

**YARA İYİLEŞMESİNE YÖNELİK EKZOZOM ENTEGRE
BİYOAKTİF JELATİN SÜNGERLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF BIOACTIVE GELATIN SPONGES
INTEGRATED WITH EXOSOMES FOR WOUND
HEALING**

ELİF CÖNGER

PROF. DR KEZBAN ULUBAYRAM

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

ÖZET

YARA İYİLEŞMESİNE YÖNELİK EKZOZOM ENTEGRE BİYOAKTİF JELATİN SÜNGERLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Elif CÖNGER

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Prof. Dr. KEZBAN ULUBAYRAM

Eş Danışman: Doç. Dr. Naşide MANGIR BOLAT

Haziran 2023, 125 sayfa

Hücrelerarası sinyal iletim aracı olan ekzozomlar, kargolarında taşıdıkları çeşitli biyomoleküller aracılığı ile anjiyogenez, antijen taşıma, apoptoz, pıhtılaşma, hücrel hemostaz, inflamasyon ve hücrelerarası sinyal iletim gibi birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır. Bu etkilerinden dolayı ekzozomlar; nörodejeneratif, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların teşhis ve tedavisinde, kemik rejenerasyonunda, ilaç ve aşı araştırmalarında yoğun ilgi görmektedir. Yara iyileşmesinde ise hemostaz, inflamasyon, anjiyogenez, kollajen birikimi, granül doku oluşumu ve epitelizasyon fazlarında etkili olduğu bilinmektedir. Ancak ekzozomların terapötik etki gösterebilmesi için stabilitelerinin ve biyolojik fonksiyonlarının korunması kritik öneme sahiptir. Bu amaçla ekzozomların taşıyıcı sistemlere yüklenerek uygulanması rejeneratif tıp alanında büyük ilgi görmektedir. Bu tezin amacı yara iyileşmesine yönelik olarak sıçan kemik iliği kök hücre (rt-MKH) kaynaklı ekzozomların jelatin süngerlere yüklenerek biyolojik fonksiyonlarının korunması ve yara bölgesinde uygulama kolaylığı sağlamasıdır.

Bu amaçla rt-MKH kaynaklı ekzozomlar ultrasantrifüj yöntemi ile izole edilerek partikül boyutları 160-180 nm aralığında bulunmuştur. Ekzozomların CD81 ve CD63 proteinlerini ifade ettiği akış sitometrisi ile tespit edilmiştir. Hücre kaynağı ve kültür koşullarının ekzozom verimine etkisi incelenmiştir. Sıçan yaşının ekzozom veriminde etkili olduğu ve 8 haftalık sıçanlardan elde edilen rt-MKH kaynaklı ekzozom veriminin 5 ve 3 haftalık sıçanlara göre 2 kat fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ekzozom içermeyen fetal sıgır serumu (Exodep FBS) kullanımı ise FBS'siz ortama göre verimi 2 kat artmıştır ($p<0,05$). Ekzozomlar, farklı konsantrasyonlarda (0-10 $\mu\text{g/mL}$) keratinosit hücrelerine (HaCaT) uygulandığında, 0.25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda hücre proliferasyonunu % 10 artırdığı ve ancak yüksek konsantrasyonlarda ($>1 \mu\text{g/mL}$) ise anlamlı olarak düşürdüğü gözlenmiştir. rt-MKH kaynaklı ekzozomların hücre migrasyonuna olan etkisi farklı konsantrasyonlarda (0,25, 1 ve 10 $\mu\text{g/mL}$) incelenmiş ve 24 saat sonunda insan fibroblast hücrelerine (hFB) 10 $\mu\text{g/mL}$ ekzozom uygulandığında yara alanı %51 oranında azalırken kontrol grubunda ise % 36 oranında azaldığı tespit edilmiştir. HaCaT hücrelerinde ise ekzozomların migrasyona etkisi görülmemiştir. Ekzozomların pro-anjiyojenik etkileri aortik halka ve koryoallantoik membran (CAM) analizleri ile test edilmiş ve ekzozomların endotel filizlenmesini ve yeni damar oluşumunu konsantrasyona bağlı olarak artırdığı izlenmiştir. Ortalama 200–250 μm gözenek çapına ve yüksek su tutma kapasitesine sahip jelatin süngerler dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmış ve ekzozomlar jelatin süngerlere yüklenerek biyolojik etkileri araştırılmıştır. CAM analizleri, 5 $\mu\text{g/mL}$ ekzozom entegre edilen jelatin süngerlerin damar yoğunluğunu yaklaşık olarak kontrole göre %50 ($p<0,05$) oranında artırdığını göstermiştir. Aortik halka deneyinde ise ekzozom entegre jelatin süngerler serbest ekzozomlara göre daha yüksek anjiyojenik yanıt göstermiştir. Sonuç olarak jelatin süngerlerin ekzozom stabilitesini ve biyolojik özelliklerini koruyarak uygulama kolaylığı ile birlikte kronik/kompleks yara tedavisinde etkili bir strateji olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ekzozom, yara iyileşmesi, anjiyogenez, jelatin, sünger

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BIOACTIVE GELATIN SPONGES INTEGRATED WITH EXOSOME FOR WOUND HEALING

Elif CONGER

Master of Science, Department of Bioengineering

Prof. Dr. KEZBAN ULUBAYRAM

Co-supervisor: Assos. Prof. Naside MANGIR BOLAT

June 2023, 125 pages

Exosomes are intercellular signal transduction vesicles, that play a role in many biological processes such as angiogenesis, antigen transport, apoptosis, coagulation, cellular hemostasis, inflammation, and intercellular signal transduction through various biomolecules they carry in their cargo. Because of these effects, exosomes gained great interest in the diagnosis and treatment of neurodegenerative, cancer, cardiovascular diseases, bone regeneration, drug and vaccine research. In wound healing, it is known that exosomes are effective in hemostasis, inflammation, angiogenesis, collagen deposition, granule tissue formation, and epithelialization phases. However, preserving their stability and biological functions is critical for exosomes to have a therapeutic effect. For this purpose, the preservation of stability and activity of exosomes by loading them into carrier systems attracts attention in the field of regenerative medicine. The thesis aim is to load rat bone marrow mesenchymal stem cell (rt-MSC) exosomes into gelatin sponges for wound healing, to preserve their biological functions, and provide ease of application in the wound area. For this purpose, exosomes were isolated by ultracentrifugation method from rt-MSC. Particle sizes of exosomes were in the range of

160-180 nm. Also flow cytometry analysis showed that exosomes express CD81 and CD63 proteins. The cell source and culture condition affects on exosome yield were investigated. Results showed that rat age is effective in exosome yield, and exosome yield isolated from 8-week-old rat MSC is two times higher than that of 5- and 3-week-old rats. In addition, the use of exosome-free fetal bovine serum (Exodep FBS) increased exosome yield by two times compared to the medium without FBS ($p < 0.05$). When exosomes were applied to keratinocyte cells (HaCaT) at different concentrations (0-10 $\mu\text{g/mL}$), cell proliferation increased by 10% at a concentration of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and significantly decreased at higher concentrations ($> 1 \mu\text{g/mL}$). The effect of rt-MSC isolated exosomes on cell migration was investigated at different concentrations (0.25, 1, and 10 $\mu\text{g/mL}$). At the end of 24 hours, when 10 $\mu\text{g/mL}$ exosome was applied to human fibroblast cells (hFB), the wound area was reduced by 51%, while 36% was in the control group. In HaCaT cells, however, no effect of exosomes on migration was observed. The pro-angiogenic effects of exosomes were tested on the aortic ring and chorioallantoic membrane (CAM) analysis. Exosomes increased endothelial sprouting and new vessel formation in a concentration-dependent manner. Gelatin sponges with an average pore diameter of 200–250 μm and high water absorption capacity were prepared by freeze-drying. The biological effects of exosomes were investigated by loading them into gelatin sponges. CAM analyzes showed that 5 $\mu\text{g/mL}$ exosome-integrated gelatin sponges increased vessel density by approximately 50% ($p < 0.05$) compared to the control. In the aortic ring experiment, however, exosome-integrated gelatin sponges showed a higher angiogenic response than free exosomes. As a result, gelatin sponges would be an effective strategy in chronic/complex wound treatments with ease of application by preserving exosome stability and biological properties.

Keywords: exosomes, wound healing, angiogenesis, sponge, gelatin

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın başından itibaren bana çalışma alanı sağlamak için maddi ve manevi bütün imkanları sunan, çalışma prensibi ve bilime bakış açısı ile bana değer katan, bana öğrettikleri ve gösterdiği sabır sayesinde kendime güvenmemi sağlayan ve bilime olan sevgimi artıran, öğrencisi olmanın beni şanslı kıldığına inandığım, çok değerli bilim insanı kıymetli hocam Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a,

Tez süresince bilgi birikimi ve tecrübeleri ile yeni beceriler kazanmamı sağlayan ve çalışma azminden ilham aldığım değerli eş danışmanım Doç. Dr. Naşide Mangır Bolat'a,

Tez çalışmamın başından itibaren bütün süreç boyunca çalışmalarına destek vererek tezime yaptığı katkılardan dolayı, bildiklerini sabırla bana öğreten, bana yol gösteren, işini sonsuz saygı ve sevgi ile yapan değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Şükrü Öztürk'e

Tez kapsamındaki ekzozom izolasyonu için tüm laboratuvar imkanlarını hiç çekinmeden kullanımına sunarak tez çalışmalarına destek olan değerli hocam Prof. Dr. Alp Can'a ve ekibine,

Ekzozom karakterizasyonu kapsamında spesifik protein tayini için western blot analizlerinin gerçekleştirilmesinde laboratuvar imkanlarını kullanıma sunan ve kıymetli vaktini ayıran Prof. Dr. Naciye Dilara Zeybek'e ve Arş. Gör. Dr. Esra Büber'e,

Ekzozomların anjiyogenez etkilerinin araştırılması kapsamında gerçekleştirilen CAM analizi çalışmalarında desteklerini sunan değerli Halime Serinçay'a ve bu kıymetli çalışma ortamını paylaştığım bütün laboratuvar arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca en büyük önemi eğitim sürecime göstererek beni en iyi yerlerde görmek isteyen, zorluklar karşısında bana duydukları inançla güçlenmemi sağlayan, üzerimde sonsuz emeği bulunan ve dualarını benden eksik etmeyen kıymetlilerim annem Firdevs Cönger'e ve babam Yılmaz Cönger'e, her zaman yanımda olan, varlıkları ile hayatımı güzelleştiren kardeşlerim Derviş Berk, Şeyma Nur ve Muhammed Emin Cönger'e,

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TÜBİTAK 120S910 projesi kapsamında desteklenmiş olup, destekleri için TÜBİTAK'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR.....	xv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	7
2.1. Ekzozomun Keşfi	7
2.2.Ekzozom Yapısı ve İçeriği.....	8
2.3.Ekzozom Biyogenezi	13
2.4.Ekzozom Hedef Hücre İlişkisi	16
2.5.Ekzozom İzolasyonu ve Saflaştırma	17
2.5.1.Ultra santrifüj – Yoğunluk Gradyan Ultra Santrifüj	17
2.5.2.Ultra Filtrasyon (UF)	18
2.5.3.Büyükölçekli Ayırma Kromatografisi (SEC)	19
2.5.4.Polimerle Çöktürme	19
2.5.5.İmmünoafinite ile Saflaştırma	19
2.5.6.Mikroakışkan Temelli İzolasyon	20
2.6.Ekzozom Karakterizasyonu	20
2.6.1.Nanopartikül İzleme Analizi (NTA).....	20
2.6.2.Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi (DLS).....	21
2.6.3.Ayarlanabilir Dirençli Nabız Algılama (TRPS)	21
2.6.4.Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM).....	21
2.6.5.Elektron Mikroskobu (EM)	22

2.6.6.Akış Sitometrisi (FC).....	22
2.6.7.Western Blot Analizi (WB)	23
2.7.Ekzozomların Biyolojik Fonksiyonları.....	23
2.7.1.Kanser	24
2.7.2.Nörodejeneratif Hastalıklar.....	25
2.7.3.Metabolik ve Kardiyovasküler Hastalıklar	26
2.8.Ekzozomların Terapötik Etkileri	26
2.9.Ekzozomların Diagnostik Kullanımı	28
2.10.Ekzozomların Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri	29
2.11.Ekzozomların Klinik Çalışmaları	33
2.12.Ekzozom Stabiliteleri ve Korunma Koşulları.....	35
3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	37
3.1.Materyal	37
3.2.Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	38
3.2.1.Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu.....	38
3.2.2.rt-MKH'lerin Karakterizasyonu	39
3.2.2.1.Adipojenik Farklılaşma.....	39
3.2.2.2.Osteojenik Farklılaşma	39
3.3.rt-MKH Kaynaklı Ekzozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu	40
3.3.1.rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların İzolasyonu.....	40
3.3.2.rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların Karakterizasyonu	41
3.3.2.1.Mikro BCA ile Total Protein Miktar Tayini	41
3.3.2.2.Partikül Boyutu ve Konsantrasyonunun Tespit Edilmesi	42
3.3.2.3.Partikül Morfolojisinin Karakterizasyonu	43
3.3.2.4.Ekzozomların akış sitometrisi ile fenotipik karakterizasyonu	43
3.3.2.5.Ekzozom spesifik proteinlerinin western blot analizi ile gösterilmesi	44
3.4.rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların Biyolojik Etkilerinin İncelenmesi.....	45

3.4.1.rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların Hücre Çoğalmasına Olan Etkisi	45
3.4.1.1.İnsan Fibroblast (hFB) ve Keratinosit (HaCaT) Hücre Kültürü	45
3.4.1.2.Ekzozomların hFb ve HaCat Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	45
3.4.2.Ekzozomların Hücre İçine Alımının Belirlenmesi	46
3.4.3.rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların hFB ve HaCaT Hücrelerinin Migrasyon Yetenekleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	47
3.4.4.rt-MHK Kaynaklı Ekzozomların Oksidatif Stres Altında Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi	47
3.5.Ekzozomların Anjiyojenik Etkisinin İncelenmesi	48
3.5.1.Ekzozomlarının Anjiyojenik Etkisinin Tavuk Embriyosu Aortik Halka Yöntemi ile İncelenmesi	49
3.5.2.Ekzozomlarının Anjiyojenik Etkisinin CAM Analizi ile İncelenmesi	51
3.6.3 Boyutlu (3B) Jelatin Süngerlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	53
3.6.1.3B Jelatin Süngerlerin Hazırlanması	53
3.6.2.3B Jelatin Süngerlerin Karakterizasyonu	54
3.7.Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Biyolojik Etkilerinin İncelenmesi	55
3.7.1.Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Hücre Migrasyonuna Etkisi.....	56
3.7.2.Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Aortik Halka Yöntemi ile Anjiyojenik Etkilerinin İncelenmesi.....	56
3.7.3.Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin CAM Analizi ile Anjiyojenik Etkilerinin İncelenmesi.....	58
3.8.İstatistiksel Analiz.....	58
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
4.1.Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (rt-MKH) ve Farklılaşma Yetenekleri	59
4.2.Ekzozom İzolasyonu ve Verimini Etkileyen Parametreler	63
4.3.Ekzozomların Özellikleri	67
4.3.1.Partikül Boyutu ve Sayısı	67

4.3.2.Ekzozom Morfolojisi	69
4.3.3.Ekzozomların Fenotipik Özellikleri.....	70
4.4.Ekzozomların Biyolojik Etkileri.....	72
4.4.1.Ekzozomların İnsan Fibroblast (hFB) ve Keratinosit (HaCaT) Hücre Proliferasyonuna Etkisi	72
4.4.2.Ekzozomların Hücre İçine Alımı	74
4.4.3.Ekzozomların Hücre Migrasyonuna Etkisi.....	74
4.4.4.Ekzozomların Oksidatif Stres Altında Hücre Canlılığına Etkisi	78
4.4.5.Ekzozomların Anjiyojenik Etkilerinin Aortik Halka ile Değerlendirilmesi	80
4.4.6.Ekzozomların Anjiyojenik Etkilerinin CAM ile Değerlendirilmesi.....	84
4.5.Jelatin Süngerlerin Özellikleri	86
4.5.1.Jelatin Süngerlerin Morfolojik Karakterizasyonu.....	86
4.5.2.3B Jelatin Süngerlerin Hidrolitik Bozunma Davranışları.....	87
4.5.3.Jelatin Süngerlerin Su Tutma Kapasiteleri	88
4.5.4.Jelatin Süngerlerin Hücre Canlılığına Etkisi	89
4.6.Ekzozom Entegre Jelatin Süngerin Biyolojik Etkileri.....	90
4.6.1.Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Hücre Migrasyonuna Etkisi.....	90
4.6.2.Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Anjiyojenik Etkileri.....	93
5.YORUM.....	100
6.KAYNAKLAR	102
EKLER.....	122
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	122
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	124
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ekzozomun keşfi ve gelişim süreci.	8
Şekil 2.2. Ekzozomun yapısı ve içeriği.	12
Şekil 2.3. Ekzozom biyogenezi.	16
Şekil 3.1. rt-MKH kaynaklı ekzozom izolasyonunun şematik gösterimi.	41
Şekil 3.2. Ekzozom miktar tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği. 0-200 µg/mL aralığında BSA konsantrasyonuna sahip standartlar kullanılarak hazırlanmış ve toplam ekzozom miktarı elde edilen matematiksel model kullanılarak hesaplanmıştır.	42
Şekil 3.3. HaCat hücrelerinde hidrojen peroksitin konsantrasyona bağlı meydana getirdiği hücre canlılığı profili (n=5).	48
Şekil 3.4. rt-MKH kaynaklı ekzozomların CAM analizinde anjiyojenik potansiyellerinin değerlendirilmesini gösteren akış diyagramı. CAM analizinde döllenmiş yumurtaların inkübatöre yerleştirilmesi (A), yumurtaların embriyonik gelişimin 3. gününde kırılarak embriyoların kaplara aktarılması (B) ve hücre kültürü koşullarının inkübasyonun başlatılması (C) embriyonik gelişimin 7. gününde ekzozomların uygulanmasında kılavuz görevi görecek steril plastik halkanın uygun yere konumlandırılması (D) ve embriyonik gelişimin 10. gününde ekzozom uygulamasının sonlandırılarak görüntülemenin yapılması (E).	52
Şekil 3.5. Zamana bağlı olarak civciv embriyolarının ve CAM'ın gelişimi.	52
Şekil 3.6. A) Jelatin süngerlerin hazırlanması, B) Jelatin ve glutaraldehit arasındaki çapraz bağlanma.	54
Şekil 3.7. Fare aortik halka deneyi uygulaması. A) Omurga ile bitişik halde bulunan fare aort damarı B) Fare aort damarının anterior ucundan başlanarak omurgadan ayrılması C) Fareden alınan aort damarlarının diseksiyon mikroskobu altında bağ dokulardan temizlenmiş görüntüleri D) Matrijele gömülerek kültüre edilen aortik halkanın mikroskobik görüntüsü. A: Anterior P: Posterior	57

Şekil 4.1. Sıçan kemik iliğinden izole edilen hücrelerin zamana bağlı olarak gösterdikleri davranış (Siyah halka içerisinde kültür kabının yüzeyine tutunankemik iliği kök hücresi gösterilmiştir).	60
Şekil 4.2. rt-MKH'lerin farklı hücre tiplerine farklılaşabilme kabiliyeti. Osteojenik farklılaşma Alizarin Kırmızısı ve adipojenik farklılaşma Oil Kırmızısı ile tespit edilmiştir. (Sarı oklar farklılaşan hücrelerde biriken kalsiyum nodüllerini ve yağ damlacıklarını göstermektedir. Kontrol grubunda pozitif boyama gözlemlenmemiştir).	62
Şekil 4.3. Sıçan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin morfolojik görünüşleri. (Sarı oklar ile olgunlaşmış ve çarşaf morfolojisi kazanmış hücreler gösterilirken kırmızı halka içerisinde yeni çoğalan hücreler gösterilmektedir).	63
Şekil 4.4. Ekzozom izolasyon verimini etkileyen parametreler: A) Farklı hücre kaynaklarının, B) Serum etkisinin ve C) Rotor tipinin etkisi. Ekzozomlarından arındırılmış serum Exodep FBS olarak isimlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı t-test yapılarak tespit edilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ifade etmektedir. ns: anlamlı değil.	67
Şekil 4.5. A) qNano® B) NTA sonuçlarına göre partikül boyutlarının dağılımı ve partikül derişimi. Sarı oklar NTA analizi esnasında mikroskoptan alınan görüntüde gözlemlenen ekzozomları göstermektedir.	68
Şekil 4.6. rt-MKH kaynaklı ekzozomların TEM görüntüleri.	70
Şekil 4.7. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden izole edilen ekzozomların akış sitometri analizi. A-I) CD81, B-I) CD63 ve C-I) GM130 belirteçleri ile elde edilen grafikler. A-II) CD81, B-II) CD63 ve C-II) GM130 belirteçlerinin analizi için sınırları belirlenip çizilen kapılar.	71
Şekil 4.8. rt-MKH ve izole edilen ekzozomların CD9, Alix, CD63 ve GM130 ifadesi. 72	
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki ekzozomların HaCaT ve hFB hücrelerinin proliferasyonuna olan etkisi. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, ve *** $p<0,001$ temsil etmektedir.	73
Şekil 4.10. rt-MKH kaynaklı ekzozomların zamana bağlı hücre içine alımı. 2 ve 24 saat sonunda floresan mikroskopta görüntüler alınmıştır. Hücre çekirdekleri mavi (DAPI), ekzozomlar ise kırmızı renkli görünmektedir.	74

Şekil 4.13. rt-MKH kaynaklı ekzozomların HaCaT hücreleri üzerindeki migrasyon etkisi.	77
Şekil 4.14. rt-MKH kaynaklı ekzozomların HaCaT hücrelerinde yara kapanmasına etkisi* $p<0,05$, *** $p<0,001$, **** $p<0.0001$ temsil etmektedir.	77
Şekil 4.15. rt-MKH kaynaklı ekzozomların oksidatif strese karşı etkisi. * $p<0,05$, **** $p<0,0001$ temsil etmektedir (Yukarı yönlü oklar artışı, aşağı yönlü oklar azalmayı temsil etmektedir).	79
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda sunitinib ve VEGF'in aortik halkalarda etkisinin test edilmesi (Kırmızı halkalar tüp oluşumlarını, siyah oklar halkalardan çıkan ince uzantıları ve sarı oklar halkalardan yürüyen endotel morfolojisi gösteren hücreleri göstermektedir).	81
Şekil 4.17. Aortik halkalarda ekzozom, sunitinip ve VEGF'nin anjiyojenik etkisi. A) Endotel hücre filizlenmeleri (ok), ölmüş hücreler (halka) (10X), B) Aortik halkaların etrafındaki filizlenmeler ve hücre büyümesi (4X).	83
Şekil 4.18. Endotel hücre filizlenmelerinin ağ yapısı ve filizlenmeleri (20X).	84
Şekil 4.19. CAM analizinde ekzozomların pro-anjiyojenik aktivitelerinin incelenmesi.	85
Şekil 4.20. Jelatin süngerlerin makroskobik görünümü.	86
Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda (%0,5, %1, %2) glutaraldehit kullanılarak hazırlanmış jelatin süngerlerin kesit alanı ve yüzeyinden SEM görüntüleri (100X). Glu: Glutaraldehit	87
Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlardaki glutaraldehit ile hazırlanan jelatin süngerlerin zamana bağlı olarak oluşan hidrolitik bozunma davranışları. JS: Jelatin Sünger, Glu: Glutaraldehit	88
Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda glutaraldehit içeren jelatin süngerlerin hücre canlılığına etkisi. JS: Jelatin Sünger, Glu: Glutaraldehit. *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ temsil etmektedir.	90
Şekil 4.24. Ekzozom entegre jelatin süngerlerin HaCaT hücreleri üzerindeki migrasyon etkisi.	92
Şekil 4. 25. Ekzozom entegre jelatin süngerlerin HaCaT hücrelerinde yara kapanmasına etkisi. **** $p<0,0001$ temsil etmektedir.	92

Şekil 4.26. Ekzozom entegre edilmiş jelatin süngerlerin, serbest ekzozomların ve jelatin sünger kontrol grubunun aortik halkalar üzerindeki anjiyojenik etkisi. JS: Jelatin Sünger.	94
Şekil 4.27. Serbest ekzozom ve jelatin süngere entegre edilmiş ekzozomların CAM üzerindeki etkisi ve image J ile analiz edilmiş fotoğrafları.	96
Şekil 4.28. A) Serbest ekzozom ve B) Jelatin süngere entegre edilmiş ekzozomların CAM sonuçlarının sayısal analizi. ** $p<0,005$ temsil etmektedir. JS: Jelatin Sünger.	98
Şekil 4.29. PBS ve jelatin süngere entegre edilmiş ekzozomların 9. ve 12. günlerde CAM üzerindeki etkisi. JS: Jelatin Sünger.	99



ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 4.1. Farklı gluteraldehit konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan jelatin süngerlerin % su tutma kapasitesi.....	89
---	----



KISALTMALAR

Kısaltmalar

EV	Ekstraselüler Vezikül
MVB	Mültiveziküler Cisimcik
ILV	Intralüminal Vezikül
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
rt-MKH	Sıçan Kaynaklı Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler
hFB	İnsan Fibroblast Hücreleri
HaCaT	İnsan Keratinosit Hücreleri
HUVEC	İnsan Umbilikal Ven Endotelyal Hücreleri
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
FBS	Fetal Sığır Serum
α -MEM	α -Minimum Essential Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
CAM	Koryoallantoik Membran
NTA	Nanopartikül Takip Analizi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

Ekzozomlar neredeyse bütün ökaryotik ve prokaryotik hücrelerden salındığı bilinen birbirleri ile temas halinde olmayan hücrelerin iletişim kurmak amaçlı salgıladıkları hücre dışı veziküllerdir. Ekzozomlar yaşayan bütün organizmalarda, vücut sıvılarında, yaşayan çevresel ortamlarda (deniz suyu, toprak, hava, ev tozu vb.) ve yiyeceklerde (fermente gıdalar, bira, şarap vb.) bulunmaktadır [1]. Normal koşullarda hücreler tarafından fizyolojik fonksiyonların gerçekleştirilmesi amacıyla salgılanırlar. Patolojik durumlarda ise iyileşme süreçlerine dahil olurlar. Hücreler tarafından salgılanan ekzozomların boyutları 30-200 nm arasındadır. Boyutlarının çalışmaları kısıtlaması sebebi ile ilk olarak 1946 yılında izole edilen daha sonrasında “trombosit tozu” adı altında hücre atığı olarak bilinen ekzozomların, fonksiyonel özelliklerinin keşfedilmesi ile birlikte “ekzozom” olarak adlandırılması 1980’li yıllarda gerçekleştirilmiştir [2]. Daha sonraki dönemlerde fare ve insan hücrelerinden izole edilen ekzozomların mRNA ve mikroRNA taşıdığı keşfedilmiş ve ekzozomların hücreler arası bilgi transferi yaptığı kanıtlanmıştır [3].

