmek zordur. Ayrıca hücre tek tabakasının çizilmesi, yaranın kenarındaki hücrelere zarar verir ve tek tabakadaki hücreler aşırı kalabalık olabilmektedir. Bu faktörlerin her ikisi de normal hücre göçü aktivitesini önleyebilmektedir (Sammak et al., 1997). Bu sınırlamalara rağmen, *in vitro* çizik tahlili, kurulması kolay, ucuz, herhangi bir özel malzeme gerektirmediği ve en önemlisi hücre hareketliliğinin iyi bir ölçüsünü sağladığı için hücre göçünün analizi için tercih edilen yöntemdir (Liang et al., 2007). 72 saatin sonunda fibroblast hücrelerinin göçüyle birlikte oluşturulan yara modelinin kapanması başarılı bir şekilde sağlandı.

Yara iyileşmesindeki mekanizmaları hemostaz, inflamatuvar, proliferatif, migrasyon ve doku onarımını sağlamak için dokunun yeniden şekillenmesi olarak tanımlanmaktadır. Oluşturulan çizik deneyinde daha çok inflamatuvar ve migrasyon aşamaları ön plandadır. P200 pipet ucuyla verilen mekanik hasar hücre göçünü engelleyecek bir yığı oluştururken, hücreler arası bağlantıyı kopardı. Enflamatuvar yanıt; enfeksiyonla savaşmak, hücre kalıntılarını ortadan kaldırmak ve böylece hasarlı dokuyu onarmak için faydalıdır. Zayıf bir enflamatuvar ortam, kronik yaraların gelişimi için önemli bir risk faktörüdür (Singer & Clark, 1999). Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) immünomodülatör bir rol oynamakta ve eksozomları serbest bırakarak

inflatuar yanıtları düzenlemektedir. Enflatuar sürecin düzenlenmesi, eksozomların çeşitli proteinler ve RNA bakımından zengin olması gerçeğiyle yakından ilgilidir (Qiu et al., 2020). Enflamasyonla ilişkili biyomoleküllerin EV aracılı bu tür dengelenmesi, uzun süreli enflamasyon dönemlerinin azalmasına yol açabilmektedir. Bu tür bulgular, enflamasyonu bastırmada mezenkimal kök hücre kaynaklı ekstraselüler veziküller (MSC-EV) 'lerin birkaç yeni mekanizmasını önermektedir (X. He et al., 2019).

Terapide kullanılmadan önce MSC'lerin hipoksi, enflatuar uyarıcı ve diğer faktörler/koşullar tarafından ön koşullandırılması, MSC'leri hayatta kalmaya ve transplantasyondan sonra daha iyi işlev görmeye ve yerel veya sistemik bağışıklık yanıtı düzenlemelerini geliştirmeye hazırlamak için yeni bir stratejidir (Saparov et al., 2016). Tez kapsamında BMSC hücrelerinden LPS ve hipoksiyle ön koşullandırma yapıldıktan sonra eksozom izolasyonu yapıldı. Hiçbir stres koşulu olmadan izole edilen eksozomların (indüklenmemiş grubu) yara iyileştirme performansının, LPS ve hipoksi grubuna kıyasla daha yavaş kapandığı görüldü. *in vitro* yara iyileşmesi deneyi sırasında fibroblast hücrelerine verilen mekanik hasarın ortadan kaldırılması, biriken ölü hücrelerin kaldırılıp yerine yeni hücrelerin migrasyonu sağlandı. MSC'nin belirli maddelerle ön koşullandırma altında parakrin etkisini önemli ölçüde artırabilmesi dikkat çekicidir. Kronik enflamasyon ve yara iyileşmesi için LPS ve hipoksiyle önceden koşullandırılmış grubun, kontrol ve indüklenmemiş gruplarına nazaran daha iyi bir anti-inflatuar yetenek sergilediğini göstermiştir. 72. saatin sonunda ise hücrelerin büyük oranda göç edip oluşturulan yara bölgesinin kapandığı gözlenmiştir.

Oksijen içeriği, MSC'lerin çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden kritik bir faktördür. *In vitro* kültür sırasındaki normoksik durumun (%21 O<sub>2</sub>) aksine, MSC'lerin çoğu vücutta hipoksik bir ortamda (%2-8 O<sub>2</sub>) bulunur (Xue et al., 2018). Hipoksi altında kültürlenmiş MSC'lerin, normoksi altında kültürlenmişlere kıyasla daha yüksek proliferatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Nekanti et al., 2010). Hipoksi tedavisi, MSC'lerin kök hücre özelliklerini değiştirebilir ve sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasını etkileyebilir. Daha da önemlisi, hipoksi ile şartlandırılmış BMSC'den türetilen eksozomlar, gelişmiş bir anjiyogenezi teşvik edici etki gösterir (Kinnaird et al., 2004).

Son birkaç yıl içerisinde, LPS ile önceden koşullandırılmış olan mezenkimal kök hücrelerin (LPS ön-MSCLer) artmış trofik destek ve iyileştirilmiş rejeneratif ve onarım özellikleri dahil olmak üzere gelişmiş parakrin etkiler gösterdiği ortaya çıkmıştır. Çalışmalar, MSC'lerin farmakolojik ajan lipopolisakkaride (LPS) maruz kalmasının, sert enflatuar ortama karşı

savunma için trofik etkilerini ve fonksiyonel özelliklerini artırabileceğini bulunmuştur (Ti et al., 2015).

MSC-EV'ler yara bölgesine fibroblast göçünü etkilemektedir (Naruskaitė et al., 2021). MSC-EV'ler proliferasyon aşamasında, esas olarak ekstrasellüler matriks, fibroblastlar, inflamatuvar hücreler ve kan damarlarından oluşan granülasyon dokusu oluşmaktadır (Sonnemann & Bement, 2011). MSC-EV'ler sadece yara bölgesine hücre göçünü teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda granülasyon dokusu oluşumunu da iyileştirmektedir. Ek olarak, Wang ve ark. (2019), *in vitro* fetal dermal MSC-EV'lerin fibroblast göçünü ve proliferasyonunu desteklediğini ve kolajen, elastin ve fibronektinin mRNA ekspresyonunda bir artış olarak saptanan fibroblast aktivitesini artırdığını göstermiştir. Aktive edilmiş fibroblastların rejeneratif etkileri olduğundan, yazarlar *in vivo* olarak, bir fare yara modelinde EV ile tedavi edilen grubun daha yüksek kolajen birikimine, ekstrasellüler matriks sentezine ve daha hızlı yara iyileşme oranına sahip olduğunu araştırdılar (X. Wang et al., 2019).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, çoğalma aşaması faaliyetlerine katılan birkaç yeni MSC-EV kargosunu göstermiştir. Daha önce Wang ve ark. (2019) çalışma, EV'lerle tedaviden sonra fibroblastların, yara iyileşmesiyle ilişkili hücre proliferasyonu ve göçünün düzenlenmesinden sorumlu olan Notch yolunun bileşenlerinin ekspresyonunda artış gösterdiğini ortaya koymuştur (X. Wang et al., 2019). Ek olarak, EV'lerde bu yolun bir ligandı olan Jagged 1 tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, MSC-EV'lerin, Jagged 1'i aktararak Notch sinyal yolu yoluyla fibroblast aktivitesini desteklediğini göstermiştir.

Shabbir ve ark. BMSC-EV'lerin hücre döngüsü ilerleme faktörlerinin (c-myc, siklin A1, siklin D2), büyüme faktörlerinin (HGF, IGF1, NGF, SDF1) ve sitokinlerin (IL-6) ekspresyonunu indükleyerek yara iyileşmesini modüle ettiğini belirlemiştir (Shabbir et al., 2015). Yazarlar, MSC-EV'lerin STAT3 içerdiğini ve yara bölgesinde hücre migrasyonu, proliferasyonu ve anjiyogenezden sorumlu olan söz konusu genlerin ekspresyonunu ve sinyal yollarının aktivasyonunu indükleyen alıcı hücrelere transfer edebildiğini anladılar. Tüm bu bulgular, alıcı hücrelere birden fazla yükün aktarılması nedeniyle farklı proliferasyonu teşvik eden sinyal yollarına katılan EV'lerin olduğunu göstermektedir (Naruskaitė et al., 2021).