Ekzozomlar salgılandıkları ortam koşullarının belirteçlerini ve hücrelerin “parmak izi” niteliğinde proteinlerini taşımaları sebebiyle araştırma alanlarında giderek artan bir ilgiye sahip olmuşlardır. Doğal koşullardaki fizyolojik etkileri, patolojik durumlardaki terapötik fonksiyonları, tanı ve tedavideki uygulamaları ekzozomların önemini gittikçe artırmaktadır. Hücrelerden direkt olarak veya vücut sıvılarından izole edilen ekzozomlar kemik ve yara iyileşmesinde, nörodejeneratif hastalıklarda, kanserde, kardiyovasküler hastalıklarda ve immünolojik rahatsızlıklarda terapötik etki göstermektedir. Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinden (UMKH), kemik iliği kök hücrelerinden ve makrofajlardan izole edilen ekzozomların kemik iyileşmesi, yara iyileşmesi ve nörovasküler hastalıklardaki etkileri gösterilmiştir [4-6]. Ekzozomlar kanser alanında da yaygın olarak çalışılmaktadır [7, 8]. Ancak kanser çalışmalarında ekzozomların terapötik etkilerinden çok erken tanı sistemi olarak kullanımı ön plana çıkmaktadır. Yapılan klinik çalışmaların %50’sinden fazlası da ekzozomların hastalık tanısında biyobelirteç olarak kullanıldığı sistemler üzerinedir. Ayrıca ekzozomların aşı olarak kullanıldığı iki ayrı klinik çalışma da bulunmaktadır [9]. Yürütülen klinik çalışmalar ekzozomların tanı ve tedavi sistemlerinde gelecek vaad ettiğini göstermektedir.

Bu tezin amacı yara tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilecek ekzozomların jelatin süngerlere yüklenerek biyolojik fonksiyonlarının korunması, agregasyonun önlenmesi ve yara bölgesine uygulama kolaylığı sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırmasıdır.

Günümüzde yara tedavilerinde önemli gelişmeler yaşanmakla birlikte kronik ve kompleks yaralar hala büyük bir sağlık sorunu olup sağlık sisteminde ağır bir sosyal ve ekonomik bir yük oluşturmaktadır. Yaşlı nüfusundaki artışla birlikte dünya genelinde mevcut yükün daha da artması beklenmektedir [10]. Özellikle diyabete bağlı kronik yaralar ve bunu takip eden alt ekstremitte amputasyonu, tıbbi, ekonomik ve sosyal yük getirmekle birlikte, diyabetik hastalarda başlıca morbidite nedenidir. Bunun nedeni ise çoklu medikal tedaviler gerektiren ve iyileşmesi uzun süren yaralar olmasıdır. Bu nedenle etkili bir yara iyileşmesi, onarım mekanizmalarını anlamayı, uygun yara örtüsü seçimi ve etkin bir tedaviyi gerektirir. Dolayısı ile yara iyileşmesinin hızlandırılması sağlık araştırmaları için önemli bir alan oluşturmaktadır.

Akut yaralarda normal iyileşme süreci; hücrelerin çoğalması, damarlanma, hücre dışı matris sentezi gibi adımlarla devam ederken kronik yaralarda bu süreç enflamasyon fazda durur ve buna eksüda, ağır enfeksiyonlar, ağrı ve doku nekrozu eşlik ederek iyileşme süreci uzar veya hiç gerçekleşmez. Yara tedavisinde pansuman, debriman gibi günlük bakımların yanında vakum tedavisi, hiperbarik O₂ tedavisi gibi ek tedaviler uygulanır. Ancak uygulanan tüm bu tedaviler çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle moleküler seviyede anjiyogenezi ve hücre proliferasyonunu sağlayan yeni stratejilere ihtiyaç vardır.

Günümüzde ileri tedaviler olarak adlandırılan hücresel tedaviler ve doku mühendisliği yöntemiyle geliştirilen deri eşlenikleri klinikte kronik/kompleks yara tedavisinde umut vaat eden yaklaşımlardır [11, 12]. Hücresel terapiler, yara bölgesine otolog veya allojenik olarak sağlıklı hücrelerin yara bölgesine uygulanması ile yara iyileşmesinin hızlandırılmasını amaçlayan bir tedavi yöntemidir. Fibroblast ve keratinosit hücreleri, kök hücreler ve plateletler hücre terapisi amaçlı kullanılan hücreler arasındadır. Hücre tedavisinde etkileri araştırılan kök hücreler içerisinde embriyonik kök hücreler (EKH), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) ve mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır.

Kök hücreler diğer hücrelere göre daha çok umut vaat etmektedir ve yapılan çalışmalar kök hücrelerin yara iyileşmesinde etkili olduğunu göstermektedir [13]. Terapötik etkilerinin yanında hücre terapisi otolog hücre izolasyonunun kolaylığı ve özellikle hücre kaynağı olarak öne çıkan kök hücrelerin farklılaşma özellikleri sayesinde avantaj sağlamaktadır. Ancak allojenik hücre implantasyonunda oluşabilecek immünolojik reaksiyonlar ve kök hücrelerin tümör oluşumuna da sebep olabilecek tahmin edilemeyen farklılaşmaları hücresel tedavi uygulamalarını kısıtlamaktadır. Doku mühendisliği yöntemiyle geliştirilen deri eşlenikleri; ise doğal yapıyı taklit eden epidermal, dermal veya her iki katmanı içeren dermal-epidermal yapıdadır. Günümüzde klinikte uygulanmak üzere birçok ticari ürün (Apligraf® (ABD), OrCell (ABD), DenovaSkin (İsviçre), Epidex (İsviçre), MySkin (İngiltere), BioSeed-S (Almanya), Laserskin (İtalya) geliştirilmiş ve klinikte kullanılmaktadır [11]. Ancak bu ürünlerin üretim maliyetlerinin çok yüksek olması ve raf ömürlerinin olmaması nedeniyle kullanımları oldukça kısıtlıdır.

İleri tedavilerin sahip olduğu kısıtlamalar nedeniyle bazı araştırmacılar hücresiz tedavi uygulamalarına yönelmiştir. Bu yöntemler arasında hücre proliferasyonu, hemostaz, epitelizasyon ve anjiyogenez gibi biyokimyasal olaylarda rol oynayan büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), transforme büyüme faktörü β (TGF- β), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)) önemli bir yer tutmaktadır [14]. Örneğin; EGF yüklü jelatin sünger biyoaktif yara örtüsünün yara bölgesinde anjiyogenezi, epitelizasyonu ve granülasyon doku oluşumu artırarak akut ve kronik yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir [15]. Benzer şekilde %0,01 PDGF-BB içeren Regranex® (Smith&Nephew) isimli ticari jel kronik yaralar için klinikte kullanılmaktadır [16]. Ancak sayıları oldukça az olan bu ürünlerin ticarileşmelerindeki en büyük engel büyüme faktörlerinin biyolojik ömürlerinin kısa olması nedeniyle aktivite kayıplarının yaşanması ve aşırı doza bağlı kanser riskinin bulunmasıdır.

Son yıllarda ise hücrelerin parakrin etkilerinin araştırılması ve ekzozomların hücre bilgisini taşıyıcı görevi gördüğünün keşfedilmesi ile birlikte rejeneratif tıp uygulamalarında önemli bir aktör haline gelmiştir. Kök hücre terapisi ile karşılaştırıldığında ise ekzozomların en az hücreler kadar terapötik etki gösterdiği bildirilmiştir [17].

Ekzozomların hücreler üzerine etkilerinin incelendiği ve protein düzeyindeki mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalar, ekzozomların yara iyileşmesinin her fazında etkili olduğunu göstermektedir. Mezenkimal kök hücrelerden izole edilen ekzozomlar M1 makrofaj hücrelerinin anti-inflamatuvar M2 fenotipine dönüşmesini sağlayarak inflamasyon fazında da etkili olmaktadır. Bu süreçte sitokinler, kemokinler, miRNA'lar ve pro-inflamatuvar enzimler dahil olmaktadır [18]. Proliferasyon fazında ise başta anjiyogenez olmak üzere kollajen birikimi, granül doku oluşumu ve epitelizasyon fazlarında ekzozomların etkin rol aldığı bilinmektedir. İnsan umbilikal kordon mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen ekzozomlar ile yapılan bir çalışmada ekzozomların deri hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı, sitokeratin-19 (CK-19), proliferasyon hücre çekirdek antijeni (PCNA) ve kollajen I ifadesi ile epitelizasyonu ve yara iyileşmesini artırdığı görülmüştür [19]. Yeniden şekillenme fazında ise ekzozomların tip I ve tip III kollajen ve elastin protein sentezi ile ekstraselüler matriks (ECM) oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir. Deri defekti modelinde yapılan bir çalışmada kök hücrelerden izole edilen ekzozomların fibroblastların miyoblastlara dönüşümünü inhibe ederek yara izi oluşmadan yara iyileşmesi sağladığı bildirilmiştir [20].

Diğer taraftan büyüme çağında fizyolojik bir süreç olan anjiyogenez yara iyileşmesinde önemli bir role sahiptir. Önceden var olan damarlardan yeni damarların oluşması anlamına gelen anjiyogenezde VEGF önemli bir role sahiptir [21]. Yara iyileşme sürecinin tüm aşamalarında eş zamanlı olarak gerçekleşen yeni kan damarlarının oluşumu ve modellenmesi kritik öneme sahiptir. Hemostatik fazda çok sayıda salgılanan anjiyojenik faktörler anjiyogenezi teşvik ederek, yerleşik endotel hücreleri, FGF, VEGF, PDGF, anjiyogenin, TGF- α ve TGF- β dahil olmak üzere bir dizi anjiyojenik faktöre yanıt verirler. Bu nedenle araştırmacılar birçok eksojen faktörün (protein ve protein kaynaklı faktörler, büyüme faktörleri, peptitler, kan kaynaklı faktörler, mikroRNA'lar, kök hücre bazlı faktörler, küçük moleküller, statinler, deferoksamin, hyaluronan oligosakkaritler ve doğal bileşikler içeren ilaç ve ilaç benzeri bileşikler) yara anjiyogenezi üzerinde terapötik etkileri üzerine araştırmalarını yoğunlaştırmıştır [22]. Ekzozomlar anjiyogenez ile ilgili birçok protein, RNA ve endotel hücrelerinin sinyal yollarını aktive eden miRNA'lar taşımaktadır.

Aynı zamanda ekzozomların VEGF, vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü (VEGFR), VEGF-2, FGF, angiopoietin-1, IL-8 gibi anjiyogenez ile ilgili faktörlerin ifadesini artırdığı bilinmektedir. Heo ve ark. kök hücrelerden izole ettikleri ekzozomların miR-132 ve miR-146 miRNA'ları aracılığı ile endotel hücreleri üzerinde pro-anjiyojenik genlerin ifadelerini artırdığını göstermişlerdir [23]. Han ve ark. hipoksik koşullarda kültüre ettikleri kök hücrelerden izole ettikleri ekzozomların endotel hücrelerinde pro-anjiyojenik etki gösterdiğini raporlamışlardır [24]. Wang ve ark. ekzozomları enjekte edilebilir hidrojele yükleyerek *in vivo*'da ekzozomların anjiyogenez etkilerini araştırmışlardır. Ekzozom uygulaması ile birlikte yara dokusunda kan damarı belirteci olan CD31 ifadesinin arttığını göstermişlerdir [25].

Ekzozomlar yara iyileşmesindeki biyolojik aktivitelerinin yanında bazı kısıtlamalara da sahiptir. Ekzozomlar yara bölgesine direkt uygulandığında yara bölgesinde hızlıca temizlenmekte ve bu durum biyolojik fonksiyonlarının ve terapötik etkilerinin azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle ekzozomların stabilitelerinin ve biyolojik fonksiyonlarının korunması, uzun süreli etki göstermesi ve raf ömrünün uzatılması ancak uygun koşulların sağlanması ile mümkündür. Ekzozomların biyolojik ajan veya hücre gibi yara bölgesinden hızlıca uzaklaştırılmaması ve stabilitelerini korumak için biyoyumlu bir taşıyıcıya yüklenmesi iyi bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Buna ek olarak ekzozomlar taşıyıcı bir sistem ile uygulandığında kontrollü salımları ile intravenöz ve subkütan enjeksiyona göre daha etkili sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında ekzozomların jelatin süngerlere yüklenerek biyolojik fonksiyonlarının korunması, hücre proliferasyonunu sağlayarak ve yara anjiyogenezini uyarması ile yara iyileşmesini hızlandıracağı öngörülmektedir.

Jelatin kollajenin hidrolize uğraması sonucu elde edilen doğal bir proteindir. Kolay ulaşılabilir olması, biyoyumluluğu, biyoemilebilir olması, yüksek su tutma kapasitesi ve çeşitli uygulamalar içinde istenilen formlarda (film, köpük, sünger, mikro-nanopartiküller, fiber vb.) hazırlanabilir olması nedeniyle ile birçok farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda biyolojik ajanların uygulama bölgesine taşınması için sıklıkla tercih edilmektedir.

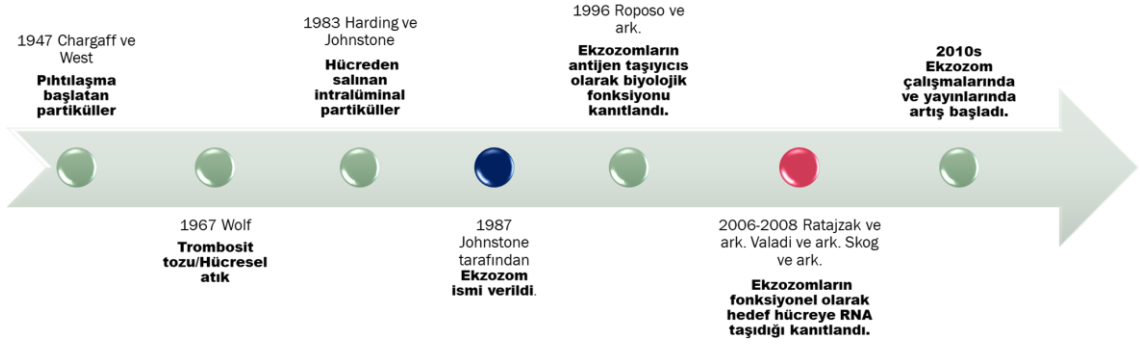
Özellikle sünger yapıdaki jelatin; gözenekli yapıları ve gözeneklerin birbirleri ile bağlantılı olması ile hücrelerin göçü ve sünger içerisine nüfuz etmesi açısından cazip bir ortam oluşturmaktadır. Aynı zamanda gözenekler matriks depolanması, dağılımı, besin ve atık değiş tokuşu için de alan sağlamaktadır. Bu nedenlerle jelatin süngerler 3 boyutlu (3B) gözenekli yapıları, hücre dışı matriks benzerliği, biyolojik ajanlarla gösterdikleri uyumları ve nazik hazırlama koşullarına uyumu nedeniyle ekzozomlar için iyi bir taşıyıcı seçenek olduğu düşünülmüştür. Ekzozom yüklü jelatin süngerlerin hücresiz tedaviye iyi bir alternatif olacağı öngörülmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında sıçan kaynaklı kemik iliği kök hücrelerinden (rt-MKH) izole edilen ekzozomlar jelatin süngerlere yüklenerek yara iyileşmesine yönelik biyolojik etkilerinin *in vitro* deneyler kapsamında araştırılması planlanmıştır. Bu kapsamda rt-MKH kaynaklı ekzozomların izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirildikten sonra jelatin süngerlere yüklenerek ekzozomların fibroblast ve keratinosit hücreler üzerindeki proliferasyon ve migrasyon etkilerinin serbest ekzozomlarla karşılaştırılması planlanmıştır. Aynı zamanda ekzozom yüklü jelatin süngerlerin anjiyojenik etkilerinin bir organ kültürü olan aortik halka ve tavuk embriyosu koryoallantoik membran (CAM) yöntemleri ile değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Elde edilecek bulgular ekzozom yüklü jelatin süngerlerin *in vivo* uygulamaları için yol gösterici olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ekzozomun Keşfi

Ekzozomlar, hücrelerden salgılanan lipidik yapıda, boyutları 30-200 nm arasında değişen ekstrasellüler veziküllerdir. Ekzozomlara ilk olarak 1947 yılında plazmadan pıhtılaşmayı başlatan partiküller olarak rastlanmıştır [26]. Ekzozomların keşfi dolaylı olarak 1955’de Duve’nin endositoz ile birlikte hücre içinde ne olduğu bilinmeyen organellerin “lipozom” olduğu tanımlamasıyla başlamıştır [27]. Böylece hücre zarında gerçekleşen trafik yeni bir araştırma alanı oluşturmuştur. 1967 yılında yine plazmadan ultra santrifüj yöntemi ile elde edilen 50 nm boyutlarında ve lipidik yapıya sahip partiküller “trombosit tozu” olarak adlandırılmıştır ve bu partiküllerin hücre atığı olduğu düşünülmüştür [28]. 1983 yılında ise Harding ve Johnstone öncülüğünde eş zamanlı olarak yapılan çalışmalarda tranferrin reseptörünün olgunlaşmamış alyuvar hücrelerinden endositoz yoluyla 50 nm boyutundaki partiküllere bağlı olarak hücre dışına salındığını keşfetmişlerdir [2, 29]. Bu keşfi takip eden yıllarda salınan partiküller Johnstone tarafından “ekzozom” olarak adlandırılmıştır. 1996 yılında Raposo ve ark. B lenfositlerinden izole ettikleri ve ekzozom olduğunu bildikleri partiküllerin hücreden gelen antijen spesifik MHC sınıf II proteinini taşıdığını göstermişlerdir [30]. Elde edilen bu ekzozomların T hücre yanıtına sebep olduğunu da görüldükten sonra ekzozomların hücreler arası bilgi transferi amaçlı kullanılıyor olabileceği fikri üzerine yoğunlaşmıştır [31]. Daha sonraki yıllarda protein düzeyinde yapılan çalışmalar bu fikrin doğruluğunu kanıtlamıştır. 2008 yılında ekzozom kaynaklarının araştırıldığı geniş çaplı bir çalışmada ekzozomların kök hücreler, kanser hücreleri, nöronlar gibi birçok hücre türünden ve hücre hattından salgılandığı, aynı zamanda kan, idrar, anne sütü gibi birçok vücut sıvısından da izole edilebildiği gösterilmiştir [32]. Daha sonraki yıllarda ekzozomların, hücreler arası mesajcı RNAs (mRNAs), kodlamayan mikroRNA (miRNAs) ve mitokondriyal DNA (mtDNA) gibi nükleotitleri taşımasının keşfedilmesi ile birlikte ekzozom çalışmalarına olan ilgi katlanarak artmıştır (Şekil 2.1) [33]. Ekzozomlar ile ilgili yapılan araştırmalar neticesinde günümüzde kabul gören dört prensip bulunmaktadır: i. ekzozomlar hem endozomal yolk ile hem de direkt hücre zarından salgılanabilir; ii. ekzozomlar makromolekülleri ve sinyalleri hedef hücrelere taşıyabilir; iii. ekzozom biyogenezi protein kalite kontrolü için kullanılabilir bir mekanizmaya sahiptir; iv. ekzozom biyolojik olarak insan hastalıklarında ve sağlığında önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 2.1. Ekzozomun keşfi ve gelişim süreci.

2.2. Ekzozom Yapısı ve İçeriği

Ekzozomların topolojik olarak hücrelerle aynı yapıya sahip olmaları ve boyutlarının 30-200 nm civarında olduğunun bilinmesi dışında ayırt edici morfolojik bir özellikleri bulunmamaktadır. Ayrıca boyutları her ölçümde aynı hücre hattından elde edilmiş olsalar dahi değişkenlik göstermektedir. Aynı zamanda kullanılan cihaz ve yöntemle göre değişkenlik göstermektedir. Örneğin; hidrodinamik boyut ölçümü yapan cihazlar (nanopartikül izleme analizi (NTA), direnç darbe algılama vb.) ekzozom uzantısı protein ve glikanlar arasındaki uzaklığı ölçerken, taramalı elektron mikroskobu (SEM) bu uzantılara karşı hassas değildir ve direkt zar yapısını verir. Ancak bu yöntemde protokol gereği büzülme, şişme veya düzleşme gibi boyutları etkileyebilecek problemler yaşanabilir. Atomik kuvvet mikroskobu veya soğuk-elektron mikroskobu gerçek boyut ölçümü için çözüm olabilir. Geleneksel elektron mikroskobu ile ekzozomlar görüntülenemez. Ancak ekzozom zarına, proteinlerine, karbonhidratlarına veya nükleotitlerine spesifik boyama ile beraber floresan mikroskop ekzozom görüntülemek için kullanılabilir. Analiz yöntemleri sonuçlarındaki bu tutarsızlıklara karşılık soğuk-elektron mikroskobu ile yapılan bir analizin elde edilen ekzozomların neredeyse tamamının küresel yapıda olduğu ve boyutlarının yaklaşık olarak 30-200 nm arasında olduğunu gösteren sonuçları ekzozomların yapısıyla ilgili kabul edilir sonuçlar vermiştir. Ancak aynı çalışma ekzozomlar ile birlikte biyolojik üretim aşamasında üretilmiş olabilecek belirsiz şekillerde birçok partikülün tespit edildiği ayrıca saflığı bozan lipoprotein, eksomer, RNA-protein parçaları veya protein kümelenmeleri gibi vücut sıvısında bulunan partiküllerin de tespit edildiğini belirtilmektedir [34].

Bu heterojen yapıdan dolayı ekzozomların tanımlanması için küçük ekstrasellüler vezikül (sEV) tanımı da kullanılmaktadır. Özellikle izolasyon protokolleri ekzozomların saflığı üzerinde büyük etkiye sahiptir.

Ekzozomlar birçok protein, glikan, lipit ve nükleik asit içermektedir. Ekzozom proteinleri oldukça geniş bir sınıftan oluşmakta olup bunlar; transmembran proteinleri, lipide bağlı zar proteinleri, çevresel zar proteinleri, çözünebilir ekzozom içi proteinleri ve enzimlerdir.

Ekzozomların yüzey proteinleri ile ilgili çalışan Escola ve ark. ekzozomların yüzey biyobelirteci olan tetraspaninler (CD81, CD63, CD37, CD82, CD9) açısından oldukça zengin olduğunu göstermiştir [35]. Hücre tipine göre ekzozomların taşıdıkları yüzey biyobelirteçleri değişmektedir ancak zamanla ekzozom karakterizasyonunda en çok CD81, CD63 ve CD9 proteinleri kullanılmaya başlanmıştır. Tetraspaninler kendi başlarına herhangi bir katalitik aktiviteye sahip değildir. Fakat zar proteinlerinin fonksiyonlarının, iletişiminin, kararlılığının ve oligomerizasyonunun yürütülmesinde görev alır [36]. Tetraspaninlerin, majör histokompatibilite kompleks (MHC) sınıf II proteinleri, immünnoglobulin süper ailesi üyesi 8 (IGSF8), hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), sindekan, integrin ve diğer birçok ajanın ekzozom yapısına dahil olmasında etkili olduğu düşünülmektedir [37]. İntegrinler ve ekzozomların iş birliği, integrin proteinlerinin metastaz öncesi niş gelişiminde ve kanser metastazının organotropizminde etkili olması açısından önemlidir [38]. Ayrıca ekzozom tetraspaninleri virüs kodlu yüzey proteinlerinin ekzozomlar üzerinde salgılanma sürecine dahil olmaktadır. Örneğin Epstein-Barr virüsü (EBV) gizli zar proteini 1, hücrelerden ekzozomlar üzerinde salgılanmaktadır ve bu fiziksel bağlantının bir kısmı CD63 proteinleri aracılığıyla gerçekleşmektedir [39]. Tetraspaninlere ek olarak yapılan çalışmalar ekzozomların zar yüzeylerinde epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), mast/kök hücre büyüme faktör reseptörü (c-Kit), vasküler endotel büyüme faktörü tip 2, insülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü, T hücre reseptörü, sitokin reseptörleri, G proteini kenetli reseptörleri, Notch reseptörlerini ve diğer birçok proteini bulundurduğunu göstermiştir [40]. Bu çalışmaların hepsi ekzozomların yüzey proteinlerini taşıdığı ve bu proteinlere spesifik fonksiyonel etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Ekzozomların lipide bağı dış zar proteinlerini çoğunlukla bir fosfogliserit olan gliko fosfatidilinositole (GPI) bağı proteinler oluşturmaktadır. Bunların içerisinde ektonükleotidaz CD39 ve CD73, bir sperm reseptörü olan Juno, hücrel prion proteinleri (PrP^C) ve onun amiloidojenik konformeri PrP^{SC} bulunmaktadır [41]. Her bir protein farklı hücrel fonksiyonlarda görev almaktadır. Ekzozomların bir diğ dış zar proteinlerini çevresel faktörlerle ilgili proteinler oluşturmaktadır ve bu proteinler genel olarak sinyalizasyona dahil olmaktadır. Böylece ekzozomlar birçok Wnt proteini ve onların kargo reseptörleri/yolak proteinlerini taşımaktadır. Ayrıca ekzozomlar morfogenetik kemik proteinleri, dönüştürücü büyüme faktörü β , ilk apoptoz sinyal (FAS) ligandı, tümör nekroz faktörü (TNF), sitokinler ile birlikte çok sayıda otokrin ve parakrin sinyalizasyon proteinlerini yüzeylerinde taşınmaktadır [42]. Bu proteinlere ek olarak ekzozom yüzeyi fibronektin, tenaskin, ECM1 gibi hücre dışı proteinleri açısından da oldukça zengindir [40].