AdMSC-EV'lerde ve BMSC-EV'lerde miRNA'ların karşılaştırılması, 14 miRNA'nın yalnızca BMSC-EV'lerde, 70 miRNA'nın AdMSC-EV'lerde bulunduğunu ve her iki EV tipinde 99 miRNA'nın tespit edildiğini gösterdi. Bu verilere dayanarak, miRpath aracını kullanan biyoinformatik analiz, her iki EV grubundan miRNA'ların birkaç sinyal yolağına dahil olduğunu gösterdi: daha önce tartışılan P13K/Akt aşağı akış sinyal kaskadını tetikleyen EGFR

reseptörü (ERBB2) sinyal yolu; ECM-reseptör etkileşimi ve hücre yapışmasını ve göç aktivitelerini düzenleyen yapışık bağlantı yolları ve hücre canlılığını kontrol eden MAPK sinyal yolu, farklılaşma ve proliferasyonu değiştirmektedir. BMSC-EV'lerde, tespit edilen proteinler, hücre yapışması (integrin ve kaderin) ve metabolik süreçlerle bağlantılıdır. Birlikte, bu sonuçlar EV yükünün belirli biyolojik aktiviteyi sürdürmede hayati bir rol oynadığını ve ortaya çıkan kargo farklılıklarının farklı EV tiplerinde terapötik etkilerle ilişkili olduğunu doğrulamaktadır (Pomatto et al., 2021). Genel olarak, tüm bu makaleler, MSC-EV'lerin tüm farklı proliferatif aşama süreçlerine katıldıkları için yara iyileşmesini hızlandırmak için bir araç olarak kullanılmasını önermektedir.

Ek olarak yazarlar, BMSC-EV'lerin TGF  $\beta$ 1/Smad sinyal yolunu inhibe ederek yara iyileşmesine katıldığını bulmuşlardır; PBS kontrolüne kıyasla MSC-EV'lerle tedavi edilen grupta TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3, Smad4'ün mRNA seviyelerinde azalma ve TGF- $\beta$ 3 ve Smad7 seviyelerinde artış vardı. Genel olarak, TGF- $\beta$ 1 fibrozis ile ilişkilirken, anti-fibrotik veya skarsız aktiviteye sahip TGF- $\beta$ 3, yara onarımı ile ilgilidir. Bu biyomoleküller, yara iyileşmesi sırasında epidermal ve dermal hücre hareketini düzenlemede hayati bir role sahiptir. Hatta TGF- $\beta$ 1 ve TGF- $\beta$ 3 ekspresyonundaki değişikliklerin izsiz yara onarımına yol açabileceği varsayılmaktadır. Genel olarak, MSC-EV'ler doku yeniden şekillenmesini kolaylaştırabilir, fibroblast farklılaşmasını kontraktıl miyofibroblastlara aktive edebilir ve cilt uzantı oluşumunu hızlandırabilir. Ayrıca, elastikiyet ve bariyer bütünlüğü gibi derinin mekanik özelliklerini geliştirirler. Son olarak, MSC EV'ler yara izlerini azaltır ve izsiz yara iyileşmesini destekler (L. Wang et al., 2017).

Uygulama alanlarını tanımlamak ve etkili dozlar BMSC'den izole edilen eksozomların alanındaki çalışmalar emekleme aşamasında olduğu için, eksozomların yara iyileşmesine katkıda bulunduğu biyogüvenlik, etkinlik, tekrarlanabilirlik, üretim potansiyelleri, oluşum mekanizmaları ve biyolojik fonksiyonları bugüne kadar açıklığa kavuşturulmamıştır ve daha fazla bilgi gerekmektedir. Hücre bazlı tedaviye bir alternatif olarak yaklaşımı klinik bir gerçekliğe dönüştürmek için yoğun araştırma gerekmektedir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Her onarım aşamasının süreci genellikle kesin ve programlanmış bir şekilde gerçekleşmektedir. Zayıf yara iyileşmesi, gecikmiş iyileşme ve iyileşmeme olarak ayrılabilir. Travmaya yanıt ve doku onarımı, organizmaların son derece önemli savunma mekanizmalarıdır ve çeşitli hücre içi ve hücre dışı yolları, enflamatuvar yolları, bağışıklık sistemi, kan pıhtılaşma kaskadı ve diğer karmaşık süreçleri içeren hayatta kalma becerileridir. Yara iyileşmesi, hastalar ve hekimler için ciddi bir psikolojik, fiziksel ve finansal yük oluşturmaktadır ve karşı karşıya olduğumuz küresel bir zorluğu göstermektedir. Hiç şüphesiz, doku rejenerasyonu ve kök hücre mühendisliği açısından yara iyileşmesi için yeni bir yöntemin tanımlanması klinik araştırmalarımızın odak noktasıdır. Kemik iliği kök hücrelerinin yara iyileşmesi üzerindeki biyolojik etkisi önceki çalışmalara göre doğrulanmıştır.

Bu tez kapsamında BMSC'den izole edilen eksozomların, bir serbest hücre tedavisi olarak yara onarımında potansiyel uygulamayı ortaya koymaktadır. BMSC'lerden elde edilen eksozomlar, düşük immünojenisite, bol kaynak, kolay elde edilmesi, kolay saklanması, kanda veya vücutta stabil ve güvenilir olma avantajlarına sahiptir. Bir biyo-taşıyıcı olarak, eksozomlar çeşitli biyoaktif bileşenleri salgılar ve taşır, bir dizi fizyolojik ve patolojik sürece katılır, moleküler gen seviyesinde sinyal iletiminde rol oynar ve doku yenilenmesi, bağışıklık düzenlemesi ve yara onarımında yer almaktadır. BMSC'den izole edilen eksozomların, ebeveyn kök hücrelerinin parakrin etkisinin bir taşıyıcısı olarak türetilmiş kök hücrelerin işlevini içerir ve özel proteinleri, mesajcı RNA'yı, mikro-RNA'yı ve diğer sinyal moleküllerini ve sitokinleri iletmek için transkripsiyon ve translasyon seviyesinde hedef hücreler üzerinde hareket etmektedir. Eksozomlar kolayca ayrılır ve işaretlenir. Yüksek hassasiyetli protein tespiti ve analizi sayesinde, eksozomları izleyebilir, hedef hücrelerin durumunu izleyebilir, prognozu yargılayabilir ve moleküler düzeyde etki mekanizmasını keşfedebiliriz. BMSC'den izole edilen eksozomların yara iyileşmesindeki etkisini araştırmak, insanlarda yara onarımı anlayışımızı geliştirebilir ve sınırlı rejeneratif kapasiteyi iyileştirmek için hedeflenebilecek olası molekülleri veya yolları belirlemek önemlidir. BMSC'den izole edilen eksozomların işlevinin daha iyi anlaşılması, serbest hücre tedavisinin uygulanması ve rejeneratif tıp için güçlü terapötiklerin geliştirilmesi için büyük umut vaat ediyor.

İki farklı tipte stres etkeni kullanılarak stres uygulanan kemik iliği hücre hattından izole edilen eksozomların, *in vitro* yara iyileşmesi deneyinde kıyaslanması yapılmıştır. Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), bir dizi hücre tipine farklılaşma, doku rejenerasyonuna katılma ve çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler üreterek hasarlı dokuları onarma yetenekleri ve benzersiz immün ayrıcalıkları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. MSC'lerin terapide kullanılmadan önce hipoksi, enflamatuar uyaran veya diğer faktörler/koşullar tarafından *ex vivo* olarak ön koşullandırılması, MSC'leri sert ortamda hayatta kalmaya ve yerel bağışıklık tepkilerinin düzenleyici işlevlerini geliştirmeye hazırlayan adaptif bir stratejidir. Bu, stres koşullarının eksozomlar üzerinde etkisinin gösterildiği önemli bir çalışmadır. Sunulan sonuçlar daha fazla araştırma için büyük bir potansiyele sahiptir. Gelecekteki deneyler, farklı çevresel stresör türlerinin (hipoksi ve LPS tedavisi ile sınırlı değil) eksozom bileşimi üzerindeki etkisini ve farklı stres eksozom türlerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmaya odaklanmalıdır. Stres eksozomlarına yanıt olarak meydana gelen karakteristik değişikliklerden sorumlu hücresel mekanizmayı tanımlamak birincil derecede önemlidir.

Gelecekte Neler Yapılabilir?

Eksozomlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi çeşitli biyomoleküller içeren yaygın zara bağlı nanoveziküllerdir. Eksozomlar, ekzositoz yoluyla hücrelerden elde edilir, hedef hücreler tarafından yutulur ve biyolojik sinyalleri yerel veya uzak hücreler arasında aktarabilir. Eksozom salgılanması, hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde yer alan ve hem eksozomal yüzey moleküllerini hem de içeriğini belirleyen kurucu bir fenomendir. Bu nedenle, biyobelirteçler, aşılarda ve ilaç taşıyıcıları olarak eksozomlardan yararlanabilir ve bunları terapötik müdahaleler için rasyonel olarak değiştirebiliriz. Bununla birlikte, eksozomları doğru, verimli ve seçici bir şekilde tanımlamak, izole etmek ve ölçmek hala bir zorluktur. Eksozomlarla ilgili daha ileri çalışmalar, onların transkripsiyonel tıptaki potansiyellerini keşfedecek ve etkili klinik teşhis ve tedavi stratejilerinin yaratılması için yeni yollar sağlayacaktır. Bu uygulamalarda eksozomların kullanımını eksozom teranostikleri olarak adlandırılabilir.