Hücre zarının iç tarafında ise yine lipide bağı zar proteinleri ve zara bağı ekzozom yapı proteinleri bulunmaktadır. Lipide bağı proteinler arasında küçük GTPazlar (Rabs, Ras, Rho vb.), sinyalizasyon kinazlar (Src gibi) ve bazı zar proteinleri bulunmaktadır. HIV veya HTLV-1 gibi retrovirüsler tarafından enfekte edilmiş hücrelerden salgılanmış ekzozomlar da ise Gag proteini belirteç olmaktadır. Lipide bağı proteinler arasında en dikkat çeken aktiviteye bağı hücre iskeleti (ARC) proteinleridir. Gag benzeri bu proteinler öğrenme ve hafıza özelliklerinde büyük önem taşır. Öğrenme ile aktive olan ARC proteinleri ekzozom ile hücre dışına salgılandıktan sonra hedef hücre tarafından içeri alınır ve kendi mesajcı RNAsı ile hücre içerisinde etkisini gösterir [43]. Ekzozom yapı proteinleri ise ekzozom iskeleti proteinleri ile hücre zarından gelen proteinlerin bağlanması sonucu aktive olmaktadır. CD44, CD34, IGSF8, PTGFRN gibi birçok protein bu şekilde görev alır. Bir diğ yapı proteini sentenin ekzozom proteinlerinin bir araya toplanmasını sağlamaktadır. Ayrıca CD63 ve Alix proteinleri ile de etkileşim içerisinde çalışmaktadır [40]. Alix yapı proteini sentenin yanında tümör baskılayıcı gen 101 proteinine (TGS101) ve ESCRT için gerekli olan yüklü mültiveziküler cisimcik (MVB) proteini 4 (CHMP4)'e bağlanarak çalışır. ESCRT mekanizması ESCRT-0, I, II ve III protein komplekslerini içerir. Diğ proteinlerle birlikte MVB biyogeneğinde, sitokinezde, otofajide ve virüs gelişiminde rol oynamaktadır. MVB'deki etkisiyle beraber ekzozom biyogeneğinde de rol aldığı düşünülmektedir[44].

Bir diğ er yapı proteini ısı ş ok proteini 70 (HSP70) ekzozom içerisinde k umelenmiş veya yanlış katlanmış proteinlere bağlanarak etki göstermektedir [45]. ESCRT ve TGS101, HSP70 proteinleri ekzozom karakterizasyonu için kullanılabilir.

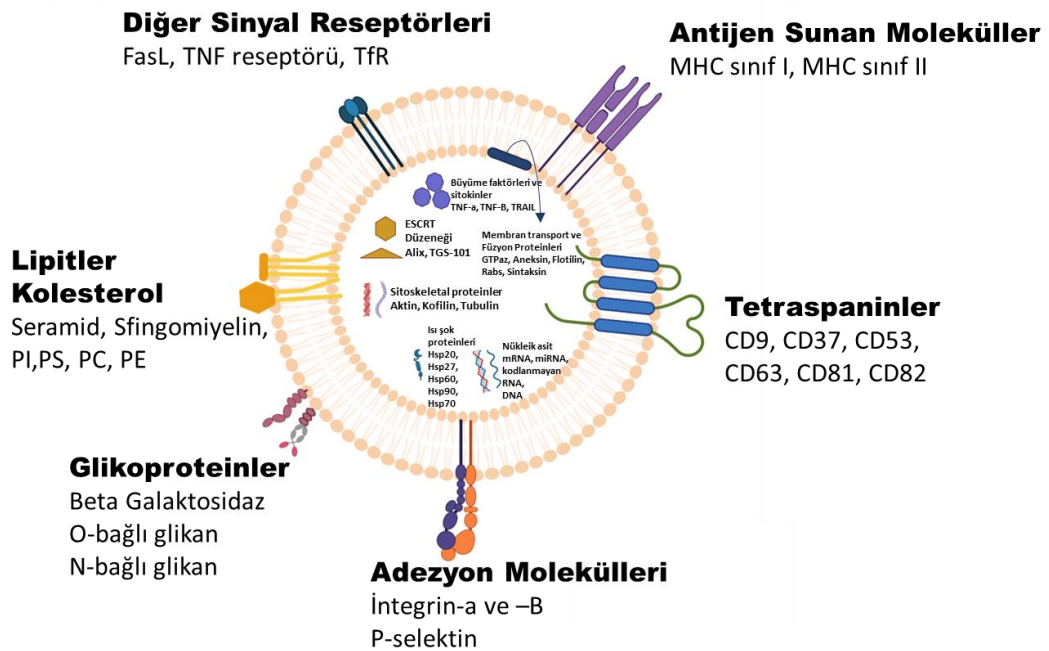
Ekzozomlar CD39, CD73, fosfataz, pirofosfataz, kalsiyum bağlayıcı aneksin, fosfat taşıyıcıları ile birlikte RNA düzenleyici enzimleri, lipaz, proteaz, metabolik enzimleri de taşımaktadır. Bu enzimlerin varlığı ekzozomların hücreler için birer rezervuar görevi gördüğü ihtimalini güçlendirmektedir [40].

Ekzozomlar yukarıda bahsedildiğ i üzere birçok kargo proteini içermektedir. Ancak tek bir hücre hattından elde edilen ekzozomlarda 3000'den fazla protein varlığına rastlanmıştır. ExoCarta veri tabanında ekzozom belirteci olarak listelenen proteinlerin birçoğunun hücreye özel proteinler olduğu görülmektedir. Bu durum ekzozomların hücre sitoplazma ve zarından aldığı parçalarla açıklanabilir[45]. Ekzozomun içeriğindeki çok sayıdaki proteinin ancak bir kısmı hücre tarafından bir amaç doğrultusunda kargolanmaktadır.   z n r proteinler ise ekzozomlar ile etkileşime girmeden hedef hücre üzerinde bağımsız olarak etki gösteriyor olabilirler. Ekzozom boyutlarında ve kargolarındaki bu çeşitlilik ayrıca heterojen bir ekzozom doğası oluşturur. Hücrenin içeriğine, ekzozomu oluşturan zar ve sitoplazma parçalarına ve boyutuna göre taşıma kapasitesine bağlı olarak birbiri ile tamamen aynı ekzozom izolasyonu yapmak mümkün değildir. Bu heterojenite bir problem olmamakla birlikte ekzozom biyogenezinin birçok farklı konumda gerçekleştiğini göstermektedir.

Ekzozomun en dış yüzeyinde yüzey proteinlerine ve lipit katmanına bağlı halde bulunan glikan örtüsü bulunmaktadır. Ekzozomlardaki bu glikan örtüsünün varlığı, ekzozomların  -2-6 siyalik asit, heparan sülfat açısından zengin olduğunu ve heterojen halde yüzey karbonhidratlarına sahip olduğunu göstermektedir. Kans r hücreleri her durumda olduğu gibi yine sağlıklı hücrelerden farklı glikan belirteçleri içermektedir. Glikan örtüsünün yanında ekzozom zarı seramid, kolesterol, sfingomiyelin, glikosfingolipit, fosfatidik asit (PA), fosfatidilinositol (PIs), fosfatidiletanolamin (PE), fosfadilserin (PS), fosfatidikolin (PC) ve düşük oranda birçok lipit türü içermektedir. Lipitler ekzozom biyogenezinde aktif rol alır [46].

Ekzozomlar biyolojik özelliklerini büyük oranda içerdikleri hücre dışı RNAlarından almaktadır. İlk olarak RNA içeren kök hücre ekzozomlarının taşıdıkları Oct-4 mRNA'sının hedef hücreye aktarmasının keşfi ile ekzozom çalışmaları için yeni bir dönem başlamıştır. Daha birçok çalışma ekzozomların RNA taşıyıcı olduğunu kanıtlamaktadır. Ekzozomlar büyük miktarlarda RNA taşımamaktadır onun yerine RNA alt popülasyonuna ait küçük kodlanmayan RNAlar (ncRNA), küçük çekirdek RNAları (snRNA), mikro RNAlar (miRNA), transfer RNAları (tRNA), küçük susturucu RNAlar (siRNA) gibi çeşitli RNAları içermektedir [40]. Ekzozomlar, salgılandıkları hücre RNA profiline benzer RNA içeriğine sahip olmaları sayesinde hücreye özel karakter gösterirler.

Ekzozomlar ayrıca tek sarmallı DNA, çift sarmallı DNA, genomik DNA, mitokondriyal DNA ve ters transkripsiyonlu tamamlayıcı DNAları içermektedir [47]. DNAların ekzozomların içeriğine yüklenmelerinde herhangi bir seçimin olup olmadığı, yüklenme miktarlarının neye göre belirlendiği henüz tam olarak bilinmemektedir. DNAların fizyolojik rolleri hakkında bazı tahminler bulunmaktadır. Şekil 2'de ekzozomun yapısı ve içeriği verilmiştir.



Şekil 2.2. Ekzozomun yapısı ve içeriği.

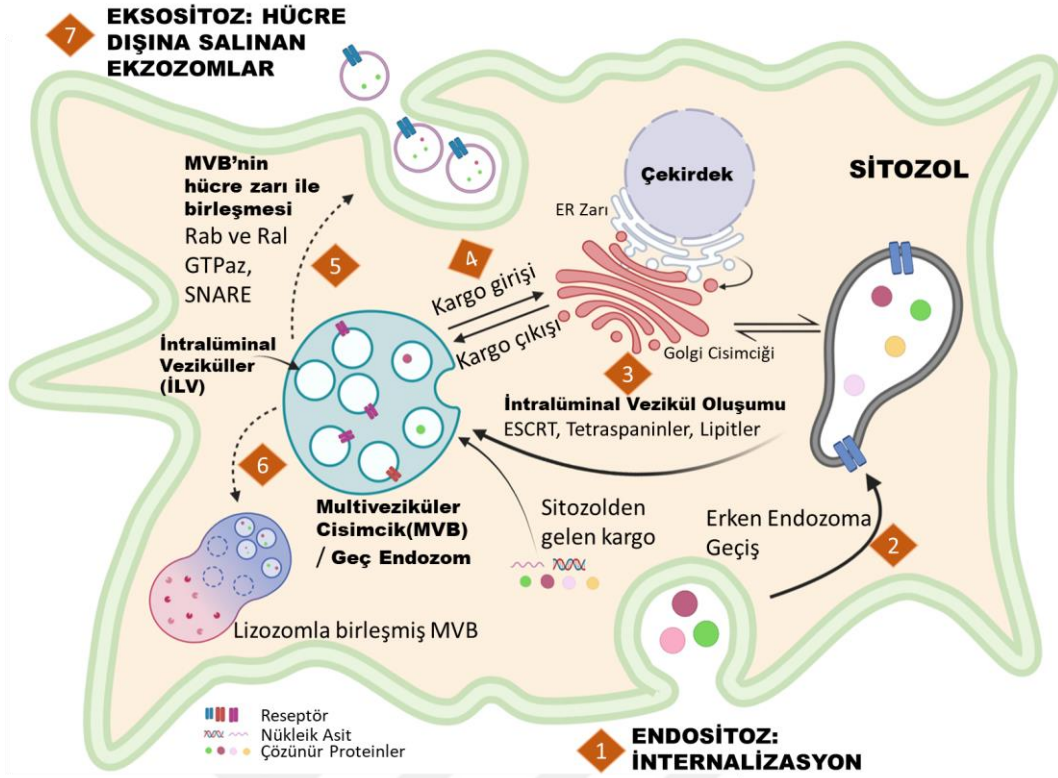
2.3. Ekzozom Biyogenezi

Ekzozomların salgılanma amacı birbirleri ile temas halinde olmayan hücrelerin iletişim kurmalarını sağlamaktır. Ekzozomlar ile birlikte hücrelerden mikroveziküller (200-500 nm) ve apoptotik cisimcikler (500-1000 nm) salgılanır. Diğer veziküller ile ekzozomları birbirinden ayıran en temel özellik boyutlarıdır. Ayrıca farklı biyogenezler sonucu taşıdıkları kargo ve proteinlerde farklılık göstermektedir [48]. ESCRT hücre zarı deformasyonlarında kapama ve onarımda etkili olan bir mekanizmadır. Ekzozom biyogenezi ESCRT'ye bağlı ve bağlı olmayan olmak üzere iki farklı yol ile gerçekleşir. ESCRT'ye bağlı ekzozom biyogenezinde sıralı endozomal olaylar gerçekleşirken bağlı olmayan biyogenezde ekzozomlar hücre zarından direkt olarak salgılanmaktadır [40]. ESCRT'ye bağlı biyogenezde ilk olarak hücre zarının içe doğru katlanması ile birlikte hücre zarı proteinlerini ve hücre dışı çözünür proteinlerini içeren erken endozom oluşur. Erken endozoma daha sonra trans-golgi ağı ve endoplazmik retikulum da dahil olabilir. İlerleyen aşamalarda erken endozom üzerinde ikinci endozom gelişir ve zar ikinci kez hücre proteinleri ile birlikte içe katlanarak geç endozomla birlikte multiveziküler cisimciği (MVB) oluşturur. MVBler hücre içerisinde hücre iskeleti ve mikrotübüller aracılığı ile hareket eder. MVBler ileride ekzozom olacak intralüminal vezikülleri (ILV) içermektedir. Oluşan ILV'ler içerisine yüklenen proteinler üst oligomerizasyon ve hücre zarı bağlanması ile gerçekleşmektedir. ILV'ler ile yüklü MVBler lipozom ve otofagozomlar ile birleşerek degrade olabilir veya hücre zarı ile birleşerek içerisindeki vezikülleri “ekzozom” olarak hücre dışına salgılar (Şekil 2.3) [49]. Endozoma bağlı ekzozom biyogenezi olgunlaşma sürecindeki retikülositlerle yapılan transferin reseptörünün salgı çalışmalarından yola çıkılarak keşfedilmiştir [29]. Ekzozom biyogenezinin ikinci yolağı olan hücre zarından direkt salgılanma ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca farklı iki yoldan salgılanan ekzozomları karşılaştırma amaçlı herhangi bir çalışma da yapılmamıştır. Ancak atomik kuvvet mikroskobu (AKM) ile yapılan çalışmalar, kök hücrelerin hücre zarında meydana gelen tomurcuklanma oranı ile elde edilen ekzozom (~50-100 nm) oranının aynı olduğu gösterilmiştir [50]. Bu çalışmanın öncesinde ve sonrasında yapılan birçok çalışma ile birlikte ekzozomların direkt olarak hücre zarından salgılanabildiğini kanıtlanmıştır [51]. Ekzozom biyogenezinde rol alan birçok protein ve lipid bulunmaktadır.

Rab bağlantılı GTPaz Rab proteini, Sintenin-1, TGS101 (tümör duyarlı gen 101), ALIX (apoptoz bağlantılı gen 2- etkileşim proteini X), sindekan-1, ESCRT proteinleri (ESCRT 0, I, II, III), fosfolipitler, tetraspaninler, seramidler, sfingomiyelinazlar ve SNARE (çözünür N-etilmaleimid duyarlı faktör (NSF) bağlantılı protein reseptör) kompleks proteinleri ekzozom biyogenezinde rol alan proteinlerdir. Ancak özel olarak görevlerinin özellikle *in vivo* da detaylı şekilde incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca belirli hücre tipleri, hücre kültürü koşulları ve hücrelerin genomik sağlığı ekzozom biogenezini direkt olarak etkilemektedir [52].

ESCRT mekanizması ESCRT-0, I, II, III ve VSP4 proteinleri, SNARE kompleks proteinleri ve efektör Rab proteinleri ile biyogenezde etkili olmaktadır. ESCRT'nin hücre zarındaki görevinden dolayı ekzozom biyogenezinde de zar bölünmesinde etkili olması beklenen bir durumdur ancak özellikle ESCRT'nin aktive olmasını sağlayan VSP4 proteinin yokluğunda ekzozom salımının herhangi bir aksaklığa uğramadığı görülmektedir [53]. Bu görevin dışında ESCRT birçok proteini ile biyogenezde aktif rol oynamaktadır ve ekzozom içeriğinde de bulunmaktadır. ESCRT mekanizmasının ilk basamaklarından biri hepatosit büyüme faktörünün ESCRT-0 tirozin kinaz substratını (Hrs) düzenleyerek PI3P zengini endozomal kısımların oluşmasıdır. PI3P erken ve geç endozomda hücre sinyallerini ve zar trafiğini kontrol eden bir fosfolipittir. ESCRT-0 aynı zamanda tümör duyarlı gen 101 (TGS101) alt bileşiği aracılığı ile ESCRT-I ile etkileşir. ESCRT-I ve ESCRT-II birlikte protein kümelenmelerinin etrafında erken endozomdan içeri doğru endozomal tomurcuklanmaların oluşmasını sağlar. Daha sonra ESCRT-III alt bileşiği olan yüklü mültiveziküler cisimcik proteini 6 (CHMP6) ESCRT-II'ye bağlanır. CHMP4 ve CHMP3 proteinlerinin de aktive olmasıyla birlikte MVB içerisinde ILV'ler oluşur. Alix proteini ESCRT mekanizmasında önemli görevleri olan bir başka proteindir. Alix ESCRT-III alt bileşiklerine ve sindekanlara bağlanarak ILV oluşumunda görev almaktadır ve geç endozomda tetraspaninler ile ekzozom zarı arasında etkileşim sağlamaktadır.

Lipitler ekzozom biyogenezinde içeri ve dışarı doğru katlanabilmeleri açısından büyük önem taşımaktadır. Fosfolipitlerin, sfingolipitlerin ve kolesterolün ekzozom biyogenezindeki etkileri bilinmektedir. Fosfaditilserin (PS) ve fosfaditiletanolamin (PE) varlığında ekzozomların hücre zarından farklı olarak zar asimetrisine sahip olmadığı görülmüştür. Ekzozom zarının iki katmanı arasında ani fosfolipit karışımları meydana gelebilir [54]. Fosfotidik asit (PA) ise ekzozom protein-lipid etkileşimini mümkün kılan bir fosfolipittir. Sintenin ile etkileşerek sindekan, CD63 ve Alix proteinlerinin ILV oluşumunda etkili olmalarını sağlamaktadır. Ayrıca PA'lar sfingomiyalinazlar ile birlikte seramid üretimini artırarak ESCRT'ye bağlı olmayan ekzozom salımında etkili olmaktadır. PA sentezi yapan fosfolipaz enziminin in vitro ekzozom çalışmalarında ekstra olarak fosfolipaz kullanımı ekzozom üretiminin artırılması için iyi bir strateji olabilir. Bir sfingolipit olan seramid, ESCRT'ye bağlı olmayan süreçleri tetiklemesi ve zar katlanmalarının kendiliğinden gerçekleşmesini sağlaması açısından ekzozom biyogenezi için önemli bir lipittir. *In vitro*'da sentetik zar ile yapılan çalışmalar seramid sentezinden sonra zar katlanmasının ve vezikül oluşumunun arttığını göstermiştir [55]. Tetraspaninler de seramidler ile etkileşerek hücreler arası iletişimi ve yapışmayı sağlayan β -kateninin proteininin salgılanmasını sağlamaktadır. Kolesterol ise ESCRT'ye bağlı biyogeneizde gerekli bilgilerin zar üzerinde sıralanmasını sağlayarak ekzozom oluşumuna uygun ortamı hazırlayan bir lipittir. Bu özelliklerle beraber lipitlerin ekzozom biyogenezindeki etkileri tamamen hücreye bağlıdır. Örneğin seramid yokluğunda melanoma hücrelerinden salınan ekzozom profilinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir [56]. Rab GTPazlar yaklaşık olarak bilinen 70 protein içeren Ras GTPaz süper ailesinin üyeleridir [57]. Genel olarak GTP- ve GDP- bağlanma döngüsünde etki gösterirler. GTPye bağlı durumda efektör proteinlerle etkileşirler ve vektörel zar trafiğinde rol oynarlar. Ekzozom biyogenezinde ise endositoz ve salgı yolları ile ilişkilendirilir. Rab27a ve Rab27b proteinleri MVB biyogenezinde birçok işleve sahiptir. Rab27a ekzozom boyutlarını belirlerken Rab27b bununla beraber zar trafiği ve MVBlerin hücre içindeki konumunu belirlemede rol alır. Rab27 proteinleri hem endosoma bağlı biyogeneizde hem de plasma zarı biyogenezinde rol oynamaktadır. Rab11 ve Rab35 proteinleri endozom döngüsünde ve ekzozom salgısında etkilidir. Rab7 proteini MVB'lerde zar trafiğini sağlarken; Rab26, Rab5a ve Rab9a proteinleri ekzozom salgısını artırmaktadır. Lipitlerde olduğu gibi Rab proteinlerinin etkileri de bulundukları hücre tipine göre değişmektedir.



Şekil 2.3. Ekzozom biyogenezi.

2.4. Ekzozom Hedef Hücre İlişkisi

MVB içerisindeki ILV'ler ekzozom olarak hücre dışına salgılanmaktadır. Salınan ekzozomların hedef hücrelere rastgele mi ulaştıkları yoksa spesifik hedef belirleyici mi taşıdıkları henüz bilinmemektedir. Ekzozomların hücreler tarafından içeri alınma mekanizmasının anlaşılmasında topikal benzerlikleri sebebiyle virüs mekanizmasından oldukça faydalanılmıştır [58]. Ekzozomlar hedef hücre etkileşimi üç farklı yol ile gerçekleşmektedir: i. direkt hücre zarıyla birleşme, ii. ekzozomların yüzey proteinlerinin hedef hücre zarı reseptörlerine bağlanması, iii. endositoz (fagositoz, mikropinositoz, lipid raft-, klatrin- veya kaveolin- dolaylı endositoz) [59]. Tetraspanin, immünoglobülin, proteoglikan, veya lektin gibi ekzozom yüzey moleküllerinin hücre tarafından alınma mekanizmasındaki rolleri tam olarak bilinmemektedir. Kanseri tedavileri için ise ekzozomların taşıdıkları PD-L1, TNF, FasL ve TRAIL gibi ligandların tümör hücrelerinde reseptörleri bulunduğundan iyi bir çalışma alanı sunmaktadır [60]. Ekzozomlar hücre zarı ile birleştiğinde kargosunu hücre içine bırakarak görevini tamamlamaktadır. En etkin yolun ise endositoz olduğu düşünülmektedir [59].

Endositoz ile hücre içine alınan ekzozomların etkisini gösterebilmesi için lizozom tarafından degrade edilmeden, hücre tarafından geri dönüştürülmeden veya endozomal yolak ile tekrar hücre dışına atılmadan önce endozomdan çıkması gerekmektedir. Ekzozomlar pH kontrollü ya da geçirgenlik sayesinde endozomdan çıktıktan sonra kargolarını ilgili bölgeye taşırlar ancak bu noktadan sonrasının açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Ekzozomlar kan içerisinde taşındığında hedef organa ulaşmadan önce damarın endotel katmanını geçmesi gerekmektedir. Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalar ekzozomların kan beyin bariyerinden (BBB) geçebildiğini göstermiştir. Bu çalışma ekzozomların endotel bariyerinden hedef hücrelere taşınma mekanizmasının transsitoz olabileceğini göstermiştir [61].

2.5. Ekzozom İzolasyonu ve Saflaştırma

İzolasyon yöntemleri ekzozom saflığını belirleyen önemli bir adımdır. Saf ekzozom izolasyonu ise elde edilen ekzozomların etkilerini anlamak açısından büyük önem taşımaktadır. Ekzozom araştırmaları için altın standart olarak kabul edilebilecek bir izolasyon yöntemi bulunmamaktadır. Gelişmelerle birlikte yeni izolasyon yöntemleri de keşfedilmeye devam etmektedir. Ancak dünya genelinde %80 oranında ekzozom izolasyonu için diferansiyel santrifügasyon dahil ultra santrifügasyon yöntemi kullanılmaktadır [62]. Ultra santrifüj yöntemi hücre kültürü besi ortamından izolasyon yapmak için uygun bir seçenek olmaktadır ancak plazma kompleks biyolojik sıvılardan ekzozom izolasyon ve saflaştırma yapabilmek için farklı izolasyon yöntemlerinin kombinasyon halinde kullanılması gerekmektedir. Bu yöntemler arasında ultra filtrasyon, büyüklükçe ayırma kromatografisi, polimer çöktürme veya yoğunluk gradyan santrifügasyonu bulunmaktadır [63]. Ekzozom izolasyonu için kullanılan her bir metot ayrı ayrı avantajlar ve dezavantajlar taşımaktadır.

2.5.1. Ultra santrifüj – Yoğunluk Gradyan Ultra Santrifüj

Ultra santrifüj basitçe belli bir merkezkaç kuvveti altında yoğunluk ve boyuta göre partiküllerin ayrıştırılması sağlamaktır. 1983 yılında ekzozomların tanımlandığı retikülositler ile yapılan çalışmada da ekzozom izolasyonu için ultra santrifüj kullanılmıştır [29]. Günümüzde yüksek hızlarla yapılan protokol ise 2006 yılında Theye ve ark. tarafından standardize edilmiştir [64].

Besi ortamı ile yapılan bir izolasyonda ilk olarak 300 g'de hücreler, 2000 g'de apoptotik cisimcikler, 10.000 g'de de mikro veziküller uzaklaştırıldıktan sonra ultra santrifüj aşamasında 100.000-120.000 g'de ekzozomlar çöktürülmektedir. Ultra santrifüj metodu ayrıca konsantre santrifüj tüpleri (Amicon® ultra santrifüj filtreleri gibi) ile birlikte büyük hacimler konsantre edilerek de kullanılabilir. Ultra santrifüj yöntemi büyük hacimler için kullanılabilmesi, herhangi bir uygulama uzmanlığı gerektirmemesi ve basit protokolü açısından avantajlıdır. Dezavantaj olarak yüksek hızda ekzozomların yanında lipoproteinler, protein kümelenmeleri ve ekzozom dışında birçok protein de çökmektedir [65]. Yoğunluk gradyan santrifügasyonu kan hücreleri ortamı gibi heterojen ortamlardan farklı hücrelerin yoğunluk farkına göre ayrıştırılmasını sağlamaktadır. Bu prensibe dayanarak ekzozom izolasyonu için de kullanılmaktadır. İzolasyon protokolü gereğince ilk olarak tüp içerisine farklı yoğunluklarda alttan yukarı doğru azalacak şekilde örnekler yerleştirilir. Daha sonra izolasyon yapılacak sıvı tüpe doldurulup yüksek hızda (100.000 g – 16 saat) santrifüj edilir. Zamanla örnekler ile aynı yoğunluğa sahip partiküller ayrışıp tüp içerisinde yoğunluklarına göre konumlanır. Böylelikle ekzozom ile aynı yoğunluğa sahip örnekten ekzozom elde edilmektedir [66]. Ultra santrifüjden daha saf ekzozom izolasyonu sağlaması sebebiyle çalışmalarda %11.6 oranında kullanılan yoğunluk gradyan ultra santrifüj yöntemi kullanımı artmaktadır [67].