Eksozom boyutunun ve kargonun heterojenliği, menşee hücrelerinin durumunu ve türlerini yansıtmaktadır. Bu nedenle, eksozomlar, hastalık teşhisi ve hatta fetal cinsiyet tayini için biyobelirteçler olarak kullanılabilir. Eksozomlardaki yüzeye bağlı proteinler, kaynaklandıkları hücrelerin plazma zarlarından kaynaklandığından, antijen sunan hücreler, dendritik hücreler ve tümör hücreleri tarafından salınan eksozomlar, aşı geliştirmede kullanım için umut vericidir. Ayrıca, eksozomlar, çift katmanlı membranları ve nano ölçekli boyutları nedeniyle kompleman fiksasyonu veya makrofajlar tarafından yüklerini temizlemeden veya hasardan

koruyabilir, böylece dolaşım yarı ömürlerini uzatır ve biyolojik aktivitelerini iyileştirir. Bu nedenle, eksozomlar, hastalığın tedavisi için ilaç dağıtım kesecikleri olarak potansiyel olarak kullanılabilir. Ayrıca, eksozom mühendisliği, yani bu nano ölçekli hücre dışı lipid çift katmanlı veziküllerin kimyasal veya biyolojik modifikasyonu, eksozomların doğuştan gelen terapötik kapasitesini geliştirmek veya genişletmek için fırsatlar sağlayabilir.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ansell, D., Kloepper, J., Thomason, H., ... R. P.-J. of I., & 2011, undefined. (n.d.). Exploring the “hair growth–wound healing connection”: anagen phase promotes wound re-epithelialization. *Elsevier*. Retrieved December 18, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15351654>
- Bartolucci, J., Verdugo, F. J., González, P. L., Larrea, R. E., Abarzua, E., Goset, C., Rojo, P., Palma, I., Lamich, R., Pedreros, P. A., Valdivia, G., Lopez, V. M., Nazzal, C., Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Brobeck, M. J., Patel, A. N., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2017). Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: A phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD trial [Randomized clinical trial of intravenous infusion umbilical cord mesenchymal stem cells on cardiopathy]). *Circulation Research*, *121*(10), 1192–1204. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310712/-/DC1>
- Bian, D., Wu, Y., Song, G., Azizi, R., & Zamani, A. (2022). The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review. *Stem Cell Research & Therapy* *2022* *13:1*, *13*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02697-9>
- Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J. M., Fries, J. W. U., Tiemann, K., Bohlen, H., Hescheler, J., Welz, A., Bloch, W., Jacobsen, S. E. W., & Fleischmann, B. K. (2007). Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*, *110*(4), 1362–1369. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-12-063412>
- Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2018). Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization. *International Journal of Pharmaceutics*, *553*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.032>
- Chen, T. S., Arslan, F., Yin, Y., Tan, S. S., Lai, R. C., Choo, A. B. H., Padmanabhan, J., Lee, C. N., de Kleijn, D. P. V., & Lim, S. K. (2011). Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *Journal of Translational Medicine*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-47/FIGURES/5>
- Cheng, H., Fang, H., Xu, R. D., Fu, M. Q., Chen, L., Song, X. Y., Qian, J. Y., Zou, Y. Z., Ma, J. Y., & Ge, J. B. (2019). Development of a rinsing separation method for exosome