2.5.2. Ultra Filtrasyon (UF)

Ultra filtrasyon (UF) yöntemi boyut ve moleküler ağırlığa göre ayırma yapmaktadır. Yöntemin uygulanmasında belirli boyut ve ağırlıktaki partiküllerin geçişine izin veren membran filtreler kullanılmaktadır. Bu yöntem ultra santrifüjden daha hızlı ve seri izolasyon yapmaktadır. İzolasyon protokolünde ekzozomdan büyük partikülleri ve hücreleri (> 200 nm) ayıracak bir membran ile birlikte ekzozomlardan daha küçük proteinleri de uzaklaştırılması için ikinci bir membran kullanılmaktadır [68]. Aynı yöntemin sıralı olarak uygulandığı bir diğer protokole ise öncelikle 1000 nm'den büyük partiküller uzaklaştırıldıktan sonra moleküler ağırlığa bağlı olarak 500 kDa altındaki proteinler ile izolasyona devam edilmektedir. İzolasyonun son aşamasında ise proteinler 200 nm'lik filtreden geçirilir ve ekzozom izolasyonu tamamlanmış olur [69]. Uygulama kolaylığı ve hızlı protokolü sayesinde ultra filtrasyon yöntemi kullanılan yöntemler arasında %5.4'lük bir paya sahiptir [70]. Avantajlarının yanında membranların tıkanması ile maliyet artmaktadır ve ayırma verimi düşmektedir. Çapraz akış filtrasyon tekniği bu probleme bir çözüm sunmaktadır. Bu yöntemde hidrodinamik akış kuvvetinden faydalanılmaktadır ve ayrıca paralel akış sayesinde membran ömrü de uzamaktadır [71].

Membran tıkanması ile birlikte ekzozomlar ile aynı boyutlardaki partiküllerin de elde edilmesi problemi yoğunluk gradyan ultra santrifügasyon yöntemi gibi kombine bir çalışma ile çözülebilir. Ancak membran üzerine uygulanan kuvvet ekzozom zarında hasara sebep olabileceğinden protokol dikkatli bir şekilde planlanmalıdır [69].

2.5.3. Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (SEC)

Büyüklükçe ayırma kromatografisi (SEC) 1955 yılında farklı moleküler ağırlığa sahip partiküllerin nişasta ve sudan oluşan bir kolondan geçirilerek ayrılması prensibine dayanarak geliştirilmiştir [72]. Yıllar içinde geliştirilen teknikte geçiş sıvısı olarak dekstran polimer, agaroz ve poliakrilamid gibi gözenekli malzemeler kullanılmaya başlanmıştır. Uygulama yapılırken kolon içerisindeki malzeme gözeneklerinden küçük partiküller ilerlemeye devam ederken daha büyük partiküller gözenekler tarafından tutulmaktadır. SEC kolonları diğer yöntemler arasında herhangi bir dış kuvvet uygulanmaması sayesinde ekzozomların doğal halinin en iyi korunduğu yöntem olarak öne çıkmaktadır [73]. Ancak UF yöntemine benzer şekilde SEC kolonları ile saf ekzozom elde etmek ancak kombine metotlar ile mümkün olmaktadır [65].

2.5.4. Polimerle Çöktürme

Polimer presipitasyon yöntemi yüksek derece hidrofilik polimerlerin ekzozomların etrafındaki su molekülleri ile etkileşerek hidrofobik bir mikro çevre oluşturması prensibine göre çalışmaktadır. Hidrofilik polimerler arasında polietilen glikol (PEG) toksisite göstermemektedir ve en çok tercih edilen polimerdir [74]. Presipitasyon aşamasından önce büyük partiküllerin izolasyon sıvısından uzaklaştırılması gerekmektedir. Daha sonrasında polimer ile gece boyunca +4°C bekletilen ekzozom içeren biyolojik sıvı düşük hızda (1500 g) santrifüj edilmektedir. Proteinlerin çökmesi için yetersiz kalan bu hızda daha saf ekzozom izolasyonu yapılmaktadır. Bu protokol kan, hücre kültürü ortamı, idrar veya omurilik sıvısı gibi çeşitli sıvılardan ekzozom izolasyonu yapmak için kullanıma uygundur [75].

2.5.5. İmmünoafinite ile Saflaştırma

İzolasyon yöntemleri arasında en saf ekzozom izolasyonunun yapılabileceği yöntemlerden biri immüno afinite saflaştırma yöntemidir. Ekzozomların çoğunda bulunan ortak protein ve reseptörler bilinmektedir. Bu yöntemde ekzozom proteinleri ve reseptörlerine özel biyo belirteçler kullanılarak bağlanma ile ayırma işlemi yapılır [76]. Rab5, CD81, CD63, CD9 trans membran proteinleri, Alix, lipide bağlı proteinler, fosfolipazlar gibi ekzozom yüzeyinde bulunan ekzozom belirteçleri immüno afinite

izolasyonu için kullanılabilir. Son yıllarda geliştirilen ekzozom izolasyon kitleri antikör kaplanmış manyetik boncuklar sayesinde ekzozom izolasyonu ile hızlı tanı yöntemleri sunmaktadır [77]. Ancak kullanılan izolasyon tamponlarının kimyasal özellikleri ekzozom yapısını değiştirebilmektedir. Bu yöntem tedavi amaçlı ekzozom izolasyonundan çok tanı amaçlı izolasyonda kullanılmalıdır [78].

2.5.6. Mikroakışkan Temelli İzolasyon

Mikroakışkan temelli izolasyon, tanı sistemleri için ekzozom izolasyonunun ve karakterizasyonunun bir arada olduğu hızlı bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde çok az miktarlardaki örneklerden ekzozom izolasyonu ile non-invazif erken dönem kanser teşhisi yapılabilmektedir. Aynı zamanda sinyal dedektörleri ile entegre çalışabildiğinden izolasyon sırasında karakterizasyon da yapılabilmektedir [79]. Mikroakışkan sistemleri ekzozomların fizikokimyasal özelliklerinin de tayin edilebilmesi istendiğinde immüno afinite yöntemiyle birlikte kullanılabilir. Bu sistemlerin kombine edildiği izolasyon kitleri de ticari olarak kişiye özel kullanıma sunulmuştur [80].

2.6. Ekzozom Karakterizasyonu

İzole edilen ekzozomların prelinik veya klinik kullanımından önce saflığının ve biyolojik etkilerinin anlaşılabilmesi açısından karakterizasyon büyük önem taşımaktadır. Karakterizasyon için boyut, şekil, yüzey yükü, yoğunluğu ve içerik analizleri yapılmaktadır. Bu analizler içerisinde nanopartikül izleme analizi (NTA), dinamik ışık saçılım spektrometresi (DLS), “*resistive pulse sensing*”, elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskopisi, western blot analizi ve akış sitometrisi bulunmaktadır.

2.6.1. Nanopartikül İzleme Analizi (NTA)

Nanopartikül izleme analizi (NTA), ekzozomların biyofiziksel karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekzozomların sıvı faz içerisinde hızının ölçülmesi ile birlikte her bir partikül için görüntü işleme yapılmaktadır. Böylece 10 nm ile 2 µm arasındaki ekzozom boyutları, boyut dağılımı, partikül açısından konsantrasyon tayini yapılabilmektedir. NTA analizi ile 30 nm boyutlarındaki ekzozomlar dahi tespit edilebilir [81]. Analizin hazırlık aşaması oldukça kolaydır ve sonuçlara da birkaç dakika içerisinde ulaşılabilir. Ayrıca analiz sonrasında ekzozomların doğal yapıları da korunmaktadır [82]. Analiz başarısı örnek hazırlama aşamasında doğru seyreltmenin yapılmasına bağlıdır.

2.6.2. Dinamik Işıık Saçılım Spektrometresi (DLS)

Dinamik ışık saçılım spektrometrisi (DLS) ekzozom boyut analizi yapmak için kullanılabilecek alternatif bir yöntemdir. Bu yöntemde monokrom uyumlu lazer ışınların örnek içerisindeki partiküllere çarpması sonrası oluşan ışın dalgalanmasının işlenmesi ile boyut analizi yapılır [82]. NTA'ya benzer şekilde örnek hazırlama veya analiz aşamasında herhangi bir zorluk olmamasına rağmen DLS tek boyuttaki partiküllerin ölçülmesi için uygundur. Örnek içerisinde daha büyük partiküllerin olduğu durumlarda küçük partiküllerin tespit edilmesi zorlaşmaktadır ve analizden güvenilir sonuçlar elde edilememektedir [83].

2.6.3. Ayarlanabilir Dirençli Nabız Algılama (TRPS)

Ayarlanabilir dirençli nabız algılama (TRPS) son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemle 50 nm boyutlarındaki partiküllerden hücre boyutları aralığına kadar boyut dağılımı ve konsantrasyonu ölçülebilir [84]. Ekzozom karakterizasyonunda tek partikül analizi ve konsantrasyon ölçümü yapabilmesi sayesinde avantaj sağlamaktadır. Tekniğin dezavantajları ise gözeneklerin partiküllerle tıkanması veya partikül boyutlarının cihaz gürültüsünden ayırt edilemeyecek boyutta olması sebebiyle stabil sonuçlar elde edilmesinin zorlaşmasıdır [84]. Tekniği kullanan araştırmacılar gürültü, kesme limit hassasiyeti ve kesinlik gibi sistem parametrelerinin standardize edilmesi ile güvenilir sonuçlar elde edilebileceğini göstermişlerdir [85, 86].

2.6.4. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) optik ve elektron kırılma tekniklerinin kullanıldığı bir analiz yöntemidir. Cihaz bir prob yardımı ile örnek yüzeyi ile ilgili bilgi toplamaktadır. Bu yöntem ile ekzozom karakterizasyonunda çok az miktarlarda doğal örneklerle herhangi bir bozulma olmadan analiz yapılabilir. AFM ile birlikte ekzozomların morfolojileri, biyomekanik özellikleri, miktarları ve yüzeydeki biyomoleküler içerikleri analiz edilmektedir [87]. AFM günümüzde ekzozom ile ilgili bilinen bilgilerin elde edilmesinde oldukça faydalı olmuştur. AFM aynı zamanda tümör örnekleri gibi heterojen ortamlarda da analiz yapılmasını mümkün kılmaktadır [88]. Ancak elde edilen veriler analizin yapıldığı ortam sıcaklığı, prob ve örnek arasındaki kuvvet veya tarama hızına göre değişmektedir. Avantajları ve dezavantajları ile birlikte AFM birçok çalışmada ekzozom karakterizasyonu için etkili bir seçenek olarak sunulmuştur [89].

2.6.5. Elektron Mikroskobu (EM)

Elektron mikroskobu (EM) ekzozomların yapılarının, morfolojilerinin ve boyutlarının analiz edilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. EM örnek üzerinden bir elektron demeti geçirildikten sonra elde edilen ikinci elektron demetinin işlenmesi ile görüntü oluşturmaktadır. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve kriyojenik elektron mikroskobu (kriyo-EM) olmak üzere iki çeşit elektron mikroskobu yöntemi bulunmaktadır. TEM ile analiz yapılmadan önce örneklerin glutaraldehit ile sabitlenmesi ve kurutularak vakum altında analiz yapılmalıdır. Bu yöntemle ilgili dikkat edilmesi gereken nokta hazırlık aşamasında ekzozom morfolojisinde değişim meydana gelebilmesidir. Ayrıca kullanılan elektronlar ekzozomların biyolojik yapılarına da zarar verebilir [48]. Kriyo-EM farklı protokolü ile TEM yöntemine alternatiftir. Kriyo-EM analizi için örnekler sıvı nitrojen ile hazırlanmaktadır ve protokol gereği ekzozom morfolojilerinde herhangi bir değişik olmamaktadır [90]. Bu iki yöntemin bir arada kullanıldığı kriyo-TEM ise ekzozom zarı ve lümeni de dahil görüntüleme yapmak için en uygun yöntem olarak belirtilmektedir [91]. Ekzozom proteinlerinin floresan boyanması ile ayrıca biyolojik fonksiyon analizi de yapılabilir [92].

2.6.6. Akış Sitometrisi (FC)

Akış sitometrisi ekzozom yüzey proteinlerinin, boyutunun ve yapısının analiz edilebildiği yöntemdir. Akış sitometrisi ekzozom karakterizasyonunda standart hale gelmiş western blot, NTA ve EM gibi yöntemler arasında oldukça öne çıkmaktadır. Akış sitometrisi ile ekzozomların boyutu ve yapısı ile ilgili tekrarlanabilir analizler yapılabilir. Akış sitometrisi belli dalga boylarında gönderilen lazer demetlerinin örnek içerisindeki partiküllerden saçılan ışınlarının işlenmesi prensibine göre çalışmaktadır. Örneklerin analiz aşamasından önce ayrıca floresan boyalar ile boyanması gerekmektedir. Kullanılan standart akış sitometri cihazları ölçüm aralığından dolayı ekzozom analizi için uygun değildir ve ölçüm aralığına girebilmek için analizler mikro boncuklar ile ekzozomların kombinasyonu kullanılarak yapılmaktadır. Ancak son zamanlarda geliştirilen teknolojiler ile birlikte cihazların boyut hassasiyeti artırılmıştır böylelikle boyama işleminden sonra direkt olarak ekzozom örneğinden ölçüm yapılabilir [93].

2.6.7. Western Blot Analizi (WB)

Western blot analizi, proteinlerin tanımlanmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle protein karışımı elektroforez adı verilen bir işlemle ayrıştırılır. Ayrıştırılan proteinler daha sonra bir membran üzerine transfer edilir. Bu membran, daha sonra belirli bir proteinin varlığını tespit etmek için özel antikorlarla işlenir. Antikorlar, hedef proteinle özdeş olan ve epitop adı verilen belirli bir bölgeye bağlanarak membrana tutunur. Membran antikorların hedef proteinle bağlandığı bölgeden fazlasını engelleyecek şekilde bloke edilir. Daha sonra ikincil antikor adı verilen bir başka antikor membrana uygulanır. Bu ikincil antikor, bir önceki antikoru bağlandığı hedef proteine bağlanacak de tasarlanmıştır ve üzerinde sinyal üretici molekül taşır. Bu sinyal, hedef proteinin varlığını tespit etmek için görüntülenir ve çeşitli yöntemlerle ölçülür [94]. Western blot analizi, bir proteinin varlığını tespit etmek için kullanılabileceği gibi, aynı zamanda protein miktarını ölçmek için de kullanılabilir. Bu yöntem, özellikle biyolojik araştırmalarda, ilaç geliştirme çalışmalarında ve hastalıkların tanısında sıklıkla kullanılır.

2.7. Ekzozomların Biyolojik Fonksiyonları

Ekzozomlar ökaryot ve prokaryot birçok hücre çeşidinden ve vücut sıvısından salgılanmaktadır. Bu hücreler içerisinde fibroblastlar, nöronlar, adipoz hücreleri, tümör hücreleri, bağırsak epitel hücreleri ve kök hücreler bulunmaktadır. Ayrıca sinoviyal sıvı, anne sütü, idrar, tükürük, amniyotik sıvı, karın iltihabı gibi vücut sıvıları ekzozom içermektedir. Hücrelerden elde edilen ekzozomlardan biyolojik fonksiyonların anlaşılması ve terapötik uygulama amaçlı faydalanılırken; vücut sıvılarından elde edilen ekzozomlar daha çok erken ve kolay hastalık teşhisi için kullanılmaktadır. Araştırmacılar ekzozom kargosunda bulunan 9.679 protein, 2.838 miRNA, 3.408 mRNA ve 1.116 lipid tanımlamıştır. Salgılandıkları hücreler ve mikro çevre için birer “parmak izi” veya “imza” niteliğinde olan ekzozomlar taşıdıkları bu proteinler, RNA’lar, enzimler ve lipidler sayesinde biyolojik aktivite göstermektedir. Anjiyogenez, antijen taşıma, apoptoz, pıhtılaşma, hücrel hemostaz, inflamasyon ve hücreler arası sinyalleşme biyolojik süreçlerinde de rol oynamaktadır. Böylelikle ekzozomlar kanser de dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, yara ve kemik iyileşmelerinde etkili olmaktadır.

2.7.1. Kanser

Dünya genelinde yaşanan kanser sayısındaki artış ve yaygınlaşma sebebi ile ekzozomların kanser biyolojisindeki rolünün anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Araştırmacıların da bu alana yönelmesi ile diğer hastalıklara oranla ekzozomlar ve kanser doğasının ilişkisi hakkında birçok bilgi öğrenilmiştir. Ekzozomların tümör gelişiminde, anjiyogenezinde, metastazında, terapi direncinde ve paraneoplastik sendromunda etkili olduğu görülmüştür. Ekzozomların kanser sürecindeki etkileri kanser türüne, genetiğine ve evresine göre değişiklik göstermektedir.

Ekzozomlar direkt olarak tümör oluşumuna neden olabilir veya kanser oluşumunu destekleyebilir. Pankreas kanser hücrelerinden elde edilen ekzozomların NIH/3T3 hücrelerini mutasyona uğratarak hücre farklılaşması başlattığı görülmüştür [95]. Prostat ve meme kanseri hücrelerinden izole edilen ekzozomların taşıdıkları miRNA kargoları ile adipoz hücrelerinde tümör oluşumuna dahil oldukları görülmüştür [96]. Ayrıca miR-200 taşıyan ekzozomların meme kanserinde epitelden mezenkimale dönüşümü (EMT) artırdığını gösteren çalışma ekzozomların kanser hücrelerinin direncinin artırdığını göstermektedir [97]. RNA'lar dışında ekzozomların taşıdıkları proteinler, nükleik asitler, metabolitler de tümör oluşum sürecine dahil olmaktadır. Tümör mikro çevresinde kanser hücrelerinden salgılanan ekzozomlar en çok kanser ilişkili fibroblastlar (CAFs) ve bağışıklık hücreleri ile birlikte çalışmaktadır. Kanser hücrelerinin etkisi altında ekzozom üreten CAFlar bağışıklık hücrelerinin proinflamatuvar tepkisinin artması sağlamıştır ve böylelikle farede yapılan deneyde tümör büyümesinin de arttığı görülmüştür [98]. Ayrıca kanser hücrelerinin geniş bir alana yayılırken hücreler arası sinyalleşme aracı olarak ekzozomları kullandığı bilinmektedir. Kanser hücrelerinden elde edilen ekzozomların yüzeyinde bulunan TGF- β , PEDF (pigment epitel kaynaklı faktör) gibi proteinler hedef hücrelerde kanser oluşumunu tetiklemektedir [99].

Ekzozomların kanser oluşumunda iki türlü anjiyogenez etkisi bulunmaktadır. Meme kanseri hücrelerinden elde edilen ekzozomların içerdikleri miR-105 sayesinde kan damarlarının bütünlüğünü bozarak geçirgenliği artırdığı ve tümör gelişimi için alan sağladığı görülmüştür [100]. Bir diğer yandan hipoksik glioblastoma hücrelerinden elde edilen ekzozomların endotel hücrelerini proanjiyojenik programlayarak glioblastoma hücrelerinin çoğalmasını sağladığı görülmüştür [101].

Sonuç olarak ekzozomlar tümör gelişiminde hem sağlıklı anjiyogenezi bozarak hem de tümör için gerekli damarlanma yapısının oluşmasında rol alarak etki göstermektedir.

Kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlar ve antikorlara karşı direnç geliştirmesinde de ekzozomlar rol almaktadır. B hücreli lenfomadan salınan CD20⁺ ekzozomlar anti-CD20 için tuzak yemi gibi davranarak hücrelerin kaçmasını sağlamaktadır [102]. Böbrek hücreli kanserde bir kemoterapötik ajan olan sunitinib dirençli uzun kodlanmayan RNA taşıyan ekzozomların miR-34 ve miR-449'a bağlanarak AXL ve MET tirozin kinazlarının salgısını artırdığı ve sunitinib etkisini ortadan kaldırdığı görülmüştür [103]. Kemoterapi ile birlikte radyasyon tedavisinde de ekzozomların kanser direnci sağladığı bilinmektedir. Kanser hücrelerinden elde edilen ekzozomlar ile yapılan çalışmalar ekzozomların tümör oluşumun birçok aşamasında etkili olduğunu göstermektedir. Fonksiyonu bilinen durumlarda ekzozom üretiminin engellemesi ile tümör oluşumu ve gelişimi engellenebilir. Elde edilen bilgiler kanser tedavisinde ve tanısında ekzozomların büyük potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

2.7.2. Nörodejeneratif Hastalıklar

Ekzozomların nöral hücrelerinden de izole edilebildiği anlaşıldıktan sonra nörodejeneratif hastalıklardaki etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Ayrıca ekzozomların, beyine giden yolda ilaç veya toksinler için seçici bir bariyer oluşturan kan-beyin bariyerinden (KBB) geçebilme özelliğine sahip olması araştırmalar için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Ekzozomlar beyinde hatalı ve anormal proteinlerin kümelenmeleri artırma veya engellemede rol oynamaktadır. Bir nörodejeneratif hastalık olan Creutzfeldt-Jakob (Deli dana) hastalığının durumu ekzozomların GW4869 ile bloke edilerek ve monensin ile salgılanmasının artırılarak incelenmiştir. Sonuçlar ekzozom artış ve azalışıyla doğru orantılı olarak hastalığa sebep olan enfekte prion proteinlerinde (PrP^{Sc}) de aynı etkinin olduğunu göstermiştir [104]. En çok çalışılan nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Alzaymır hastalığında da ekzozomların etkileri araştırılmaktadır. Alzaymır hastalığında etkili olan proteinlerin ekzozomlarda da bulunduğu, ekzozomların bu proteinlerin beyinde kümelenmesini sağladığı ve ayrıca ekzozomların bu proteinleri nöronlar arasında taşıdığı görülmüştür [105]. Bir diğer açıdan ekzozom biyogenezi nöroprotektif etki gösterebilir. Ekzozomlar nörotoksik oligomer oluşumunu engelliyor veya oluşanları hücre dışına taşıyor olabilir.

Ekzozomların nörodejeneratif hastalıklardaki etkileri *in vitro*da tespit edilmektedir. Daha detaylı bilgi edinmek adına araştırmaların *in vivo* çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

2.7.3. Metabolik ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Ekzozomlar metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarda etkili rol oynamaktadır. Ekzozomların pankreatik β -hücreleri, adipoz dokusu, iskelet kası ve karaciğer üzerinde metabolit transferi sağladığı ve miRNA kargosu ile hücreler arası iletişim sağlayarak etki gösterdiği keşfedilmiştir. Obez fare modelinde yapılan bir çalışma ile görülen belirgin ekzozomal miRNA dolaşımı sayesinde ekzozomlar insülin direncinin artmasını sağlamaktadır ve yağ dokusunda da protein düzenleyici olarak görev almaktadır [106]. Kas ve yağ kaybının yaşandığı kanser gibi durumlarda da ekzozomların hastalıklarla ilgili proteinleri taşıdığı görülmüştür. Kanser hücreleri, sağlıklı hücreleri ekzozomlar aracılığıyla etkileyerek kas ve yağ kaybına sebep olacak durumları tetiklemektedir.

İnsan ve fare hücrelerinden elde edilen ekzozomlar ile yapılan çalışmalar ekzozomların kalp krizi, diyabete bağlı kalp hastalıkları, ateroskleroz gibi metabolik hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Plateletlerden izole edilen ekzozomların makrofaj tutucu CD36 reseptörünü azalttığı görülmüştür ve böylelikle ekzozomlar zararlı kolesterol alımını da azaltarak ateroskleroz engelleyici görev görmektedir [107]. Farklı birçok hücreden izole edilen ekzozomların *in vivo* çalışmaları ekzozomların miR-19, miR-21, miR-22, miR-21-5p gibi miRNA kargoları ile ayrıca kalp sağlığını koruduğunu göstermiştir [99]. Ancak her durumda olduğu gibi insan düz kas hücrelerinden izole edilen ekzozomların trombojenezi artırdığı karşıt bir etkisi de bulunmaktadır [108]. Dolayısıyla metabolik ve kardiyovasküler hastalıklarda da diğer hastalıklarda olduğu gibi ekzozomlar ve kargoları hem terapötik hem de tanı amaçlı kullanılabilir.

2.8. Ekzozomların Terapötik Etkileri

Ekzozomlar bilinen fizyolojik koşullar altında çok düşük immün yanıt ve KBB'yi geçme yeteneğine sahiptir. Ayrıca lipid tabakası sayesinde içerisindeki kargoyu doğal bağışıklık hücrelerinden ve sindirim enzimlerinden koruyabilmektedir. Bu yetenekleri araştırmacıları ekzozomları ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanmaya yönlendirmiştir [109]. Farmasötik ajanlar ekzozom içerisinde taşınırken korunmakta ve sistemde kalma süreleri uzamaktadır.

Böylelikle uygulama alanına uzak hedeflere ulaşma başarısı da artmaktadır. Günümüzde farmasötik ajan taşıyıcı olarak çok sık kullanılan lipozomlara göre ekzozomlar sahip oldukları bu özellikler sayesinde öne çıkmaktadır.

Tasarlanmış ekzozom üretimi terapötik çalışmalar yapan araştırmacıların yöneldiği bir başka çalışma alanını oluşturmaktadır. Tasarlanmış ekzozom çalışmalarında ekzozomlara farmasötik ajanlar, proteinler, nükleik asitler gibi istenen kargolar yüklenebilmektedir. Ekzozom tasarımları iki farklı yaklaşıma göre yapılmaktadır. İlk yaklaşımda ekzozomların kaynak hücrelerin özelliklerini taşıyacağı bilindiğinden hücrelerde modifikasyon yapılmasıdır. İkinci yaklaşım ise direkt olarak ekzozomlar üzerinde modifikasyonlar yapılmasıdır. Hücrelerin kültür koşulları değiştirilerek, hücrelere belirli kargolar yüklenerek veya daha komplike bir işlem olan genetik modifikasyonları ile hücrelerden ekzozoma belli özelliklerin geçmesi sağlanabilir. Ekzozomlara ise direkt olarak elektroporasyon, sonikasyon, ekstrüzyon gibi yöntemlerle kargo yüklenebilir veya zar modifikasyonları ile ekzozomlar hedefe spesifik hale getirilebilir. Ayrıca büyük biyolojik varlıkları küçük parçalara bölerek ya da lipit çalışmaları ile yapay ekzozomlar üretilmektedir [110]. Özellikle kanser çalışmalarında spesifik kargolar taşıyan ekzozomlar üzerinde çalışılmaktadır. Örneğin makrofaj hücrelerinden izole edilen ekzozomlar bir kemoterapi ilacı olan paklitaksel ile yüklendiğinde farede akciğer kanserine karşı yanıt oluşumunu artırmıştır [111]. Ekzozomlar ayrıca merkezi sinir sistemi hastalıkları ve kanser için spesifik miRNA ve siRNA taşıyıcısı olarak da tasarlanabilmektedir. Preklinik çalışmalar miRNA ve siRNA yüklenmiş ekzozomların memeli kanser modelleri oluşturulmuş sıçanlarda anti-kanser etkilerine yoğunlaşmıştır. MKH'lerden izole edilen ekzozomlara Kras^{G12D} siRNA'sının (iExosome) yüklenmesi ile yapılan bir çalışmada farelerin pankreas kanserinden kurtulma oranlarının arttığı görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada ekzozomların yüzeyindeki CD47 proteininin "beni yeme" sinyali göndererek ekzozomların fagositozdan kaçması ve sistemde kalma süresini uzattığı keşfedilmiştir [112]. Bu çalışma daha ileri taşınarak Kras^{G12D} mutasyonu kaynaklı pankreas kanseri hastaların iExosome ile tedavisi amaçlı faz I klinik aşamasına geçilmiştir (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03608631).

Herhangi bir müdahale yapılmadan kök hücreler, makrofaj, epitel hücreleri, mast hücreleri, plateletler, T hücreleri, B hücreleri, nöronlar, dentritik hücreleri gibi birçok memeli hücreleri, vücut sıvıları hatta çeşitli meyve ve sebzelerden izole edilen ekzozomlar da terapötik etkiye sahiptir. Bu alanda kök hücreler öne çıkmaktadır. Kök hücreler mezenkimal kök hücreler (MKH), embriyonik kök hücreler (EKH), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) olarak kendi içinde sınıflandırılmaktadır. Bu kök hücreler arasında EKH'ler etik açısından zorluk getirmektedir. iPKH'ler ise bir kaynaktan direkt olarak izole edilememektedir. Dolayısı ile kapsamlı çalışmalar için en uygun kök hücre kaynağı mezenkimal kök hücreleridir. MKH'ler, sağlık ve kozmetik alanında uzun yıllardır kliniğin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Çalışmalarda bu noktaya kök hücrelerin sahip olduğu kendini yenileyebilme, farklılaşma ve iyileştirme özellikleri sayesinde gelinmiştir. Dolayısı ile MKH'lerden elde edilen ekzozomlar hücre terapisine alternatif bir nanotıp yaklaşımı olarak kapsamlı şekilde araştırılmaktadır [113]. Ayrıca ekzozomlar çoğalma ve farklılaşmadan kaynaklı tümör oluşturma riski taşınamaları, immünojenik yanıt oluşturmamaları ve ilgili bölgeyi hedef alarak aktivite göstermeleri açılarından terapötik ve klinik açılarından MKH'lere göre avantaj da sağlamaktadır. Mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen ekzozomların doğal, programlanmış veya ilaç yüklenmiş halleri ile birçok terapötik çalışma yapılmaktadır. Ekzozomlar sistemik, lokal, nazal ve oral yollarla uygulanabilmektedir.

2.9. Ekzozomların Diagnostik Kullanımı

Ekzozomların terapötik etkilerinin yanında diagnostik kullanımı da önemli bir çalışma alanı oluşturmaktadır. Terapötik ürün olarak ekzozomların kliniğe sunulmasının önünde aşılması gereken zor aşamalar bulunmaktadır. Ancak ekzozomların diagnostik kullanımı minimal invazif müdahale ile sıvı biyopsisi yapmayı sağlamaktadır ve klinikte uygulanması da oldukça kolaydır. Ekzozom biyopsisi ile kardiyovasküler hastalıkların, merkezi sinir sistemi hastalıklarının ve kanser teşhisinin yapılması amaçlanmaktadır.

Bazı çalışmalar ekzozomların az miktarda DNA içerdiğini ve bu DNA'ların kanser sebebiyle gerçekleşen mutasyonların serumdan salgılanan ekzozomlarda tespit edilebileceğini söylemektedir. Ancak bazı çalışmalar ekzozomlarda DNA'ya rastlanmadığını belirtmektedir. Diagnostik açıdan DNA kullanımı için daha detaylı sonuçların elde edilmesi gerekmektedir [99].

Bununla beraber kanser hücrelerine spesifik miRNA veya miRNA grupları kanser teşhisinde diagnostik veya prognostik potansiyel taşımaktadır. Sağlıklı ve kanser hücrelerinin ürettiği ekzozomların kargolarındaki ortaya çıkacak farklılığın tespiti erken teşhis ihtimalini artırmaktadır [114]. Yapılan çalışmalar sayesinde kanser oluşumu destekleyen ve engelleyen miRNA'ların tanımlanması ile birlikte ekzozomların diagnostik kullanım alanı genişlemektedir. Ayrıca kanser hücrelerinden elde edilen ekzozomların taşıdıkları fosfoproteinler ve yüzey proteinleri de kanser teşhisinde kullanılabilir.

2.10. Ekzozomların Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

Yara, fiziksel (yanma, donma) ve mekanik travmalar, cerrahi girişimler, genetik bozukluklar veya fizyolojik rahatsızlar sonucu deri bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanır. Deri bütünlüğünün bozulması ile doku çevresel etkilere açık hale gelir ve var olan fonksiyonlarını geçici veya kalıcı olarak kaybedebilir.

Yara iyileşmesi doku hasarına karşı vücudun verdiği doğal bir tepkidir. Yara iyileşme süreci birçok farklı hücre tipinin, sitokinlerin, mediyatörlerin ve damar sisteminin dahil olduğu karmaşık bir süreçtir. Doku hasarı oluştuğunda ilk olarak hemostazın sağlanması için damar büzülmesi ve trombosit kümelenmesi ile kan ve vücut sıvısının dışarı akışı engellenir. Daha sonra nötrofiller ile başlayarak inflamatuvar hücreleri yara bölgesinin yabancı cisimlerden ve bakterilerden temizler. İnflamatuvar hücreleri anjiyogenez, trombosit ve epitelizasyonu başlatacak mediyatör ve sitokinleri salgılar. Fibroblast hücreleri ise doku iskelesi görevi görecektir ekstraselüler matriks bileşenlerini yerine koyar. Böylece yara iyileşmesi ve yeni doku oluşumu gerçekleşir. Bu aşamalar hemostaz, inflamatuvar, çoğalma, olgunlaşma ve yenilenme fazları olarak birbirlerinden ayrılmaktadır.

Bir yaralanma meydana geldiğinde ilk olarak dokuda lenfatik sıvı ve kan kaybı meydana gelmektedir. Bu durumda uygun hemostazın gerçekleşmesi gerekmektedir. Kan kaybını durdurmak için hem intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma yolları aktive olmaktadır. Öncelikle endotel duvarında meydana gelen açıklığı kapatmak için damarlar büzülür.

Adenozin 5'difosfat (ADP) salgılanması ile birlikte de trombosit kümelenmesi ve tromboz başlar. Kısa süreli damar büzülmesinden sonra damar tekrar genişler ve lökositler ile trombositlerin yara bölgesine akışı sağlanır.

İnflamatuvar aşaması hemostaz ve kemotaksi ile başlar. Lökositler ve trombositler mediyatör ve sitokinler salgılayarak inflamatuvar aşamasını hızlandırır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin yanında diğer büyüme faktörleri kollajen degradasyonunda, fibroblast dönüşümünde, yeni damar oluşumunda ve re-epitelizasyonda görev almaktadır. Bu aşamalar aynı zaman diliminde senkronize şekilde gerçekleşir. Trombositlerden salgılanan serotonin ve histamin gibi mediyatörler hücre geçirgenliğini artırır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri ayrıca fibroblast bölünmesini ve çoğalmasını sağlamaktadır. Fibroblastlar ise kollajen sentezlemektedir. Nötrofil, monosit, endotel hücreleri gibi inflamatuvar hücreleri ise trombosit aktivasyonu ile oluşan fibrin iskelesine tutunmaktadır. Nötrofiller fagositozla hücre atıkların ve bakterilerin yara bölgesinden uzaklaştırır. Monositler yara bölgesinde makrofaja dönüşerek sitokinler ile epitel, fibroblast ve endotel hücrelerinin yara bölgesine migrasyonunu sağlar. Böylece yara iyileşmesinde proliferasyon fazına geçirilir.

Çoğalma ve granülasyon fazları arka planda süreç boyunca senkronize şekilde devam etmektedir. Doku hasarından sonraki 5 ile 7. günler arasında fibroblastlar kollajen ve glikoz amino glikan sentezlemeye başlar. Bu proteoglikanlar yarayı stabilize etmektedir. Sonraki aşamada yara çevresinden hücre göçü ile birlikte re-epitelizasyon başlar. Öncelikle ince yüzeysel bir epitel tabakası oluşur. Zamanla bu tabaka giderek kalınlaşır ve daha dayanıklı bir yara tabakası oluşur. Daha sonra mevcut damarlardan yeni damarların oluşması ile anjiyogenez, endotel progenitör hücrelerinden (EPH) yeni damar oluşması ile vaskülojenez gerçekleşir. Böylelikle yara bölgesine besin ve oksijen taşınır. Sentezlenen kollajen fiberleri fibrin yapı iskelesi üzerine tutunduktan sonra yara dokusu olgunlaşmaya başlar. Yara bölgesinde meydana gelen kasılmalar ile birlikte de fibroblast ve miyofibroblast birikimi devam etmektedir.

Olgunlaşma ve yeniden şekillenme fazları 3. hafta itibarıyla başlayıp 12 aya kadar devam etmektedir. Fazla kollajenin degradasyonu ile birlikte 3. hafta civarında yara bölgesinde kasılmalar artar. 11. ve 14. haftalar arasında yara dokusunda maksimum gerilme kuvveti geri kazanılır ancak bu kazanç orijinal dokudaki kuvvetin ancak %80'ine ulaşabilir.

Doğal koşullarda yaralar 4-6 hafta arasında iyileşmektedir. Akut yaralar zaman içerisinde kendi kendine iyileşerek deri bütünlüğü sağlanırken kronik yaralar 6-8 hafta içerisinde tedaviye yanıt vermayarak iyileşmez.

Kronik yaralar genel olarak diyabet, hipertansiyon, vasküler hastalıklar gibi patolojik bir durum sonucunda oluşur. Hipoksi, bakteriyel kolonizasyon, iskemi, reperfüzyon hasarı, kollajen sentezinde bozukluk, enfeksiyon yara iyileşmesini geciktiren veya önleyen primer faktörler. Ayrıca diyabet, beslenme bozukluğu, sigara gibi kronik koşullar ve hastalıklar da bu faktörler arasındadır.

Kronik yaralar sağlık sistemi için ağır yük teşkil etmektedir. Amerika nüfusunun yaklaşık %2,5'inin kronik yara tedavisine ihtiyaç duyduğu ve bu oranın 65 yaş ve üzeri için daha da çok olduğu bilinmektedir. 2020-2027 yılları için yapılan bir analiz sonucunda 2027 yılı itibari ile yara tedavisinin dünya marketindeki değerinin 18.7 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir [10]. Bu durum araştırmacıları yara tedavisi için etkili ve uygun maliyetli tedavi yöntemlerine yönlendirmektedir. Kök hücre tedavisi yara iyileşmesinde sağladığı avantajlara rağmen bağışıklık sistemi yanıtı ve genetik faktörler sebebiyle ile hala kısıtlamaları bulunmaktadır. Yapılan son çalışmalar rt-MKH'lerin salgıladıkları biyolojik moleküller sayesinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu biyolojik moleküller arasında ekzozomlar yara iyileşmesinde etkili rol oynamaktadır.

Ekzozomların yara iyileşmesi üzerine etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. He ve ark. insan kemik iliği MKH'lerinden elde ettikleri ekzozomların enjekte yara bölgesindeki etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar ekzozomların anjiyogenez belirteci olan CD31 ifadesini MKH'lere göre daha çok artırdığını ve aynı zamanda makrofaj hücrelerinin M2 polarizasyonunu da destekleyerek yara iyileşmesini hızlandığını göstermişlerdir [115]. Jiang ve ark. ise ekzozomların etki mekanizmasını araştırdıkları bir çalışmada yara iyileşmesinde aktif rol oynayan TGF- β /Smad sinyal yolunun ekzozomlar tarafından tetiklendiğini ve ekzozomların bu yolla yara iyileşmesinde etkili olduklarını göstermişlerdir [116]. Ancak ekzozomların enjeksiyon yöntemi ile yara bölgesine uygulanması yara bölgesinden hızlı temizlenme (clearance)) sebebi ile terapötik etkilerini kısıtlamaktadır.

Ekzozomların stabilitelerinin artırılması, agregasyonlarının önlenmesi, uzun süreli salımının sağlanması ve yara bölgesini kapatılabileceği şekilde bir taşıyıcıya yüklenerek uygulanması daha iyi bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Ekzozomların doğal ve sentetik polimere yüklenerek yara iyileşmesinin araştırıldığı çok fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. MKH kaynaklı ekzozomların, yara iyileşmesi etkisinin incelendiği bir çalışmada yara bölgesindeki etkinliklerini artırmak için ekzozomları 1:1 oranında “HyroMatrix” hidrojeline yükleyerek parakrin yeteneklerini araştırmıştır. Ekzozom/hidrojel kompleksinin *in vivo*'da yapılan test sonuçları, ekzozomların fibroblast/miyoblast farklılaşmasını α -SMA üzerinden baskıladığını ve TGF- β /SMAD2 sinyal yolağının aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Böylece yara bölgesinde kabuk ve fibrozis oluşmasını önleyerek yara iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır [117]. Li ve ark. yaptıkları çalışmada insan göbek kordonu MKH'lerinden izole ettikleri ekzozomları kitosan temelli ısı ve pH duyarlı hidrojellere yüklemişlerdir. Ekzozom katkılı kitosan hidrojeli *in vivo* yara modelinde test edilmiş ve yapılan analizler ekzozom yüklü hidrojelin yara kapanmasında, epitelizasyonda ve yara bölgesinde kollojen birikiminde anlamlı düzeyde etki ederek yara iyileşmesini sağladığını göstermiştir [118]. Diyabetik yara iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirildiği başka çalışmada ise ekzozomların bölgesel aktivitesini artırmak için ısıya duyarlı, biyoadesiv, enjekte edilebilir, antibakteriyel ve UV'ye karşı tam koruma sağlayan çok fonksiyonlu bir polisakkarit yara örtüsüne (FEP) yüklenmiştir. Yağ doku kaynaklı MKH'lerden izole edilmiş ekzozomlar ile yüklenen FEP kompleksiyle yapılan çalışmalar, ekzozomların pH'a duyarlı davranış sergilediğini ve 21 gün boyunca yara örtüsünden ekzozom salımının devam ettiğini göstermiştir. Ayrıca yapılan analizler, ekzozom yüklü FEP grubunda enfeksiyona rastlanılmadığını ve kontrol grubuna göre yara bölgesinde daha etkili rejeneratif etki oluştuğunu göstermiştir [119]. Diyabetik yara iyileşmesi üzerine ekzozomların etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise ekzozom kaynağı olarak diyabetik yara iyileşmesinde etkili olduğu bilinen platelet zengini plazma (PRP) tercih edilmiştir. Doku iskelesi olarak ise yine yara iyileşmesindeki etkisi bilinen bir polisakkarit türü ZWP ile kitosan/ipek hidrojelinin bir arada kullanıldığı bir yara örtüsü kullanılmıştır. *In vivo* deneylerin sonuçları PRP-exos/ZWP kompleksinin yara iyileşmesinde kontrol grubuna göre daha etkili olduğunu, kollajen sentezinin ve damar oluşumunu artırdığını göstermiştir [120]. Başka bir çalışmada yağ doku kaynaklı MKH'lerden izole edilen ekzozomlar poliüretan (PU) içeren yüksek gözenekli kriyojele yüklenerek yara iyileşmesinde etkisi araştırılmıştır.

Ekzozom yüklü kriyojelin yara iyileşmesini artırdığı ve buna ek olarak kıl kökü ve yağ bezlerini oluşmasını da sağladığı gösterilmiştir [121].

Diğer bir çalışmada ise poliüretan (PUAO) temelli hidrojele AMKH'lerden izole edilen ekzozomlar yüklenerek diyabetik yara iyileşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir [122]. Trombosit zengini plazmadan izole edilen ekzozomlar kitosan- ipek kompozit hidrojeline yüklenerek diyabetik sıçan yara bölgesine uygulandığında kollajen sentezinin ve depolanmasının, anjiyogenezin arttığı bildirilmiştir [123].

Tüm bu çalışmalar ekzozomların stabiliteelerini ve yara iyileşmelerindeki terapötik etkilerini artırmak için taşıyıcı sistemler ile birlikte kullanımının önemini vurgulamaktadır.

2.11. Ekzozomların Klinik Çalışmaları

Ekzozomların klinik uygulamaları ile ilgili “clinicaltrials.com” sitesinde yayınlanan 2023 itibari ile 155 kayıt bulunmaktadır. Bu çalışmaların 30 tanesi tamamlanmıştır. Araştırma grupları arasında Covid-19, kanser, yara, kemik, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar taşıyan hastalar bulunmaktadır. Özellikle kanser çalışmalarında ekzozomlar biyobelirteç olarak kullanılmıştır. Ayrıca sağlıklı gruplarla yapılan çalışmalarda ekzozomların solunum yoluyla alınmasının ve ekzozomlarda taşınan tuzun idrarda meydana getirdiği değişiklikler araştırılmıştır.

Ekzozomların klinik çalışmaları ile ilgili en büyük engel, etkili ve yüksek verimde ekzozom izolasyonunun zor olmasıdır. Bu zorluğun üstesinden gelebilmek için bazı stratejiler geliştirilmiştir. Ekzozom biyogenezinin ve salımının arkasındaki biyolojinin CD9, sindekan-4 gibi bilenen bileşenlerinin ekstra kullanımı ile ekzozom üretiminin de artırılabilceği görülmüştür. Bileşenlerin etkileri hücre tipine göre farklılık göstermektedir ve ayrıca yapılan modifikasyonun ekzozom fonksiyonunda meydana getirebileceği değişikliklerin de test edilmesi gerekmektedir.

Hücre kültürü koşullarının manipüle edilmesi ile birlikte de ekzozom üretimi artırılabilir. Forskolin (6 kat artış), norepinefrin bitartrat (4,6 kat artış), N-metildopamin (4,4. kat artış), fenoterol hidrobromür (3,5 kat artış), mefenezin (3,4 kat artış) prostat kanser hücrelerinde denenen 4500'den fazla ilaç ve bileşen arasında ekzozom üretimini en çok artıran 5 aktivatör olarak belirtilmiştir. Bu aktivatörlerin MKH'leri üzerindeki etkileri araştırıldığında ise N-metildopamin ve norepinefrin kombinasyonunun ise ekzozom üretimini 3 katına çıkarabildiği görülmüştür [124]. Bununla beraber ekzozomların biyolojik fonksiyonlarında veya protein içeriklerinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Ayrıca hücrelerin açlık, hipoksi koşulları ve ısı gibi fiziksel strese maruz kalmalarının da ekzozom üretiminde pozitif bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda hücresel nanoporasyon (CNP) biyoçipi ile hücrelere fokal ve kısa süreli elektrik uyarıları verildiğinde fare embriyonik fibroblast hücrelerinden izole edilen ekzozom veriminin 50 kat arttığı görülmüştür [125].

Ekzozom verimini artırmak amaçlı kullanılan bir diğer strateji ise büyük ölçekli hücre kültürü koşullarını kullanmaktır. 2 boyutlu hücre kültürü koşullarında hücrelerin birbirleri ile iletişimi tam olarak doğal koşullardaki gibi olmamaktadır. Ayrıca flasklarda ulaşılabilecek hücre sayısı kısıtlıdır. 3B biyoreaktörlerde kültüre edilen hücrelerin sayıları kısa sürede yüksek rakamlara ulaşabilmektedir. Birçok farklı biyoreaktör çeşidi bulunmaktadır. Tübüler perfüzyon biyoreaktörü kültür ortamından izole edilen ekzozom veriminin 2 boyutlu ortama göre 100 kata kadar artırılabilceği görülmüştür [126]. Sonuç olarak klinik ve preklinik çalışmalar için ekzozom veriminin artırılmasını sağlayacak stratejiler önem taşımaktadır. Çalışmaların devamlılığı açısından uygun stratejilerin kullanılması mantıklı bir karar olacaktır.

Klinik çalışmaların önündeki aşılması gereken bir diğer engel ekzozomların üretimi, karakterizasyonu, saklama ve taşıma koşulları konularında standardizasyonun bulunmamasıdır. Çünkü uygun koşullarda korunmayan ekzozomlar hızlıca stabilitelerini ve biyolojik fonksiyonlarını kaybettiği bilinmektedir [127]. Ekzozomların stabilitelerinin korunması bu konular arasında dikkat çekilmesi gereken bir noktadır.

2.12. Ekzozom Stabiliteleri ve Korunma Koşulları

Ekzozomların gelişmiş terapötik etkilerinin yanında ekzozom uygulamasının en önemli adımlarından biri ekzozomların biyolojik fonksiyonlarını kaybetmeden stabilitesinin sağlanmasıdır. Diğer bir deyişle ekzozomların lipid membranları içerisindeki nükleik asit ve protein kargosunun korunmasının sağlamaktadır. Dolayısı ile ekzozom uygulamalarında ekzozomun lipid membran yapısının bütünlüğünün korunması gerekmektedir. Öncelikle saklama koşulları ekzozom stabiliteleri üzerinde büyük etkiye sahiptir. Ekzozomların izolasyon sonrasında PBS içerisinde saklanması sıklıkla başvurulan bir stratejidir. Ekzozomların PBS içerisinde 4 °C, -20 °C ve -80 °C'deki davranışları incelendiğinde bir hafta içerisinde ekzozom boyutunda bir değişiklik olmadığı ancak 4 °C ve -20 °C saklanan ekzozomların miRNA seviyelerinde belirgin bir azalma yaşandığı görülmüştür. Bu azalma 90 gün boyunca devam ederek miRNA miktarının başlangıca göre %50 seviyelerine düştüğü görülmüştür. Ekzozomlar -80 °C saklandığında ise miRNA seviyesinde 90 gün boyunca az miktarda bir düşüş yaşanmıştır. Buna ek olarak farklı kaynaklardan izole edilen ekzozomların bu koşullar altında farklı davranış profilleri gösterdiği de belirtilmiştir [127]. Bunlara ek olarak kullanım sırasındaki dondur-çözdür sayısı arttıkça ekzozom yapısındaki bozulma artmaktadır. Trehaloz, dmsö gibi kriyoprotektanlar saklama tamponuna eklendiğinde ekzozomların saklama koşulları altındaki stabiliteleri iyileştirilebilmektedir.

Düşük sıcaklıklarda protein stabilitesinin ve osmotik hasarın engellenmesi amacı ile kriyoprotektanların kullanımı geleneksel bir yöntemdir. Bu yöntem ekzozom yapısının korunması içinde kullanılabilir. Şekerler, dioller, amino asitlerden oluşan geniş bir yelpaze bulunmaktadır. Ancak yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan kullanılması toksik etkiye sebep olabilir. Doğal bir şeker olan trehaloz FDA onaylı bir kriyoprotektandır [128].

Bir başka saklama koşulu olan liyofilizasyon, ısı karşısında kararlılığını kaybeden protein, aşı, virüs, ekzozom gibi materyallerin korunmasında en güvenilir yol olarak kullanılmaktadır. Liyofilizasyonun dondurma ve dehidrasyon aşamalarında oluşabilecek stresin engellenmesi için yine kriyoprotektanlardan faydalanılabilir. Liyofilizasyon yöntemi ile ekzozomların 4°C'de saklanabileceği belirtilmiştir. Böylece soğuk zincir ve depolama ihtiyacı kalmadan raf ömrü uzatılabilir. Aynı zamanda liyofilizasyon yöntemi ile soğuk saklamada yaşanan dondur-çözdür etkisi de ortadan kaldırılmaktadır [129].

Saklama koşullarının iyileştirilmesi amacı ile uygulanan stratejiler ile uygulama aşamasına kadar ekzozomların aktivitelerinin korunmaları sağlanabilir. Uygulama aşamasına geçildiğinde ise ekzozomların uygulama yapılan bölgede de stabilitelerinin korunması gerekmektedir. Bu amaçla ekzozomların biyomalzemeler içinde hapsedilerek uygulanması ön planı çıkan biyomühendislik stratejileri içinde yer almaktadır.

Bu yöntemle ekzozomlar biyomalzemelere tutunarak lipit membran yapısının bütünlüğü korunurken uygulama bölgesinde ise ekzozomların kontrollü salımı sağlanmaktadır. Örneğin; Shi ve ark. mezenkim kök hücrelerden izole ettikleri ekzozomları hazırladıkları kitosan/ipek hidrojele yüklediklerinde *in vivo*'da ekzozomların hidrojelden kontrollü salım sağladığı ve biyolojik aktivitesini koruduğunu göstermişlerdir [130]. Liu ve ark. ise kemik iliği kök hücrelerinden izole ettikleri ekzozomları süngerlere yükleyerek liyofilize etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre ekzozom salımı 28 boyunca devam etmiş ve ekzozomların biyolojik fonksiyonları açısından herhangi bir kayıp yaşanmamıştır [130]. Diğer bir çalışmada ise Wu ve ark. tek partikül analizi yaparak serbest ekzozomların ve jelatin metakrilat (GelMA) hidrojeline yükledikleri ekzozomların hareketlerini takip etmişlerdir. Serbest ekzozomların hareket hızları ve yer değiştirmelerinin hidrojel içerisindeki ekzozomlara göre daha fazla olduğunu göstermişler ve bu durumun lipit membranının bozulmasına ve agregasyona neden olduğunu bildirmişlerdir [131]. Bu çalışmalar ekzozomların stabilitelerinin korunması ve uygulama bölgesinde uzatılmış/kontrollü salım sağlanması açısından ekzozomların taşıyıcı iskele yapılara yüklenmesinin avantajlı bir yöntem olduğunu göstermektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

Jelatin süngerlerin hazırlanması için tip A jelatin Sigma Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Yine jelatin süngerlerin hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehit (%25 v/v Sulu Çözelti) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan insan kaynaklı deri fibroblast ve keratinosit hücreleri laboratuvar stoklarımızda mevcut olup daha önce yürütülen çalışmalarda kullanılmıştır. Kemik iliği kaynaklı kök hücreler ise sıçanlardan izole edilerek kullanılmıştır. Bu hücrelerin kültüründe kullanılmak üzere *alpha-Minimum Essential Medium* (α -MEM) ve *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM (YG ve DG)), l-glutamin, penisilin-streptomisin, Ca, Mg içermeyen fosfat tamponu (PBS) ve tripsin-EDTA (%0,05 ve %0,25) Cegrogen firmasından, fetal sıgır serumu (FBS) Sigma-Aldrich firmasından, ekzozomlarından arındırılmış FBS (Exo-Dep FBS) ise ThermoFisher Scientific firmasından temin edilerek kullanılmıştır. Hücrelerin kültüre edilmesinde kullanılan sarf malzemeler Jet Biofil firmasından temin edilmiştir. Kök hücrelerin farklılaşma yetilerinin tespit edilmesi amacıyla kullanılan *Stempro Osteogenesis Differentiation Kit* ve *Stempro Adipogenesis Differentiation Kiti* ThermoFisher Scientific firmasından, osteojenik farklılaşmayı göstermek için kullanılan Alizarin Kırmızısı S ve Oil Kırmızısı O Sigma-Aldrich firmasından temin edilerek kullanılmıştır.