- isolation and comparison to conventional methods. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(12), 5074–5083. [https://doi.org/10.26355/EURREV\\_201906\\_18171](https://doi.org/10.26355/EURREV_201906_18171)
- Clayton, A., Harris, C. L., Court, J., Mason, M. D., & Morgan, B. P. (2003). Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *Wiley Online Library*, 33(2), 522–531. <https://doi.org/10.1002/immu.200310028>
- Colombo, M., Raposo, G., and, C. T.-A. review of cell, & 2014, undefined. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annualreviews.Org*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Eaglstein, W., Clinics, V. F.-S., & 1997, undefined. (n.d.). Chronic wounds. *Surgical.Theclinics.Com*. Retrieved December 18, 2022, from [https://www.surgical.theclinics.com/article/S0039-6109\(05\)70575-2/abstract](https://www.surgical.theclinics.com/article/S0039-6109(05)70575-2/abstract)
- Ellis, S., Lin, E. J., & Tartar, D. (2018). Immunology of Wound Healing. *Current Dermatology Reports*, 7(4), 350–358. <https://doi.org/10.1007/S13671-018-0234-9>
- Furlani, D., Ugurlucan, M., Ong, L. L., Bieback, K., Pittermann, E., Westien, I., Wang, W., Yerebakan, C., Li, W., Gaebel, R., Li, R. ke, Vollmar, B., Steinhoff, G., & Ma, N. (2009). Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe?: Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvascular Research*, 77(3), 370–376. <https://doi.org/10.1016/J.MVR.2009.02.001>
- Ha, D. H., Kim, H.-K., Lee, J., Kwon, H. H., Park, G.-H., Yang, S. H., Jung, J. Y., Choi, H., Lee, J. H., Sung, S., Yi, Y. W., & Cho, B. S. (n.d.). Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration. *Mdpi.Com*. <https://doi.org/10.3390/cells9051157>
- Han, Y., Ren, J., Bai, Y., Pei, X., & Han, Y. (2019). Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 109, 59–68. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2019.01.017>
- Haney, M., Klyachko, N., Zhao, Y., ... R. G.-J. of controlled, & 2015, undefined. (n.d.). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Elsevier*. Retrieved December 19, 2022, from [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365915002138?casa\\_token=46ZahW409x4AAAAA:YgqssidBokbeQ7BZVA18wguik9aP8ZPt18FrXdBAHDjdrAICHmt](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365915002138?casa_token=46ZahW409x4AAAAA:YgqssidBokbeQ7BZVA18wguik9aP8ZPt18FrXdBAHDjdrAICHmt)

XuuP2IPVc6WHjvhoerx-bfOU

- Hassanzadeh, A., Rahman, H. S., Markov, A., Endjun, J. J., Zekiy, A. O., Chartrand, M. S., Beheshtkhoo, N., Kouhbanani, M. A. J., Marofi, F., Nikoo, M., & Jarahian, M. (2021). Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer; overview of development, challenges, and opportunities. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02378-7>
- He, C., Zheng, S., Luo, Y., & Wang, B. (2018). Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics*, 8(1), 237–255. <https://doi.org/10.7150/THNO.21945>
- Hocking, A., research, N. G.-E. cell, & 2010, undefined. (n.d.). Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Elsevier*. Retrieved December 18, 2022, from [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482710002570?casa\\_token=Be32iEX2Sm0AAAAA:2MCku-VH8zozmPuNZOwK7cMsraE-Dll5v4vxB\\_cNizGE5C4iM1AF-wpyAe1SNEjRQvuVQUVpR0Q](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482710002570?casa_token=Be32iEX2Sm0AAAAA:2MCku-VH8zozmPuNZOwK7cMsraE-Dll5v4vxB_cNizGE5C4iM1AF-wpyAe1SNEjRQvuVQUVpR0Q)
- Jeong, J. O., Han, J. W., Kim, J. M., Cho, H. J., Park, C., Lee, N., Kim, D. W., & Yoon, Y. S. (2011). Malignant Tumor Formation After Transplantation of Short-Term Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Experimental Myocardial Infarction and Diabetic Neuropathy. *Circulation Research*, 108(11), 1340–1347. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.239848>
- Jeppesen, D., Fenix, A., Franklin, J., Cell, J. H.-, & 2019, undefined. (n.d.). Reassessment of exosome composition. *Elsevier*. Retrieved December 18, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867419302120>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1208–1215. <https://doi.org/10.1172/JCI81135>
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., & Epstein, S. E. (2004). Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circulation Research*, 94(5), 678–685. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000118601.37875.AC>
- Li, Q., Gong, S., Yao, W., Yang, Z., Wang, R., Yu, Z., Delivery, M. W.-D., & 2021, undefined. (2021). Exosome loaded genipin crosslinked hydrogel facilitates full thickness cutaneous wound healing in rat animal model. *Taylor & Francis*, 28(1), 884–893. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1912210>