Kök hücrelerden ekzozomların izole edilmesi için kullanılan polipropilen tüpler Beckman Coulter (ABD) firmasından temin edilmiş ve üreticinin önerdiği şekilde temizlenerek kullanılmıştır. İzole edilen ekzozomların miktar tayininde kullanılan Micro BCATM Protein Assay Kit ThermoFisher Scientific, akış sitometrisi ve *western blot* analizinde kullanılan CD63 (Novus, NB100-77913), CD9 (Novus, NBP2-67310), GM130 (NBP2-53420) ve Alix, (Novus, NB100-65678) antikoları Novus Biologicals firmasından temin edilmiştir.

Ekzozomların anjiyojenik özelliklerinin tayin edilebilmesi amacı ile yapılan CAM ve aortik halka analizlerinde kullanılan malzemeler aşağıda verilmiştir.

CAM deneyinde kullanılan döllenen yumurtalar T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Yumurtaların içerisinde inkübe edildiği 100 mL kare form tartım kabı Isolab (Almanya) ve 100/20 mm petri kapları Greiner Bio-One (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Yumurtaların kırılmadan önce üç gün boyunca inkübe edildiği kulukça makineleri Cimuka (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Yumurta inkübasyonu sırasında kullanılan antibiyotik-antibiyotik (100x) Cegrogen (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Aortik halkaların gömüldüğü Matrigel® Matriks Corning (ABD) firmasından temin edilmiştir. Aortik halka deneyinin standardizasyon çalışmalarında kullanılan VEGF (V7259-10 UG) ve sunitinib (PZ0012-5 MG) Sigma Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.2.1. Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Sıçan kaynaklı kemik iliği kök hücreleri daha önce laboratuvarımızda kullanılan yöntem kullanılarak izole edilmiş ve karakterize edilmiştir [132]. Özetle, sıçan kemik iliği Mezenkimal Kök Hücreleri (rt-MKH) 3-8 haftalık erkek Wistar Albino sıçanlarından 520 no'lu Etik Kurul kapsamında izole edilmiştir (Kobay A.Ş.). Sıçanlara anestezi altında servikal dislokasyon yapıldıktan sonra her iki alt bacağın femur ve tibia kemikleri çıkartılmıştır. Kemiklerin uç kısımlarında bulunan ve kemik iliği koruyan epifizlerin hasar almamasına dikkat edilerek kemiklerin etrafındaki dokular temizlenmiştir. Kemikler fosfatlı tuz solüsyonu (PBS, Cegrogen, Almanya) ile yıkandıktan sonra antibiyotik içeren besi ortamında laboratuvara taşınmış, laminar akım altında kemiklerin epifiz kısımları kesilmiş ve enjektör yardımıyla kemikler içerisinde besi ortamı geçirilerek kemik ilikleri toplanmıştır. Toplanan kemik iliği ile besi ortamı büyük parçalardan arındırmak için hücre süzgecinden geçirilmiştir. Çöktürme işlemi için 300 g'de 7 dk. (4°C) boyunca santrifüj yapılmış, yıkama için ise aynı koşullarda antibiyotik içeren PBS ile santrifüj yapıldıktan sonra son kez besi ortamı ile hücreler homojenize edildikten sonra santrifüjlenmiştir. Hücreler %10 FBS (Cegrogen, Almanya), %1 L-glutamin, %0,1 penisilin-streptomisin içeren α -MEM (Cegrogen, Almanya) içerisinde homojenize edilerek hücre kültürü koşullarında (37 °C'de, %5 CO₂ ve %90 nemli ortam) kültür başlatılmıştır.

3.2.2. rt-MKH'lerin Karakterizasyonu

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en belirgin özelliklerden biri kök hücrelerin uygun ortam koşullarında farklılaşabilmeleridir. İzole edilen hücrelerin kök hücre özellikleri osteojenik ve adipojenik farklılaşma ortamlarında izole edilen hücrelerin davranışları incelenerek karakterizasyonları yapılmıştır [133]. Yapılan analizlerin detayları aşağıda verilmiştir.

3.2.2.1. Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaşma kök hücrelerin adipoz hücrelerine farklılaşma yeteneğini ifade etmektedir. Adipojenik farklılaşma için öncelikle 24 gözlü kültür kabının her bir gözüne 5×10^4 hücre ekilerek tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Adipojenik farklılaşma kiti (StemPro™, Gibco, ABD) kullanılarak %1 adipojenik suplemanı içeren adipojenik besi ortamı hazırlanmış ve 24 saat sonunda adipojenik farklılaşma ortamı ile birlikte inkübasyon başlatılmıştır (n=3). Kontrol olarak %10 FBS içeren α -MEM besi ortamı kullanılmış (n=3) ve 21 gün boyunca her 3 günde bir besi ortamları değiştirilmiştir. 21.günün sonunda hücreler ilk olarak boyama için %4 formaldehit ile fikse edilerek Oil Red ile boyama yapılmış ve ışık mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır.

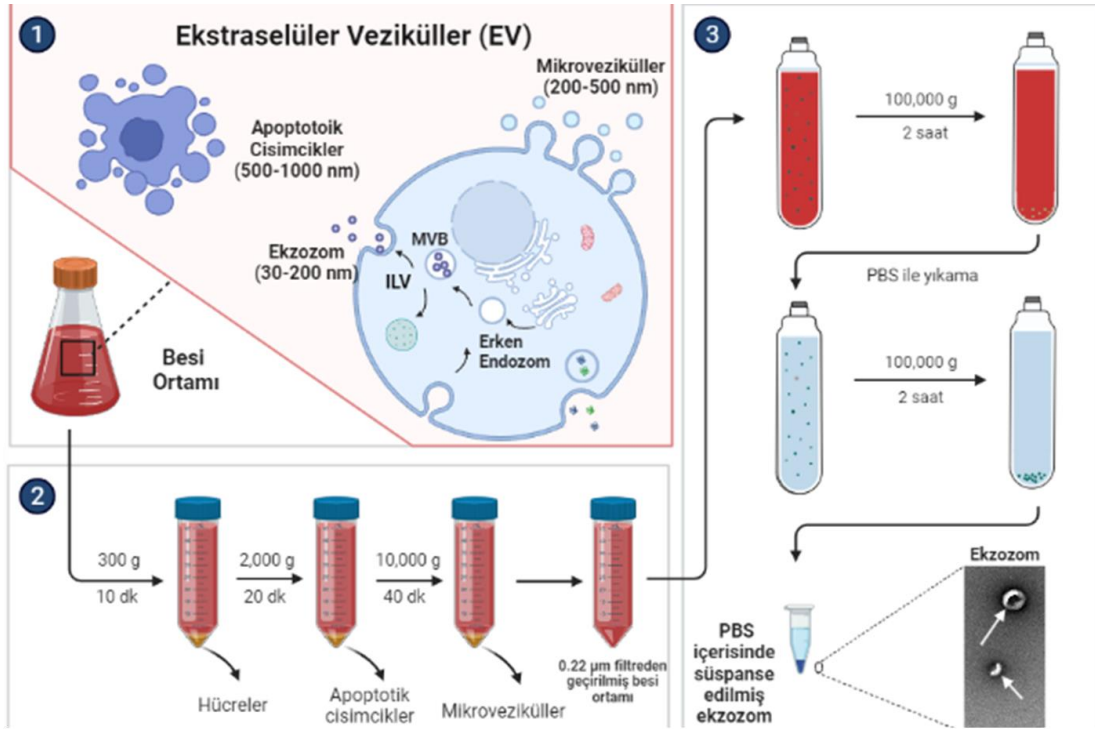
3.2.2.2. Osteojenik Farklılaşma

MKH'lerin Osteojenik farklılaşma yetilerini tespit etmek için *Stempro Osteogenesis Differentiation Kit* kullanılmıştır. Kemik iliği rt-MKH'ler (P/3) uygun oranda çoğaltıldıktan sonra tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılarak sayılmış ve 24 gözlü kültür kabına 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmişlerdir. 24 saat sonra hücrelerin ortamı osteojenik farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Kontrol grubu olarak normal büyüme ortamında (%10 FBS, 2 mM l-glutamin, 100 U/mL penisilin-streptomisin içeren α -MEM) kültüre edilen MKH'ler kullanılmıştır. 2-3 günde bir hücrelerin ortamı taze besi ortamı ile değiştirilmiştir. 21 gün süren çalışmanın sonunda osteojenik farklılaşmanın tespit edilmesi amacıyla Alizarin Red S boyaması yapılmıştır. Bu amaçla PBS ile yıkanan hücreler %4 paraformaldehit solüsyonunda 30 dk. inkübe edilerek fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler tekrar PBS ile yıkanarak %2'lik (w/v) Alizarin kırmızısı ile 10 dk. karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Distile su ile 5 kez daha yıkama yapıldıktan sonra ters faz ışık mikroskobu (Leica, Almanya) altında, mineralize kalsiyum nodül oluşumu gözlemlenerek osteojenik farklılaşma değerlendirilmiştir.

3.3. rt-MKH Kaynaklı Ekzozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.3.1. rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların İzolasyonu

rt-MKH kaynaklı ekzozomların izolasyonu amacıyla sıkça tercih edilen izolasyon metotlarından biri olan ultrasantrifüj metodu kullanılmıştır [62]. Ekzozomların izole edilmesi ve kullanılan rotor tipi, hücre kaynağı ve FBS varlığının elde edilen ekzozomların verimini etkileyip etkilemediklerinin tespit edilmesi amacıyla bir dizi çalışma planlanıp yürütülmüştür. Bu amaçla farklı zamanlarda ve farklı donörlerden izole edilen (seri-1, seri-2 ve seri-3 olarak isimlendirilmiştir.) rt-MKH'ler bileşiminde %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin bulunan α -MEM (Cegrogen, Almanya) kullanılarak kültüre edilmişlerdir. Ekzozom izolasyonu için 4. pasajdaki rt-MKH'ler kullanılmıştır. Literatürde yapılan çalışmalar pasaj numarasının izole edilecek olan ekzozomların biyoaktivitelerine etki eden önemli bir parametre olduğunu göstermiş olup, özellikle 4. pasajdan sonra MKH'lerden izole edilen ekzozomların vasküler biyoaktivitelerinin anlamlı düzeyde düştüğü gösterilmiştir [134]. Bu nedenle bu çalışmada pasaj numarası 4 olan hücrelerden ekzozom izolasyonu yapılmıştır. rt-MKH'ler uygun yoğunluğa (%60-70) geldikten sonra standart kültür koşullarında 15 dk. PBS ile yıkanmış ve 48 sa. boyunca serumsuz ve %10 Exo-dep FBS içeren kültür ortamında kültüre edilmiştir. 48 saat sonunda hücreler üzerindeki hasat ortamları toplanarak 4°C'de sırasıyla 300 g'de 10 dk. 2000 g'de 20 dk. ve 10.000 g'de 40 dk. santrifüjlenmiştir. Hücre kalıntılarından, apoptotik cisimciklerden ve mikroveziküllerden temizlenen hasat ortamı 100,000 g'de 120 dk. (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, Beckman Coulter, ABD) santrifüjlenerek ekzozomların çökmesi sağlanmıştır [135] (Şekil 3.1). Bu aşamada rotor tipinin ekzozom izolasyon verimine etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla sabit açılı 45 Ti (cat no: 339160, *fixed-angle rotor*) ve açılan SW32 Ti (kat no: 369694, *swinging-bucket rotor*) rotorları (Beckman Coulter, ABD) test edilmiştir. Çöktürülen ekzozomlar PBS ile toplanarak açılan SW41 Ti rotoru (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak tekrar 100.000 g'de 120 dk. santrifüj edilerek yıkanmıştır. Yıkanan ekzozomlar 330 μ L PBS ile toplanarak kullanılabilecek kadar -80°C'de saklanmıştır.

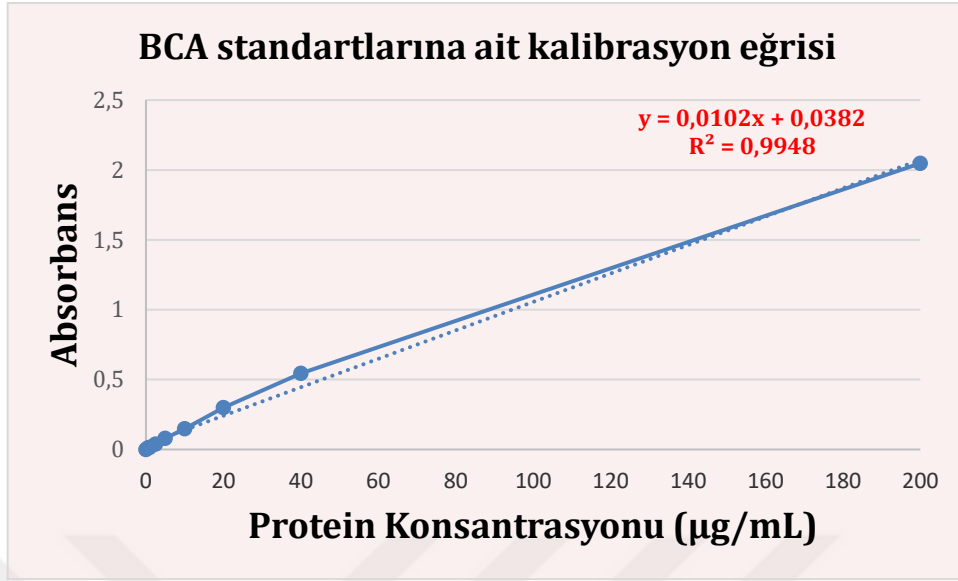


Şekil 3.1. rt-MKH kaynaklı ekzozom izolasyonunun şematik gösterimi.

3.3.2. rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların Karakterizasyonu

3.3.2.1. Mikro BCA ile Total Protein Miktar Tayini

Literatür verileri incelendiğinde kök hücre kaynaklı ekzozomların değerlendirilmesinde en çok kullanılan yöntem olarak Bikinkoninik Asit Testidir (BCA) [136]. Dolayısı ile bu çalışmada da izole edilen ekzozomların miktar tayini BCA ile yapılmış olup bu amaçla Mikro BCA™ Protein Tayin Kiti (ThermoFisher) üreticinin direktiflerine göre kullanılmıştır [137]. Özetle, ilk olarak kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için 0-200 µg/mL konsantrasyon aralığında olmak üzere 9 farklı konsantrasyonda BCA standartları hazırlanmış ve protein tayini yapılmak istenen örneklerle birlikte 96 gözlü kültür kabına 150 µL'şer konulmuştur. Ardından kitin bileşiminde bulunan bileşen A, bileşen B ve bileşen C önerildiği oranlarda (50:48:2) kullanılarak hazırlanan çalışma solüsyonundan her göze 150 µL konularak 2 saat 37 °C de inkübe edilmiştir. 2 saat sonunda hem BCA standartları hem de örnekler için absorbans değerleri 562 nm spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. 0-200 µg/mL standartlarına karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.2) ve bu eğri kullanılarak örneklerin protein miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Ekzozom miktar tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği. 0-200 µg/mL aralığında BSA konsantrasyonuna sahip standartlar kullanılarak hazırlanmış ve toplam ekzozom miktarı elde edilen matematiksel model kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.2.2. Partikül Boyutu ve Konsantrasyonunun Tespit Edilmesi

Partikül boyutu ve sayısı kök hücre kaynaklı ekzosomların karakterizasyonunda önemli parametrelerdir. 2018 yılında “Uluslararası Ekstraselüler Vezikül Derneği (ISEV)” tarafından yayınlanan rehberde yapılması gereken analizler arasında olduğu belirtilmiştir [138]. Literatürde ekzosomların boyut ve sayısının karakterize edilmesi amacıyla en çok tercih edilen yöntemler arasında nanopartikül izleme analizi (“*Nanoparticle tracking analysis*”, NTA) kullanılmaktadır. Bununla birlikte NTA analizine alternatif olarak geliştirilen qNano® yöntemi de kullanılmaktadır [136, 139]. Dolayısıyla bu çalışmada rt-MKH kaynaklı ekzosomların partikül boyutu ve sayısının analiz edilmesi için NTA ve qNano® analizi kullanılmıştır. NTA analizi için NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, USA), qNano® analizi için ise qNano® Gold sistemi (Izon, Yeni Zellanda) kullanılmıştır. Her iki analiz için numuneler uygun oranlarda seyreltilerek hazırlanmış ve cihazların örnek yükleme haznesine yüklenmiştir. Elde edilen veriler yönteme spesifik yazılımlar kullanılarak işlenmiş ve ortalama partikül boyutu ve konsantrasyonu tespit edilmiştir [140, 141].

3.3.2.3. Partikül Morfolojisinin Karakterizasyonu

Ekzozomların morfolojik karakterizasyonu Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM, FEI marka Tecnai G2 Spirit Biotwin, ABD) cihazında, lantan hekzaborür (LaB₆) elektron tabancası kullanılarak, 80 kV hızlandırıcı voltaj altında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 228 µg/mL derişime sahip ekzozom örneklerinden 1/5 ve 1/10 seyreltik konsantrasyonları hazırlanarak bu ekzozom örneklerinden karbon kaplı bakır TEM gridleri üzerine 10 µL damlatıldıktan sonra 10 µL %4 paraformaldehit çözeltisi eklenmiş ve 1 dakika bekletilmiştir. Grid yüzeyleri kaynatılmış-soğutulmuş ultra saf su ile yıkanarak (n=6) filtre kâğıdı yardımıyla kurutulmuştur. Daha sonra %2'lik fosfotungstik asit damlatılarak 1 dakika inkübasyondan sonra tekrar soğutulmuş ve ultra saf su ile yıkanp (n=6) filtre kâğıdı yardımıyla kurutulmuştur.

3.3.2.4. Ekzozomların akış sitometrisi ile fenotipik karakterizasyonu

rt-MKH'lerden izole edilen ekzozomların fenotipik karakterizasyonlarının yapılması, izole edilen partiküllerin ekzozom olduklarının kanıtlanması bakımından kritik öneme sahiptir [142]. İzole edilen ekzozomlar akış sitometrisi ile CD81, CD63 ve GM130 belirteçlerini ifade edip etmedikleri belirlenmiştir. Ekzozomların akış sitometrisi ile analiz edilmesi için numune hazırlama prosedürü karboksil lateks boncukların CD63, CD9 gibi ekzozom spesifik antikorlarla kaplanması, ekzozomların antikor kaplı boncuklara konjuge edilmesi ve ekzozomların florofor bağlı spesifik antikorlarla boyanması olmak üzere 3 temel basamaktan oluşmaktadır [143]. İlk basamakta 3,5 µm çapına sahip karboksil lateks boncuk solüsyonundan 6 µL alınıp PBS ile homojenize edildikten sonra 12.000 g'de santrifüj edilerek çöktürülmüş ve her antikor (CD63, CD9 ve GM130) için 2 µL boncuk ayrı tüplere alınmıştır. Boncukların antikorlarla kaplanması için 1 mg/mL konsantrasyonuna sahip CD63 (Novus, NB100-77913), CD9 (Novus, NBP2-67310) ve GM130 (NBP2-53420) antikor solüsyonundan 4 µL alınıp boncukların üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edilmiştir. 30 dk. sonra numuneler rotatora alınarak gece boyu orta hızda inkübasyona bırakılarak boncukların antikorlar ile kaplanması sağlanmıştır. Gece boyu inkübasyondan sonra antikor kaplanmış boncuklar %5'lik BSA solüsyonu ile 4 sa. oda sıcaklığında rotatorda inkübe edilmiş ve antikor kaplı boncuklar 12000 g'de 10 dk. santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Daha sonra 3 µg ekzozom, 1 µL antikor kaplı boncuğa gelecek şekilde hesaplamalar yapılarak boncuk-ekzozom konjugatları oluşturulmuştur. Gece boyu rotatorda inkübe edilen konjugatlar santrifüj edilerek çöktürülmüş ve %1 BSA içeren PBS içerisinde homojenize edilmiştir.

Son adım olarak boncuklara konjuge edilen ekzozomlar ikincil antikorlarla (CD63-FITC, CD81-PE ve GM130-FITC) oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilerek işaretlenmiştir. 2 saat sonunda örnekler santrifüj edilerek çöktürülmüş ve PBS içerisinde homojenize edilerek akış sitometri analizi yapılmıştır. Analiz Novocyt IVD (ACEA Biosciences, Agilent, ABD) akış sitometri cihazı, veriler ise NovoExpress 1,5.0 yazılımı kullanılarak işlenmiştir. Kontrol grubu olarak CD63, CD81 ve GM130 antikorların florofor işaretli izotipleri (CD63 için IgG1-FITC; CD81 için Armanien Hamster IgG-PE;) ve işaretlenmeyen (unstained olarak isimlendirilmiştir) ekzozomlar kullanılmıştır.

3.3.2.5. Ekzozom spesifik proteinlerinin western blot analizi ile gösterilmesi

Ekzozomların protein ifadeleri bakımından karakterize edilmesi amacıyla *western blot* analizi ile CD9, Alix, CD63 ve GM130 ifadesi belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak ekzozomlar proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren RIPA tamponu ile inkübe edilerek parçalanmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan rt-MKH'lerin lizatının elde edilmesi için proteaz ve fosfataz inhibitörleri eklenmiş ticari hücre parçalama kiti (xTRACTOR, 23235) kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlardaki total protein miktarı ekzozomlar için Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher, ABD), hücreler için Takara BCA Protein Assay Kit (Takara T9300A, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Ekzozomların proteinlerini konsantre etmek amacıyla santrifügal konsantratör (Vivaspin 500, 3 kDa, Sartorius) kullanılmıştır. Yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar dikkate alınarak SDS PAGE jel kuyularına maksimum hacim için ekzozomlar için 5 µg ve rt-MKH için ise 5 ve 30 µg protein yüklenmiştir. Hesaplanan miktardaki proteinler laemmlili örnek yükleme tamponuna (Biorad, 1610747) eklenerek 95 °C'de 5 dk. inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler %10 SDS'li poliakrilamid jellere yüklenmiştir. Molekül ağırlığı standardı olarak önceden renklendirilmiş hazır protein karışımı kullanılmıştır (Bio-Rad, Precision plus Dual color standard, 1610374). Elektroforetik ayrıştırma için yürütme işlemi 25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM glisin, %0,1 SDS içeren tampon kullanılarak 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminin sonunda jel üzerinde ayrılmış olan proteinler poliviniliden florür (PVDF, Millipore) membranlara 35 V'de 12-16 sa. boyunca transfer edilmiştir. Transferin tamamlanmasının ardından, membranlar TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, %0,1 Tween-20, pH 7.4) içinde çözülmüş %5 yağsız süt tozu ile bloklanmış ve Alix, (Novus, NB100-65678, 1:500), CD9 (Novus, NBP2-67310, 1:500), CD63 (Novus, NB100-77913, 1:500) ile GM130 (Novus NBP2-53420, 1:1000) primer antikorları ile bir gece 4 °C'de inkübe edilerek işaretlenmiştir.

Daha sonra membranlar sekonder antikorlar (Novus NB7539 goat anti-mouse 1:5000, Novus NB7160 goat anti rabbit 1:5000) ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edilip TBS-T ile yıkanmış ve görüntüleme işlemi için kemilüminesan substrat (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific) ile inkübe edilmiştir. Membranlardaki görüntü, görüntüleme cihazı (Bio-Rad, ChemiDoc Touch, USA) ile alınmıştır.

3.4. rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların Biyolojik Etkilerinin İncelenmesi

Bölüm 3.3'te verilen yöntemlerle izole edilip karakterize edilen ekzozomların hücre canlılığına, hücre migrasyonuna, oksitativ strese ve yeni damar oluşumuna etkileri araştırılmış ve yapılan çalışmaların detayları raporlanmıştır.

3.4.1. rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların Hücre Çoğalmasına Olan Etkisi

3.4.1.1. İnsan Fibroblast (hFB) ve Keratinosit (HaCaT) Hücre Kültürü

Tez kapsamında yara iyileşmesine yönelik olarak ekzozom yüklü jelatin süngerlerin hazırlanması ve biyolojik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle ekzozomların deri fibroblast ve keratinositleri üzerindeki biyolojik etkilerinin tespit edilmesinin kritik olacağı düşünülmüş olup rt-MKH kaynaklı ekzozomların hücre çoğalmasına etkilerinin tespit edilmeleri amacıyla insan deri kaynaklı fibroblast (hFB ATCC, ABD) ve keratinosit hücreleri (HaCaT, ATCC, ABD) kullanılmıştır. Fibroblast hücreleri bileşiminde %10 FBS, %1 l-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (LG) besi ortamı kullanılarak kültüre edilmişlerdir. Keratinosit hücreleri ise bileşiminde %10 FBS, %1 l-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (YG) besi ortamı kullanılarak kültüre edilmiştir. Fibroblast hücreleri uzun tipik fibroblastik morfoloji gösterirken keratinosit hücreleri küçük ve tipik epitel hücre morfolojisi göstermiştir. Hücre yoğunluğu %80-90 oranına gelene kadar pasaj yapılarak kültürlerine devam edilmiş ve deneysel çalışmalar için pasaj 6 seviyesindeki hücreler kullanılmıştır.

3.4.1.2. Ekzozomların hFb ve HaCat Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

rt-MKH kaynaklı ekzozomların konsantrasyona bağlı olarak hücre çoğalmasına olan etkisinin araştırılması amacıyla hFB ve HaCat hücreleri sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna 5×10^3 hücre gelecek şekilde dağıtılmış ve hücre tutunmasının gerçekleşmesi için 24 saat inkübasyon yapılmıştır.

24 saat sonunda hücreler üzerine bileşiminde 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 5 ve 10 µg/mL olmak üzere 7 farklı konsantrasyonda ekzozom bulunan %2 FBS içeren kültür ortamı uygulanmıştır (100 µL/kuyucuk). Pozitif kontrol grubu olarak %10 DMSO içeren besi ortamı ve negatif grup olarak da sadece besi ortamı kullanılmıştır (n=4). Ekzozom gruplarında besi ortamına eklenen PBS etkisinin elimine edilebilmesi için her bir grup ile aynı miktarda PBS içeren kontrol grubu oluşturulmuştur. 48 saat sonunda ekzozomların hücre canlılığı etkisini analiz edebilmek için laboratuvarımızda rutin olarak yapılan MTT analizi yapılmıştır. Bu amaçla hücrelerin ortamı bileşiminde %10 MTT (5 mg/mL) içeren serumsuz DMEM ile değiştirilerek 4 saat boyunca standart hücre kültürü koşullarında inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda MTT solüsyonu uzaklaştırılarak oluşan formazan kristallerinin süpernatanta geçmesi için DMSO eklenmiş ve 15 dk karıştırma altında inkübasyon yapılmıştır. 15 dk. sonunda spektrofotometrede (Molecular Devices, ABD) 567 ve 670 nm’de absorbans okuması yapılarak elde edilen sonuçlar % hücre canlılığı olarak grafiğe geçirilerek raporlanmıştır.