- Lu, M., & Huang, Y. (2020). Bioinspired exosome-like therapeutics and delivery nanoplatfoms. *Biomaterials*, 242, 119925. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.119925>
- Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A. R., Ahadi, A. M., Molaei, F., & Alahari, S. K. (2019). Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-019-0991-5>
- Moghadasi, S., Elveny, M., Rahman, H. S., Suksatan, W., Jalil, A. T., Abdelbasset, W. K., Yumashev, A. V., Shariatzadeh, S., Motavalli, R., Behzad, F., Marofi, F., Hassanzadeh, A., Pathak, Y., & Jarahian, M. (2021). A paradigm shift in cell-free approach: the emerging role of MSCs-derived exosomes in regenerative medicine. *Journal of Translational Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-021-02980-6>
- Morad, G., Carman, C. V., Hagedorn, E. J., Perlin, J. R., Zon, L. I., Mustafaoglu, N., Park, T. E., Ingber, D. E., Daisy, C. C., & Moses, M. A. (2019). Tumor-Derived Extracellular Vesicles Breach the Intact Blood-Brain Barrier via Transcytosis. *ACS Nano*, 13(12), 13853–13865. <https://doi.org/10.1021/ACSNANO.9B04397>
- Nekanti, U., Dastidar, S., Venugopal, P., Totey, S., & Ta, M. (2010). Increased Proliferation and Analysis of Differential Gene Expression in Human Wharton's Jelly-derived Mesenchymal Stromal Cells under Hypoxia. *International Journal of Biological Sciences*, 6(5), 499. <https://doi.org/10.7150/IJBS.6.499>
- Pan, B., Cell, R. J.-, & 1983, undefined. (n.d.). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Elsevier*. Retrieved December 19, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867483900405>
- Pomatto, M., Gai, C., Negro, F., Cedrino, M., Grange, C., Ceccotti, E., Togliatto, G., Collino, F., Tapparo, M., Figliolini, F., Lopatina, T., Brizzi, M. F., & Camussi, G. (2021). Differential therapeutic effect of extracellular vesicles derived by bone marrow and adipose mesenchymal stem cells on wound healing of diabetic ulcers and. *Mdpi.Com*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22083851>
- Qiu, H., Liu, S., Wu, K., Zhao, R., Cao, L., & Wang, H. (2020). Prospective application of exosomes derived from adipose-derived stem cells in skin wound healing: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(3), 574–581. <https://doi.org/10.1111/JOCD.13215>
- Rajan, T. S., ... S. G.-I., & 2017, undefined. (2017). Human periodontal ligament stem cells secretome from multiple sclerosis patients suppresses NALP3 inflammasome activation in experimental autoimmune. *Journals.Sagepub.Com*, 30(3), 238–252.

<https://doi.org/10.1177/0394632017722332>

- Rani, S., Ritter, T., Rani, S., & Ritter, T. (2015). The exosome-A naturally secreted nanoparticle and its application to wound healing. *Wiley Online Library*, 28(27), 5542–5552. <https://doi.org/10.1002/adma.201504009>
- Salehi, M., physiology, M. S.-J. of cellular, & 2018, undefined. (2018). Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *Wiley Online Library*, 233(9), 6370–6380. <https://doi.org/10.1002/jcp.26481>
- Schmidt, O., Biology, D. T.-C., & 2012, undefined. (n.d.). The ESCRT machinery. *Elsevier*. Retrieved December 19, 2022, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982212000292>
- Smith, B. J. (2003). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Proteins*, 41–56. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:41/COVER>
- Ti, D., Hao, H., Tong, C., Liu, J., Dong, L., Zheng, J., Zhao, Y., Liu, H., Fu, X., & Han, W. (2015). LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *Journal of Translational Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-015-0642-6>
- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164(6), 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.01.043>
- Toh, W. S., Lai, R. C., Zhang, B., & Lim, S. K. (2018). MSC exosome works through a protein-based mechanism of action. *Biochemical Society Transactions*, 46(4), 843–853. <https://doi.org/10.1042/BST20180079>
- Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (n.d.). Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Mdpi.Com*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
- Vader, P., Mol, E., ... G. P.-A. drug delivery, & 2016, undefined. (n.d.). Extracellular vesicles for drug delivery. *Elsevier*. Retrieved December 19, 2022, from [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16300576?casa\\_token=swk9PRwIGcIAAAAA:Hbe-IGVZNmPaiNe9a89JxXCD-AII0\\_zMAprVsbq5UmAHjKs8U3ByNzzey1YLbTiC2SgqLxA3LPU](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16300576?casa_token=swk9PRwIGcIAAAAA:Hbe-IGVZNmPaiNe9a89JxXCD-AII0_zMAprVsbq5UmAHjKs8U3ByNzzey1YLbTiC2SgqLxA3LPU)
- Wei, H., Chen, Q., Lin, L., Sha, C., Li, T., Liu, Y., Yin, X., Xu, Y., Chen, L., Gao, W., Li, Y., & Zhu, X. (2021). Regulation of exosome production and cargo sorting. *International Journal of Biological Sciences*, 17(1), 163. <https://doi.org/10.7150/IJBS.53671>
- Xue, C., Shen, Y., Li, X., Li, B., Zhao, S., Gu, J., Chen, Y., Ma, B., Wei, J., Han, Q., & Zhao,

- R. C. (2018). Exosomes Derived from Hypoxia-Treated Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis Through the PKA Signaling Pathway. *Https://Home.Liebertpub.Com/Scd*, 27(7), 456–465. <https://doi.org/10.1089/SCD.2017.0296>
- Yager, D., Regeneration, B. N.-W. R. and, & 1999, undefined. (1999). The proteolytic environment of chronic wounds. *Wiley Online Library*, 7(6), 433–441. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1999.00433.x>
- Yang, D., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, F., Chen, L., Ma, L., Larcher, L. M., Chen, S., Liu, N., Zhao, Q., Tran, P. H. L., Chen, C., Veedu, R. N., & Wang, T. (2020). Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 10(8), 3684. <https://doi.org/10.7150/THNO.41580>
- Young, A., (Oxford), C. M.-S., & 2011, undefined. (n.d.). The physiology of wound healing. *Elsevier*. Retrieved December 18, 2022, from [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931911001323?casa\\_token=sOlfIp-H1-EAAAAA:OwNbj7IfjW\\_sJYZVEtE-C9HIQzeyy9FV7ZcgjrAhELEE2qvJkO26YzBgbUU15D140IYMvyBsyZo](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931911001323?casa_token=sOlfIp-H1-EAAAAA:OwNbj7IfjW_sJYZVEtE-C9HIQzeyy9FV7ZcgjrAhELEE2qvJkO26YzBgbUU15D140IYMvyBsyZo)
- Zhu, J., Li, F., Wang, X., Yu, J., & D. W.-A. applied materials, & 2018, undefined. (2018). Hyaluronic acid and polyethylene glycol hybrid hydrogel encapsulating nanogel with hemostasis and sustainable antibacterial property for wound healing. *ACS Publications*, 10(16), 13304–13316. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b18927>
- Zou, J., Huang, S., Peng, Y., ... H. L.-... journal of lower, & 2012, undefined. (2012). Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) potential role in healing cutaneous chronic wounds. *Journals.Sagepub.Com*, 11(4), 244–253. <https://doi.org/10.1177/1534734612463935>

## TEŞEKKÜR

Bu konuda bana çalışma fırsatı veren, yanırlarımda doğruyu göstererek teşvik eden, tüm iyi niyeti ve sabrıyla yanımda olan çok değerli hocam ***Sn. Prof. Dr. Emel yk ÇETİN UYANIKGİL*** sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Deneyleirim için bana her türlü desteği veren, çalışmalarımda yardımlarını benden esirgemeyen, ***Sn. Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL***'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Deneyleirim için bana finansal destek olan **ALİYE STER VAKFI**'na bu desteği bana vererek güvendikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvarım direği, labta yol gösterici bir o kadar da alçak gönüllü, kendisi koca yürekli adamın dibi, onunla küçük şeylerle mutlu olabildiğim tertemiz kalpli, enerjisiyle her anımı güzelleştiren can dostum ***Sn. Burak ÇAKAR***'a, her zaman yanımda olan canım dostlarım ***Sn. Derya Selcen SALMANOğLU***'na, ***Sn. Ezgi GÜN***'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hala her zaman yanımda hissettiğim, beni bu kadar güçlü yetiştiren, bana benden çok inanan ve güvenen, huzurum canım annem ***Sn. Hülya DEMİRAL***'a, kedi köpek gibi olduğum ama onsuz asla olamadığım bitanecik kardeşim ***Sn Cihangir MALKOÇ***'a, resmiyette kardeşim olmayan fakat her zaman sıcaklığını hissettiğim bir telefon uzağımda olan melek kalpli dostum ***Sn. Ysra ASLAN***' a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

07 /02 / 2023

Simge MALKOÇ

## ÖZGEÇMİŞ

İlköğretimimi Kırklareli/Lüleburgaz Merkez İlköğretim Okulu'nda, lise eğitimimi Kırklareli/Lüleburgaz Lüleburgaz Lisesi'nde tamamladım. Üniversite eğitimim için İzmir'e geldim. Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği'nde başlayan serüvenim çiftanadal yaparak Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümünü tamamlayarak devam etti.

2017- 2018 bahar yarıyılında University of Warmia and Mazury in Olsztyn (Polonya)' de Erasmus + yaptım.

T.C Tarım ve Orman Bakanlığı İzmir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünde stajyer olarak çalıştım.

2022 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Pilot ölçekli probiyotik bakteri üretimi ve formülasyonu konulu Tübitak GÜdümlü Proje'de bursiyer olarak çalıştım.

2019 yılından bu yana Ege Üniversitesi Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.