3.4.2. Ekzozomların Hücre İçine Alımının Belirlenmesi

Ekzozomların hücre içine alımının tayin edilmesi ekzozomların boyut ve protein karakterizasyonunun yanında hedef hücreyle etkileşime geçtiğinin de gösterilmesi açısından önem taşımaktadır [144]. Epitel hücreleri kullanılarak izole edilen ekzozomların hücre içine alımları test edilmiştir. Bu amaçla rt-MKH’lerden izole edilen ekzozomlar 1 µM CM-Dil ile işaretlenmiş ve hücrelere uygulanarak 2 ve 24 saat sonunda hücre içine alımları floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Ekzozomların CM-Dil ile işaretlenmesi amacıyla 34 µg ekzozom 1 µM CM-Dil ile 37 °C’de 30 dk. inkübe edilmiş ve daha sonra 0,22 µm filtreden geçirilen PBS ile 35 mL’ye tamamlanmıştır. CM-Dil işaretli ekzozomların çöktürülmesi için ekzozom solüsyonu 100.000 g’de 1 saat santrifüj edilerek ekzozomlar pellet olarak elde edilmiştir [143]. Kontrol grubu olarak 1 µM CM-Dil içeren PBS hazırlanarak aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Pellet olarak elde edilen CM-Dil işaretli ekzozomlar serum içeren kültür ortamında süspanse edilerek hücrelere uygulanmıştır. Bu amaçla epitel hücreleri 1x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde çok gözlü kültür kabına dağıtılarak (n=4) 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücreler 1 defa PBS ile yıkanarak besi ortamı içinde homojenize edilen ekzozomlar hücrelere uygulanmıştır. 2 ve 24 saat sonra hücreler fikse edilmiş ve hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenerek mikroskop altında ekzozomların hücre içine alımları incelenmiştir.

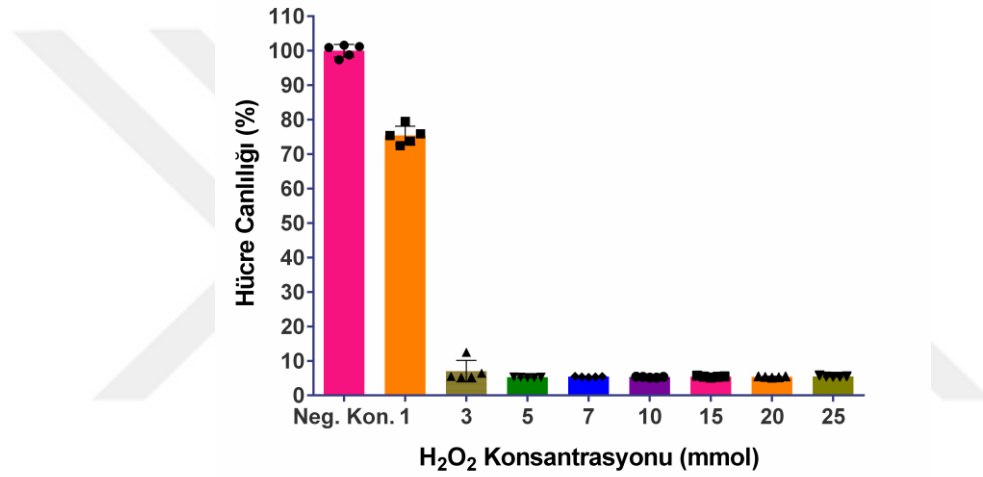
3.4.3. rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların hFB ve HaCaT Hücrelerinin Migrasyon Yetenekleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Çizik deneyi ile ekzozom uygulanan hücrelerin migrasyon yeteneğinde herhangi bir değişiklik meydana gelip gelmediği incelenmiştir. Bu deney ile yara iyileşmesi için önemli olan hücre göçü test edilmiştir [145]. Bu amaçla hFB ve HaCaT hücreleri 24 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna 1×10^5 hücre gelecek şekilde dağıtılmış ve hücre tutunması için 24 saat %10 FBS içeren besi ortamı ile inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda hücre çoğalması ve migrasyonunun birbirinden ayırt edilebilmesi için hücrelerin çoğalmasını yavaşlatmak amaçlı hücreler gece boyunca %2 FBS içeren kültür ortamında inkübe edilmiştir. Hücreler kuyucukları tamamen doldurduktan sonra 200 μ L'lik pipet ucuyla çizik oluşturulmuş ve kültür ortamı ile yıkama yapılarak ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Diğer *in vitro* deneyleri ile tutarlılık göstermesi amacıyla hücre canlılığı üzerindeki etkileri bilinen 0,25, 1, 10 μ g/mL konsantrasyonlarında ekzozom ve negatif kontrol olarak %2 FBS içeren normal besi ortamı hücrelere uygulanmıştır (n=3). 06, 12 ve 24 saat sonunda mikroskopta görüntüler alınmış ve Image J programı kullanılarak zamana bağlı olarak yara bölgesinde meydana gelen alan değişimi tespit edilerek sayısal veriler elde edilmiştir. Bu amaçla her gruptan 3 farklı bölgeden çekilen görüntüler kullanılmıştır. Gruplar arasında anlamlı bir farkın olup olmadığı t-test analizi yapılarak değerlendirilmiş ve $p < 0,05$ anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

3.4.4. rt-MKH Kaynaklı Ekzozomların Oksidatif Stres Altında Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi

rt-MKH kaynaklı ekzozomların oksidatif strese maruz bırakılan deri hücrelerinin canlılığına olan etkisinin incelenmesi, ekzozomların oksidatif stres koşullarında nasıl bir etki gösterdiğini anlamak adına önemli olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla ilk olarak HaCat hücrelerinin %50'sini (IC_{50}) öldüren H_2O_2 konsantrasyonunun tespit edilebilmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır. HaCat hücreleri 5×10^3 hücre/göz olacak şekilde 96 gözlü kültür kabına dağılarak 24 saat süresince hücrelerin tutunmaları beklenmiştir (n=5). 24 saat sonunda hücrelerin ortamı bileşiminde 1-25 mmol aralığında farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 bulunan kültür ortamı ile değiştirilmiş ve 4 saat inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra MTT yapılarak IC_{50} belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar 1,5 mmol H_2O_2 uygulanan grupta HaCat hücrelerinin %50'sinin öldüğü tespit edilmiş olup 1,5 mmol H_2O_2 kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 3.3). Daha sonra oksidatif strese maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinde rt-MKH kaynaklı ekzozomların canlılığa olan etkisinin tespit edilmesi amacıyla çalışmalar yürütülmüştür.

Bu amaçla HaCaT hücreleri göz başına 5×10^3 hücre olacak şekilde dağıtılarak 24 saat hücrelerin tutunması için inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerindeki besi ortamı 0,25, 1 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ekzozom içeren %2 FBS içeriğine sahip taze besi ortamı ile değiştirilmiş ($n=4$) ve kültüre 24 saat daha devam edilmiştir. 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki ortam, oksidatif stresi tetiklemek için bileşiminde 1,5 mmol H_2O_2 bulunan ortam ile değiştirilmiştir [146, 147]. 4 saat sonra MTT yapılarak hücre canlılığı analiz edilmiştir. Kontrol grubu olarak 4 saat boyunca 1,5 mmol H_2O_2 maruz bırakılan hücreler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadıkları t testi yapılarak tespit edilmiş ve $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.3. HaCat hücrelerinde hidrojen peroksitin konsantrasyona bağlı meydana getirdiği hücre canlılığı profili ($n=5$).

3.5. Ekzozomların Anjiyojenik Etkisinin İncelenmesi

Yara iyileşmesi sürecinde anjiyogenezin kritik bir biyolojik süreç olduğu bilinmektedir [148]. Dolayısıyla bu çalışmada da rt-MKH kaynaklı ekzozomların anjiyojenik etkilerinin tespit edilmesi planlanmıştır. Literatürde kök hücre kaynaklı ekzozomların anjiyojenik etkilerinin incelenmesinde insan kaynaklı endotel hücrelerinin (HUVEC) kullanıldığı ve tüp benzeri yapıların elde edilip değerlendirildiği analiz yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir [135, 149]. Bu tez çalışmasında rt-MKH kaynaklı ekzozomların anjiyojenik potansiyeli aortik halka ve tavuk embriyosu koryoallantoik membran (CAM) yöntemleri ile belirlenmiştir.

Aortik halka deneyi, gelişmeye devam eden embriyonik döneme yakın olan canlıların (fare ve/veya civciv) aort damarlarından hücre kültürü koşullarında yeni damar oluşumunu gösteren endotel hücre filizlenmelerinin değerlendirildiği bir deneysel yöntemdir. Organ kültürü olması sebebiyle hücre kültürüne göre fizyolojik şartlara daha benzer bir ortamda doz-yanıt ilişkisinin çalışılmasına olanak tanımaktadır [150].

CAM deneyi ise *in vivo* ortamda hem biyoaktif faktörlerin hem de biyomalzemelerin anjiyojenik potansiyellerinin değerlendirilmesini mümkün kılar [151]. CAM analizi döllenmesi gerçekleşen tavuk embriyosunun *in ovo* (kabuk içerisinde) veya *ex ovo* (kabuk dışında) büyütülmesi ile damar gelişiminin gözlemlenebildiği bir yöntemdir. CAM ise civciv embriyosunun gaz alışverişi ve kalsiyum için bir organ olarak görevi gören embriyonik bir zarıdır. Yapısında yoğun kılcal damar ağlarına sahip kan damarları bulunur. Koryoallantoik zar, gelişen embriyonun üzerinde kaldığı için, deneysel müdahaleler için erişim kolaylığı sağlamaktadır.

3.5.1. Ekzozomlarının Anjiyojenik Etkisinin Tavuk Embriyosu Aortik Halka Yöntemi ile İncelenmesi

rt-MKH kaynaklı ekzozomların anjiyojenik etkilerinin tespit edilmesi için civciv aortik halka deneyinin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla anjiyogenez etkisi bilinen damar oluşumunu tetikleyen vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve damar oluşumunu baskılayan tirozin kinaz inhibitörü sunutinib kullanılmıştır.

Aortik halkalar kültür koşullarında endotelial filizlenme ve 3-5. günler arasında filizlenmeler sonucu tipik uzun mikro tübüler hücre uzantıları ile kan damarı lümenleri oluşturmak üzere endotelial hücre boşluklarını meydana getirmektedir [150, 152, 153]. 13. günde olan civciv embriyolarından aort damarların çıkarılması ve aortik halkaların oluşturulmasına dair yapılan çalışmalar aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

Döllenmiş Yumurta İnkübasyonu: Aortik halka analizi için kullanılacak döllenmiş beyaz tavuk yumurtaları Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden tedarik edilmiştir. 4 adet yumurta 38 °C'de nemlendirilmiş inkübatörde 12-14 gün arasında herhangi bir işlem yapılmaksızın inkübe edilmiştir. Embriyonik gelişimin 13. gününde steril koşullarda yumurtalar kırılarak embriyolar dışarı çıkartılmıştır.

Embriyolar dışarı çıkartıldıktan hemen sonra dekapitasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve embriyoların abdominal bölgesinden dikine birer kesik atılarak göğüs duvarları açılmıştır. Embriyoların kalpleri, etrafındaki bağ dokularıyla birlikte aortik damarları vücutlarından çıkartılmış ve steril PBS içerisine alınmıştır. Kalan vücut parçaları tıbbi atık kategorisinde laboratuvarından uzaklaştırılmıştır.

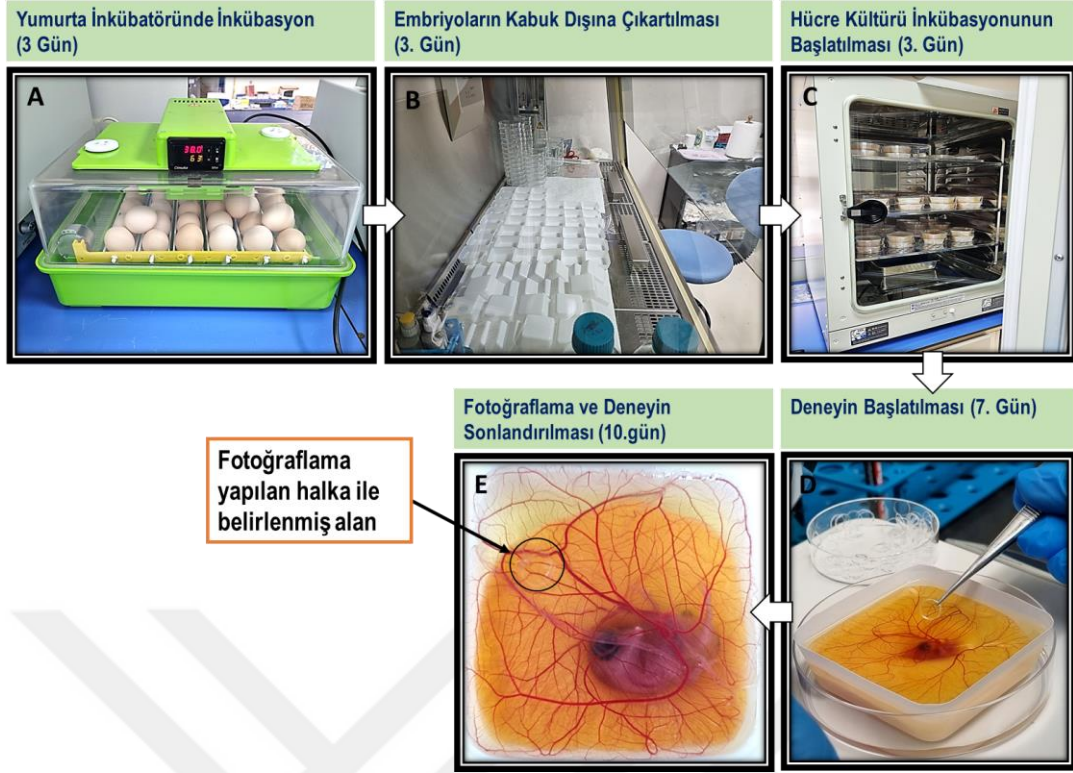
Aortik Halkaların Hazırlanması: Diseke edilen kalp dokusunda 2'si bir ortak köke ve 3'ü başka bir ortak köke bağlanmış olan aort damarların aralarındaki ve etrafındaki bağ dokular pens kullanılarak temizlenmiştir. Bunu takiben, aortik damarlar kalbe bağlı oldukları karıncık köklerinden bisturi ile ayrılmıştır. Kalpten diseke edilen damarların etrafındaki bağ dokuları tamamen temizlendikten sonra birleşik damarlar da birbirlerinden ayrılmış ve her bir aortik damardan yaklaşık 1 mm uzunlukta olacak şekilde halkalar kesilerek PBS içerisine konulmuştur.

Aortik Halka Deneyinin Çeşitli Biyolojik Faktörler ile Validasyonu: Embriyolardan elde edilen halkalar 24 kuyucuklu kültür kabında, matrijele gömülerek jelleşmenin meydana gelmesi için normal kültür koşullarında 30 dk. inkübe edilmiştir. 30 dk. sonunda aortik halkalara sunitinib (2 ve 4 µg/mL, n=5) ve VEGF (80 ve 160 ng/mL, n=5) içeren DMEM (bileşiminde %2,5 FBS (Sigma-Aldrich, ABD), %1 l-glutamin (Cegrogen, Almanya), %0,1 penisilin-streptomisin (Cegrogen, Almanya) bulunmaktadır) eklenerek kültürleri başlatılmıştır. %2,5 FBS içeren DMEM kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 2 günde bir ortam değiştirilmiş ve 3. ile 5. günde mikroskopik gözlem yapılarak görüntüler alınmıştır.

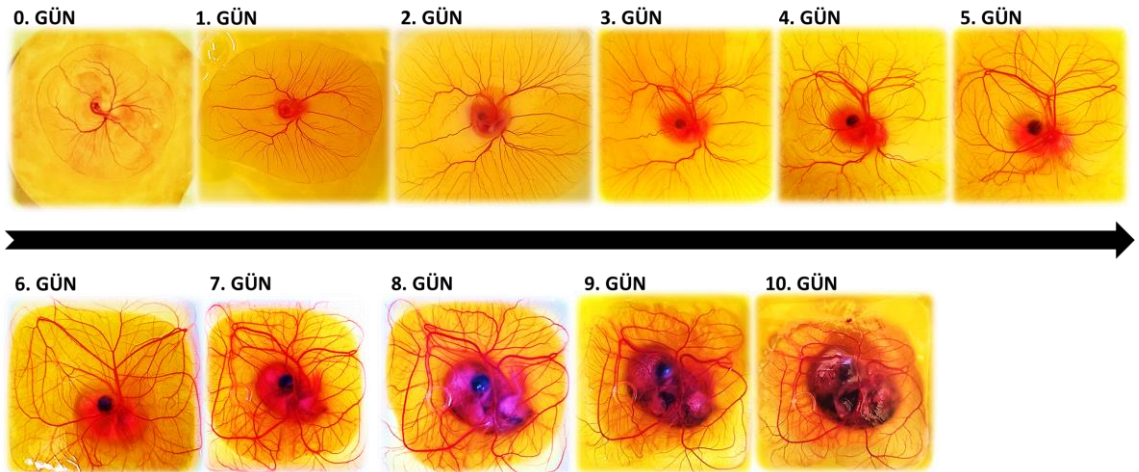
Aortik Halka Deneyinde Ekzozomların Anjiyojenik Etkisinin Değerlendirilmesi: Aortik halka deneyi hücre kültürüne göre fizyolojik şartları taklit eden bir ortamda ekzozomların doz-yanıt ilişkisini kontrollü incelemek amacıyla seçilmiştir. Bu amaçla embriyolardan elde edilen halkalar 24 kuyucuklu kültür kabında, matrijele gömülerek jelleşmenin meydana gelmesi için normal kültür koşullarında 30 dk. inkübe edilmiştir. Daha sonra aortik halkalara ekzozom (5 ve 25 µg/mL), sunitinip (2 µg/mL, anjiyogenez inhibitörü) ve VEGF (80 ng/mL, anjiyogenez aktivatörü) içeren DMEM (YG) (bileşiminde %2,5 FBS (Sigma-Aldrich, ABD), %1 l-glutamin (Cegrogen, Almanya), %0,1 penisilin-streptomisin (Cegrogen, Almanya) bulunmaktadır) eklenerek kültürleri başlatılmıştır. %2,5 FBS içeren DMEM (YG) kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Besi ortamı değişimi yapılmamış ve 3. ile 5. günde mikroskopik gözlem yapılarak görüntüler alınmıştır.

3.5.2. Ekzozomlarının Anjiyojenik Etkisinin CAM Analizi ile İncelenmesi

Ekzozomların anjiyojenik etkinliklerinin tespit edilmesi amacıyla kullanılacak olan CAM analizinin ilk olarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla kullanılacak olan standart koşullarda elde edilmiş kuluçkalık yumurtalar Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tavukçuluk Enstitüsü'nden temin edilen kuluçkalık yumurtalar uygun koşullarda laboratuvara getirilip ve sterilizasyon amacıyla yumurtalar %20'lik etil alkol ile kabuğa zarar vermeden nazikçe temizlenmiştir. Embriyonik gelişimin tetiklenmesi için döllenmiş yumurtalar sıcaklığı 37 °C ve nem oranı %60-65 olan yumurta inkübatörüne (Cimuka, Türkiye) kılavuzda belirtilen şekilde yerleştirilmiştir (0. gün) (Şekil 3.4, 1. adım). 0. günde inkübatöre koyulan yumurtalar, 3. günde inkübatörden çıkartılarak steril koşullarda bileşiminde %1 antibiyotik-antimitotik bulunan solüsyondan 2 mL konulan tartım kaplarına kırılarak sıcaklığı 38 °C'ye ayarlanmış hücre kültürü inkübatörüne alındıktan sonra inkübasyon başlatılmış ve embriyoların gelişimi takip edilerek belirli günlerde embriyolar fotoğraflanmıştır. Yapılan gözlemler kültür süresi geçtikçe embriyoların sağlıklı bir biçimde büyüyerek organ sistemlerinin geliştiğini ve CAM'de damar ağının belirginleştiğini göstermiştir. Sağlıklı embriyonik gelişiminin 7. gününde damar oluşumunu baskılayan sunitinib (Sigma-Aldrich, ABD), damar oluşumunu tetikleyen vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF, Sigma-Aldrich, ABD), PBS ve ekzozom solüsyonlarının uygulanması için kılavuz görevi görecek steril plastik halkanın CAM üzerine konumlandırılması işlemi yapıp gelişimin 8. gününde günde 2 defa olmak üzere 0,3 µg/10 µL sunitinip, 100 ng/10 µL VEGF ve kontrol grubu olarak 10 µL PBS uygulaması yapılmıştır. Embriyonik gelişimin 10. gününe kadar uygulama yapılmış ve 10 gün sonunda görüntüler alınarak embriyolar sakrifiye edilmiştir. (Şekil 3.4, 4.adım). Embriyonik gelişim süreci ise yumurtaların kabuğundan çıkarıldığı gün 0. gün şeklinde belirtilerek gelişimin 10.gününe kadar Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.4. rt-MKH kaynaklı ekzozomların CAM analizinde anjiyojenik potansiyellerinin değerlendirilmesini gösteren akış diyagramı. CAM analizinde döllenmiş yumurtaların inkübatöre yerleştirilmesi (A), yumurtaların embriyonik gelişimin 3. gününde kırılarak embriyoların kaplara aktarılması (B) ve hücre kültürü koşullarının inkübasyonun başlatılması (C) embriyonik gelişimin 7. gününde ekzozomların uygulanmasında kılavuz görevi görecek steril plastik halkanın uygun yere konumlandırılması (D) ve embriyonik gelişimin 10. gününde ekzozom uygulamasının sonlandırılarak görüntülemenin yapılması (E).



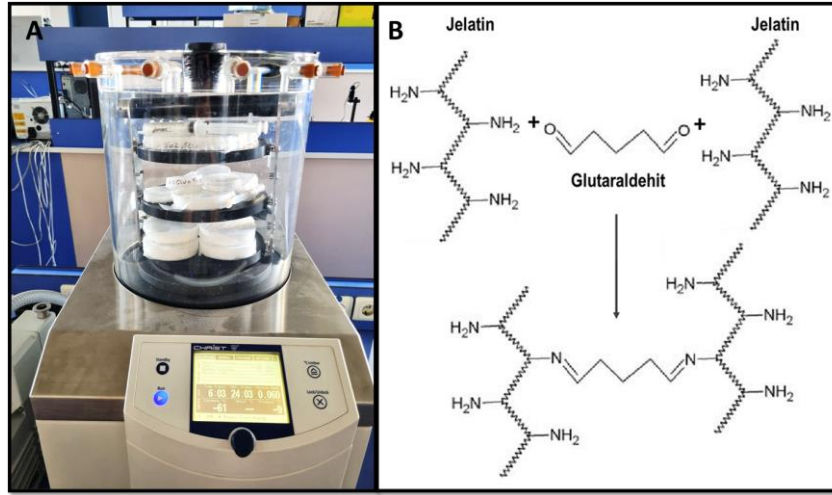
Şekil 3.5. Zamana bağlı olarak civciv embriyolarının ve CAM'ın gelişimi.

Tavuk Embriyosu Koryoallantoik Membranlarda (CAM) Ekzozomların Anjiyojenik Etkisinin Değerlendirilmesi: Ekzozomların anjiyojenik etkilerinin değerlendirileceği CAM analizinde ilk olarak toksik bir etkinin olup olmayacağının tayin edilebilmesi açısından yüksek konsantrasyonlar ile deney kurulmuştur. Kontrol grubu olarak PBS, negatif kontrol olarak sunitinib ve pozitif kontrol olarak VEGF kullanılmıştır. Deneyde; 10 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL ekzozom konsantrasyonlarında anjiyojenik etki değerlendirilmiştir. CAM üzerine koyulan halkaların içerisine damlatılan etken maddelerin etkinlikleri, koyulan halkanın iç kısmının ve çevresinin fotoğraflarının çekilmesi ile belirlenmiştir.

3.6. 3 Boyutlu (3B) Jelatin Süngerlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.6.1. 3B Jelatin Süngerlerin Hazırlanması

3B jelatin süngerlerin hazırlanması için tip A jelatin (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmış ve stabiliteğini arttırmak için glutaraldehit ile çapraz bağlanması planlanmıştır. Bu amaçla tip A jelatin yaklaşık 50 °C'deki distile suda çözülerek %4'lük jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiye farklı konsantrasyonlarda (%0,5, %1 ve %2 v/v) 1 mL glutaraldehit çözeltisi eklenmiş ve 30 dk. boyunca 2000 rpm'de homojenizatörde karıştırılmıştır (Şekil 3.6). Oluşan köpükler kalıplara dökülerek 24 saat -80 °C'de dondurulmuş ve daha sonra dondurulan jelatin süngerler liyofilizatöre alınarak 24 saat boyunca kurutulmuştur. Kullanıma hazır hale gelen jelatin süngerler oda sıcaklığında saklanmıştır. 3B jelatin süngerlerin morfolojik karakterizasyonu yapılarak, su tutma kapasiteleri, hidrolitik bozunmaları ve sitotoksiteleri belirlenmiştir. Jelatin süngerler (JS) glutaraldehit yüzdelereine (%0,5Glu, %1Glu, %2Glu) göre sırasıyla JS-%0,5Glu, JS-%1Glu, JS-%2Glu olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 3.6. A) Jelatin süngerlerin hazırlanması, B) Jelatin ve glutaraldehit arasındaki çapraz bağlanma.

3.6.2. 3B Jelatin Süngerlerin Karakterizasyonu

Süngerlerin Morfolojik Karakterizasyonu: Hazırlanan jelatin süngerlerin (JS-%0,5Glu, JS-%1Glu, JS-%2Glu) morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. SEM görüntülemeleri TESCAN Gaia3 (Çek Cumhuriyeti) cihazı kullanılarak 30 kV hızlandırma geriliminde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örnekler ince bir tabaka altın ile kaplanmıştır. Jelatin süngerler gözenek yoğunluğu ve çapları açısından morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

Jelatin Süngerlerin Su Tutma Kapasitesi: Hazırlanan tüm jelatin süngerler 3'er tekrarlı grupları halinde hazırlandıktan sonra kuru ağırlıkları tartılmıştır (A_0) ve 1 saat süreyle saf suda (oda sıcaklığında) inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda dengeye gelen süngerler tekrar tartılarak (A_1) su tutma kapasiteleri aşağıdaki verilen denklem yardımıyla belirlenmiştir.

$$\% \text{ su tutma kapasitesi} = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100$$

Jelatin Süngerlerin Hidrolitik Bozunma Davranışlarının İncelenmesi: Hidrolitik bozunma davranışlarının belirlenmesi için jelatin sünger örnek grupları eşit yüzey alanına sahip olacak şekilde eşit hacimde hazırlanarak tartılmıştır (A_0).

Sünger örnekleri su banyosunda 37 °C'de 5 mL fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH = 7,4) içerisinde inkübe edilmiştir. İlk gün 3., 6., 12. ve 24. saatlerde örnek toplanmıştır. Örneklerin üzerinden 1 mL sıvı çekilerek yerine 1 mL PBS eklenmiştir. Sonraki günlerde her 24 saatte bir örnek toplanmıştır. Daha sonra BCA kiti (Takara, Japonya) kullanılarak protein miktar tayini yapılmıştır. Belirli zamanlarda toplanan örneklerden toplam protein miktarları (A_1) hesaplanarak başlangıç miktarı (A_0) ile oranlanarak yüzde bozunma oranı hesaplanmıştır.

$$\% \text{ bozunma} = \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

Jelatin Süngerlerin Hücre Canlılığına Etkisi: Jelatin süngerlerin hücre canlılığına etkisi L929 dermal fibroblast hücreleri üzerinde test edilmiştir. Bu amaçla L929 hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0,1 penisilin/streptomisin içeren DMHM (YG) ile inkübe edilmiştir. Daha sonra 96 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna 10^4 hücre gelecek şekilde hücre ekimi yapılmış ve 24 saat boyunca hücre tutunması için inkübe edilmiştir. Sünger örnekleri metoda uygun ($6 \text{ cm}^2/\text{mL}$) alan hesabı yapılarak kesilmiş ve örneklerin 45 dk. boyunca UV ile sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerine 1'er mL besi ortamı eklenerek 72 saat boyunca besi ortamı içerisinde standart hücre kültürü koşullarında inkübe edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak besi ortamı, pozitif kontrol grubu olarak %10 DMSO içeren besi ortamı kullanılmıştır. 72 saat sonunda elde edilen ekstraktlar hücrelere uygulanarak ($n=20$) 24 saat sonunda MTT testi gerçekleştirilerek % hücre canlılığı hesaplanmıştır.

3.7. Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Biyolojik Etkilerinin İncelenmesi

Farklı konsantrasyonda gluteraldehit (%0,5, %1, %2) ile çapraz bağlanarak hazırlanan jelatin süngerlerin özellikleri incelenerek %2 gluteraldehit ile çapraz bağlanan jelatin süngerlerin ekzozom taşıyıcı bir sistem olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Yara iyileşmesine yönelik hazırlanan bu süngerlere rt-MKH kaynaklı ekzozomlar farklı konsantrasyonlarda yüklenerek hücre migrasyonu ve anjiyojenik etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmaların detayları aşağıda verilmiştir.

3.7.1. Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Hücre Migrasyonuna Etkisi

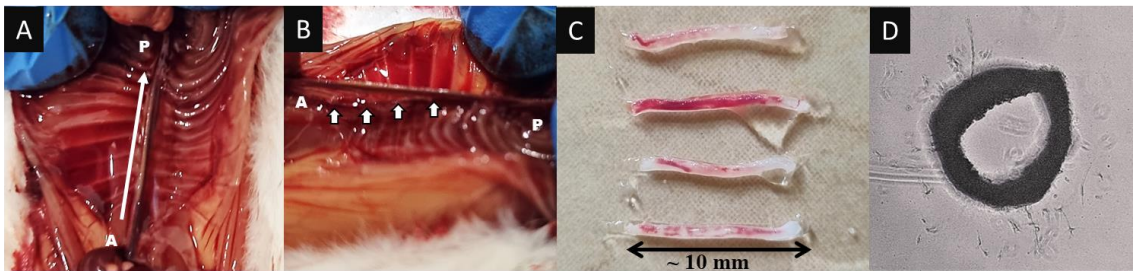
rt-MKH kaynaklı ekzozomlar jelatin süngerlere yüklenerek hücre migrasyonuna etkisi çizik deneyi ile incelenmiştir. Bu amaçla HaCat hücreleri $1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kabına dağıtılmış ve tamamen yüzeyi kaplayana kadar standart kültür koşullarında kültür edilmişlerdir. Hücreler %100 doluluğa ulaştıklarında besi ortamları %2 FBS içeren DMEM (YG) ile değiştirilerek 24 saat daha inkübe edilmişlerdir. %2 Glu kullanılarak hazırlanan jelatin süngerler 45 dk UV ile sterilize edildikten sonra serbest ekzozom konsantrasyonları (0,25, 1 ve 10 $\mu\text{g/mL}$) ile aynı miktarda ekzozom 40 μL besi ortamında konsantre edilerek jelatin süngerlere yüklenmiş 8 μm por çapına sahip membran bulunduran insertlere (Greiner Bio-one, Almanya) yerleştirilerek 1 saat hücre kültürü kabinde kuruması amacı ile bekletilmiştir. Böylece ekzozomların jelatin süngerlere entegre olması sağlanmıştır. Diğer yandan kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayan HaCaT hücreleri 200 μL 'lik pipet ucu ile çizilerek yaralar oluşturulmuştur. Bunu takiben ekzozom yüklenmiş jelatin süngerler bulunduran insertler çizilen HaCaT hücreleri üzerine konumlandırılmış ve insertin dış kısmına 600, iç kısmına 250 μL bileşiminde %2 FBS bulunan besi ortamı konularak kültür başlatılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak %2 FBS içeren besi ortamı emdirilen jelatin süngerler kullanılmıştır. Kültürün 6. 12. ve 24 saatlerinde ters faz ışık mikroskobu kullanılarak her grup için 3 farklı bölgeden görüntüler alınmış ve yara kapanma alanı Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.7.2. Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Aortik Halka Yöntemi ile Anjiyojenik Etkilerinin İncelenmesi

Ekzozom yüklü jelatin süngerlerin anjiyojenik etkileri organ kültürü olan aortik halka deneyi ile araştırılmıştır. Bu amaçla ekzozom yüklü jelatin süngerler fare aortik halkalarına uygulanmıştır. Fare aortik halka deneyi tavuk aortik halka deneyine kıyasla bazı avantajlar sunmaktadır. Daha belirgin görünen endotel filizlenmeleri deneyin takibi ve sonuçların analiz edilmesini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda fare aortik damarlarına immünohistokimyal boyama yapılarak daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi mümkündür [154].

Aortik halka deneyi için 3-4 haftalık erkek fareler kullanılmıştır. Aort damarları 520 no'lu Etik Kurul kapsamında alınmıştır (Kobay A.Ş.). Deney başlangıcında öncelikle servikal dislokasyon ile fareler etkisiz hale getirilmiştir. Farelerin göğüs kafesi açıldıktan sonra damarın etrafındaki dokular ve organlar uzaklaştırılmıştır.

Aort damarının anterior ve posterior uçlarının açıkça görüldüğü durumda damar, anterior ucundan başlayarak posterior ucuna kadar omurgadan nazikçe ayrılmıştır (Şekil 3.7A-B). İki ucundan kesildikten sonra aort damarları PBS içerisine alınmıştır. Sonraki aşamada diseksiyon mikroskobu ile aort damarının etrafındaki yağ ve bağ dokular temizlenmiştir. Aort damarı yaklaşık 10 mm'lik halkalara bölündükten sonra deney kurulumu aşamasına geçilmiştir (Şekil 3.7C). Deney kurulumunda 48 kuyucuklu kültür kabı kullanılmıştır. Deneyde 3B ortam sağlayacak olan jel olarak endotel hücreleri için en uygun koşulları sağladığı bilinen Matrigel® ile aynı içeriğe sahip ECM Gel (Sigma-Aldrich, USA) kullanılmıştır [155]. Belli sayıda setler halinde önce her bir kuyucuğa 20 μ L Matrigel® konulduktan sonra halkalar yerleştirilmiştir. Bütün halkalar yerleştirildikten sonra jelleşmenin gerçekleşmesi için 30 dk. boyunca 37°C inkübasyon yapılmıştır. Jelatin süngerler uygulama öncesinde 45 dk. boyunca UV ışığı ile sterilize edilmiştir. Daha sonra 0,6 mm çapında kesilen jelatin süngerlere besi ortamı içerisinde 0,5, 5 ve 25 μ g/mL konsantrasyonlarında ekzozom solüsyonları yüklenmiştir. Ekzozom yüklü jelatin süngerler aortik halkaların yanına yerleştirildikten (n=4) sonra 500 μ L %2,5 FBS içeren DMEM (YG) halkaların üzerine eklenmiştir ve kültüre başlanmıştır (0. gün). Jelatin süngerin etkisinin görülebilmesi amacı ile aynı miktarda ekzozom serbest olarak aortik halkalara uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak PBS emdirilmiş jelatin süngerler kullanılmıştır. İnkübasyonun 8. gününde ışık mikroskobu ile görüntüleme yapılarak deney sonlandırılmıştır (Şekil 3.7D).



Şekil 3.7. Fare aortik halka deneyi uygulaması. A) Omurga ile bitişik halde bulunan fare aort damarı B) Fare aort damarının anterior ucundan başlanarak omurgadan ayrılması C) Fareden alınan aort damarlarının diseksiyon mikroskobu altında bağ dokulardan temizlenmiş görüntüleri D) Matrijele gömülerek kültüre edilen aortik halkanın mikroskopik görüntüsü. A: Anterior P: Posterior

3.7.3. Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin CAM Analizi ile Anjiyojenik Etkilerinin İncelenmesi

Ekzozom entegre jelatin süngerlerin anjiyojenik etkileri CAM analizi ile belirlenmiştir [156, 157]. Bu amaçla embriyonik gelişimin 3. günündeki embriyolar kabuklarından çıkartılarak hücre kültüründe inkübasyona başlanmıştır. Embriyonik gelişimin 7. günündeki 54 adet embriyo PBS (kontrol grubu), serbest ekzozom ve ekzozom yüklü jelatin süngerlerin uygulanması için rastgele gruplara ayrılmıştır. Uygulama alanının belirlenebilmesi için halkalar yerleştirildikten sonra 0,5 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarında ekzozom yüklü jelatin süngerler implante edilmiştir. Aynı miktarda serbest ekzozomlar ise damlatılmıştır. Ekzozom yüklü jelatin süngerler, serbest ekzozom ve PBS (kontrol grubu) damlatılmış (n=9) gruplar embriyo gelişimin 9. gününe kadar inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Embriyonik gelişimin 9. gününde fotoğraflama yapılmış ve fotoğraflar Image J programı ile analiz edilerek % damar yoğunluğu hesaplanmıştır.

3.8. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada yapılan tüm deneylerde tekrar sayısı (n) en az 3 olacak şekilde planlama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ortalama±std olarak rapor edilmiştir. Ekzozom izolasyon verimini etkileyen parametrelerin belirlenmesi için yapılan çalışmada gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı t-test analizi yapılarak tespit edilmiştir. Yine aynı şekilde ekzozomların hücre canlılığına, migrasyonuna ve oksitadif strese olan etkilerin tespit edilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların istatistiksel anlamlılığı t-test kullanılarak değerlendirilmiştir. CAM analizde elde edilen % damar yoğunluğu verilerinin gruplar arasındaki anlamlılığı da t-test kullanılarak tespit edilmiştir. Tüm analizler ve grafikler GraphPad Prism (versiyon 6.1) programı kullanılarak yapılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bölüm 1’de bahsedildiği üzere hücrelerin parakrin etkilerinin araştırılması ve ekzozomların hücre bilgisini taşıyıcı rollerinin açıklanmasıyla birlikte rejeneratif tıp uygulamalarında önemli bir aktör haline gelmiştir. Kök hücre terapisi ile karşılaştırıldığında ise ekzozomların en az hücreler kadar terapötik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ekzozomların; inflamasyon, anjiyogenez, kollajen birikimi, granül doku oluşumu ve epitelizasyon olmak üzere yara iyileşmesinin her fazında etkili olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında rt-MKH’lerden izole edilen ekzozomlar jelatin süngerlere yüklenerek biyolojik etkinlikleri araştırılmıştır. Ekzozom kaynağı olarak çoğunlukla kök hücreler ön plana çıkmaktadır. Günümüze kadar yapılan 200’e yakın pre-klinik çalışma dikkate alındığında, yapılan çalışmaların %51’inde kemik iliği, %23’ünde umbilikal/plasenta ve %13 yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kullanıldığı görülmektedir [158]. Bu nedenle bu çalışmada ekzozomların kemik iliği kaynaklı MKH’lerden izole edilmesi planlanmıştır.

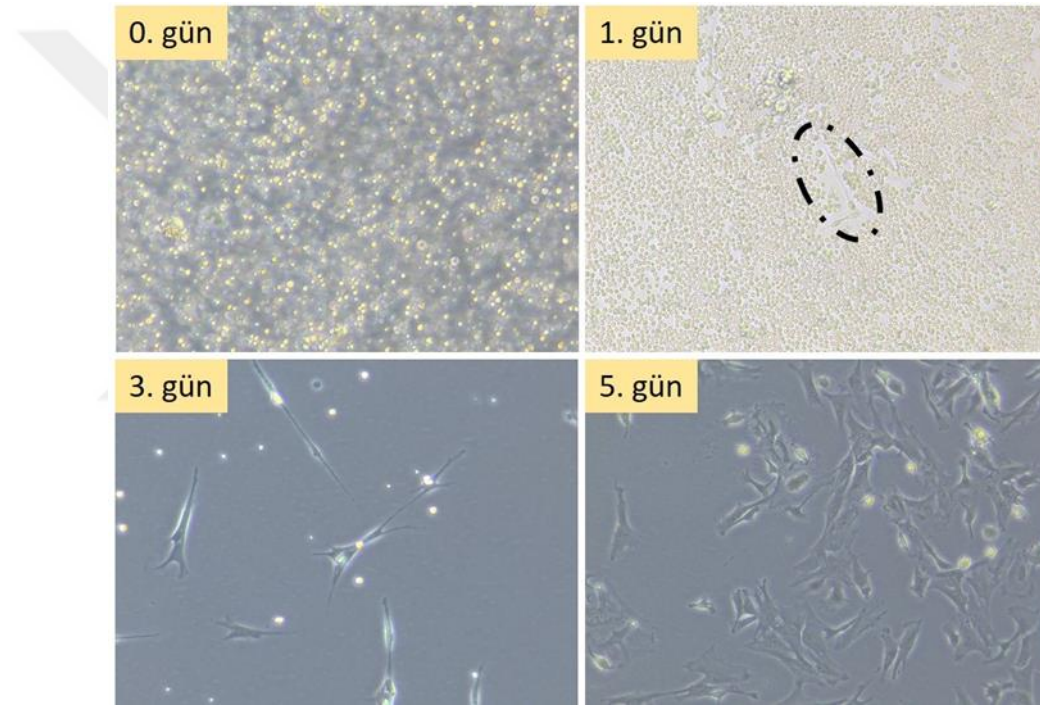
Bu kapsamda; i. rt-MKH’lerden ekzozomların izolasyonu ve izolasyonda etkili parametreler, ii. izole edilen ekzozomların özellikleri, iii. ekzozomların biyolojik fonksiyonları, iv. ekzozom yüklü jelatin süngerlerin biyolojik aktivitelerinin serbest ekzozomlar ile karşılaştırılması ile ilgili sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.1. Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (rt-MKH) ve Farklılaşma Yetenekleri

rt-MKH’ler, 3-8 haftalık Wistar cinsi erkek sıçanların tibia ve femur kemikleri kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen hücrelerin kök hücre özellikleri kültür kabına tutunabilme ve multipotent farklılaşma yetilerine bakılarak araştırılmıştır. Bu amaçla kemik iliği kültür ortamı ile toplanıp yıkandıktan sonra kültür kabına alınmış ve zamana bağlı olarak hücre davranışı ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Kültürün 0. gününde kültür ortamında yuvarlak morfolojide tutunmayan hücre varlığının baskın olduğu, 24 saat sonra kültürde tutunan hücrelerin olduğu ve bu hücrelerin iğsi morfoloji sergiledikleri gözlemlenmiştir. Kültürün 5. gününde hücrelerin kültürde yayılarak multipolar morfoloji kazandıkları ve çoğaldıkları gözlemlenmiştir [159] (Şekil 4.1).

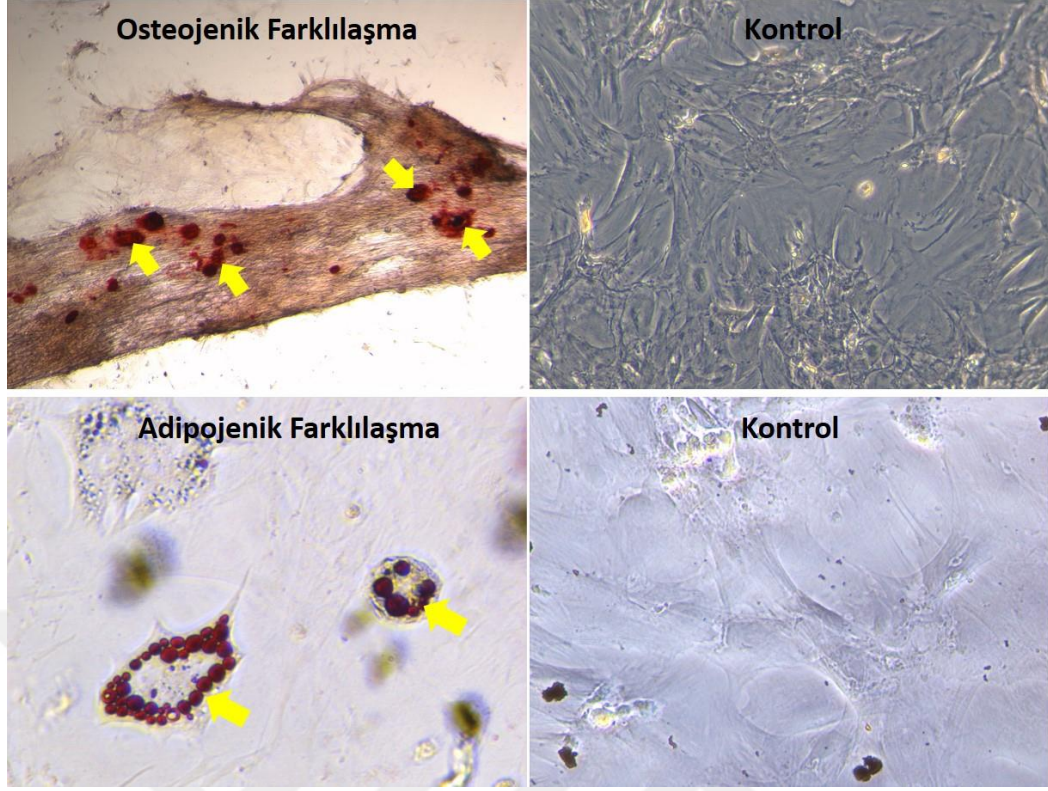
Kültür kabının yüzeyine tutunup multipolar morfoloji gösteren bu hücrelerin osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyellerine sahip olup olmadıkları araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Sıçan kemik iliğinden izole edilen hücrelerin zamana bağlı olarak gösterdikleri davranış (Siyah halka içerisinde kültür kabının yüzeyine tutunankemik iliği kök hücresi gösterilmiştir).

Kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin uygun indükleyici ajan varlığında farklı multipotent hatlara farklılaştığı ifade edilmiştir [160-162]. Yapılan çalışmada rt-MKH'lerin multipotent farklılaşma potansiyelini tespit etmek amacıyla pasaj 3 seviyesindeki hücreler 21 gün boyunca osteojenik ve adipojenik farklılaşmayı indükleyici ajanlara maruz bırakılmıştır. Alizarin Red S ve Oil Red O teknikleri sırasıyla osteojenik ve adipojenik farklılaşmanın tespit edilmesi için uygulanmıştır.

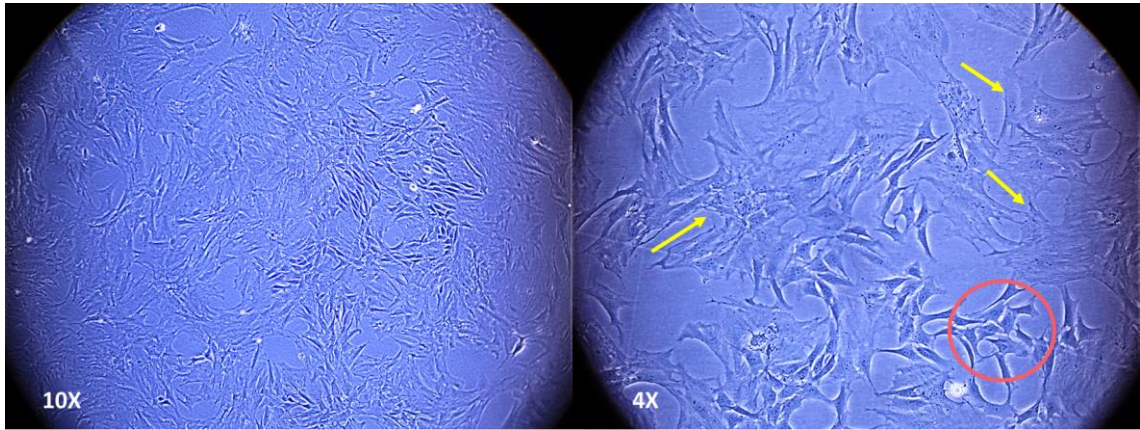
Alizarin Red S boyama sonuçları kök hücrelerin kemik doku hücrelerine farklılaşabilme yetisine sahip olduklarını göstermiştir. Kontrol grubunda ise mineralizasyonu işaret eden alizarin boyanmasına rastlanmamıştır. Hücre morfolojileri bakımından kontrol grubu ile kıyaslandığında, farklılaşma ortamı ile inkübe edilen hücrelerin bir araya gelerek hücre agregatları oluşturdukları görülmüştür. Oluşan bu yapılarda kemik doku hücrelerine farklılaşmanın belirteci olan kalsiyum depolarının olduğu ve oluşan bu yapıların Alizarin Red boyası ile reaksiyona girerek kırmızı boyandığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda kalsiyum depolarına rastlanmamıştır (Şekil 4.2). Mikroskopik gözlemler, kontrol grubu ile kıyaslandığında deney gruplarında lipit vakuollerinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca kontrol ile kıyaslandığında çalışma gruplarında zamanla hücre farklılaşmasını takiben fibroblastik morfolojiden küresel morfolojiye sahip hücre sayısının arttığı ve bu morfolojiye sahip hücre grubunda hücre içi lipit damlacıklarının olduğu gözlemlenmiştir. Oluşan bu lipit vakuollerinin hücrenin sitoplazmasına dağıldıkları ve büyüklük bakımından heterojen bir yapıya sahip oldukları anlaşılmıştır. Yapılan Oil Red O boyaması ile hücre sitoplazmasında oluşan yağ damlacıkları kırmızı renge boyanmıştır. Kontrol grubunda ise boyamanın gerçekleşmediği tespit edilmiştir [163, 164] (Şekil 4.2). Tüm bu sonuçlar sıçan kemik iliğinden izole edilen hücrelerin kök hücre özellikleri taşıdığını göstermiştir.



Şekil 4.2. rt-MKH'lerin farklı hücre tiplerine farklılaşabilme kabiliyeti. Osteojenik farklılaşma Alizarin Kırmızısı ve adipojenik farklılaşma Oil Kırmızısı ile tespit edilmiştir. (Sarı oklar farklılaşan hücrelerde biriken kalsiyum nodüllerini ve yağ damlacıklarını göstermektedir. Kontrol grubunda pozitif boyama gözlemlenmemiştir).

Bu çalışmada ekzozom izolasyonu yapmak amacıyla farklı zamanlarda farklı donörler kullanılarak kemik iliği kök hücreleri izolasyonu yapılmıştır. Bu izolasyonlar seri-1, seri-2 ve seri-3 olarak isimlendirilmiş ve her seride toplam 3 adet donörden femur ve tibia kemikleri elde edilmiş ve Bölüm 3.2.1'de detayları verilen izolasyon prosedürü kullanılarak hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Seri-1'de kullanılan donörler 8 haftalık, seri-2'de kullanılan donörler 5 haftalık ve seri-3'te kullanılan donörler ise 3 haftalıktır. Yapılan mikroskopik gözlemlerde 3 farklı seriden izole edilen hücrelerin benzer tutunma ve morfolojik özellik gösterdiği seri-2 ve seri-3'ten izole edilen hücrelerin çoğalma hızlarının seri-1'de izole edilen hücrelere göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. İzole edilen hücrelerin çoğalma hızlarındaki bu farklılığın kullanılan donörün yaşı ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte, özellikle seri-2 ve seri-3 de izole edilen hücrelerin alt kültürleme işlemi ile pasaj 4 seviyesine getirildiklerinde bile küçük ve multipolar morfolojiye sahip hücre yoğunluğunun baskın olduğu gözlemlenmiştir. Seri-1’de ise kültür kabının yüzeyine tutunarak yayılan ve daha büyük bipolar, çarşaf benzeri morfoloji gösteren hücre popülasyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Tespit edilen farklılıkların donörün yaşı ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Ancak bu durumu etkileyen kültür koşulları, donör etkisi gibi birçok farklı faktör bulunmaktadır [159, 165].



Şekil 4.3. Sıçan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin morfolojik görünümü. (Sarı oklar ile olgunlaşmış ve çarşaf morfolojisi kazanmış hücreler gösterilirken kırmızı halka içerisinde yeni çoğalan hücreler gösterilmektedir).

4.2. Ekzozom İzolasyonu ve Verimini Etkileyen Parametreler

Ultrasantrifüj, basitçe belli bir merkezkaç kuvveti altında yoğunluk ve boyuta göre partiküllerin ayrıştırılmasını sağlamakta olup ekzozom alanında yapılan öncü çalışmalarda tercih edilen yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır [29]. Son yapılan meta analizler 2002-2022 yılları arasında yayınlanmış olan yayınların %46’sında ultrasantrifüj metodunun kullanıldığı rapor edilmiştir [166]. Dolayısıyla bu çalışmada sıçan kemik iliğinden izole edilip karakterize edilen MKH’lerden ekzozomların izole edilmesi amacıyla sıkça kullanılan ultrasantrifüj yöntemi kullanılmıştır.

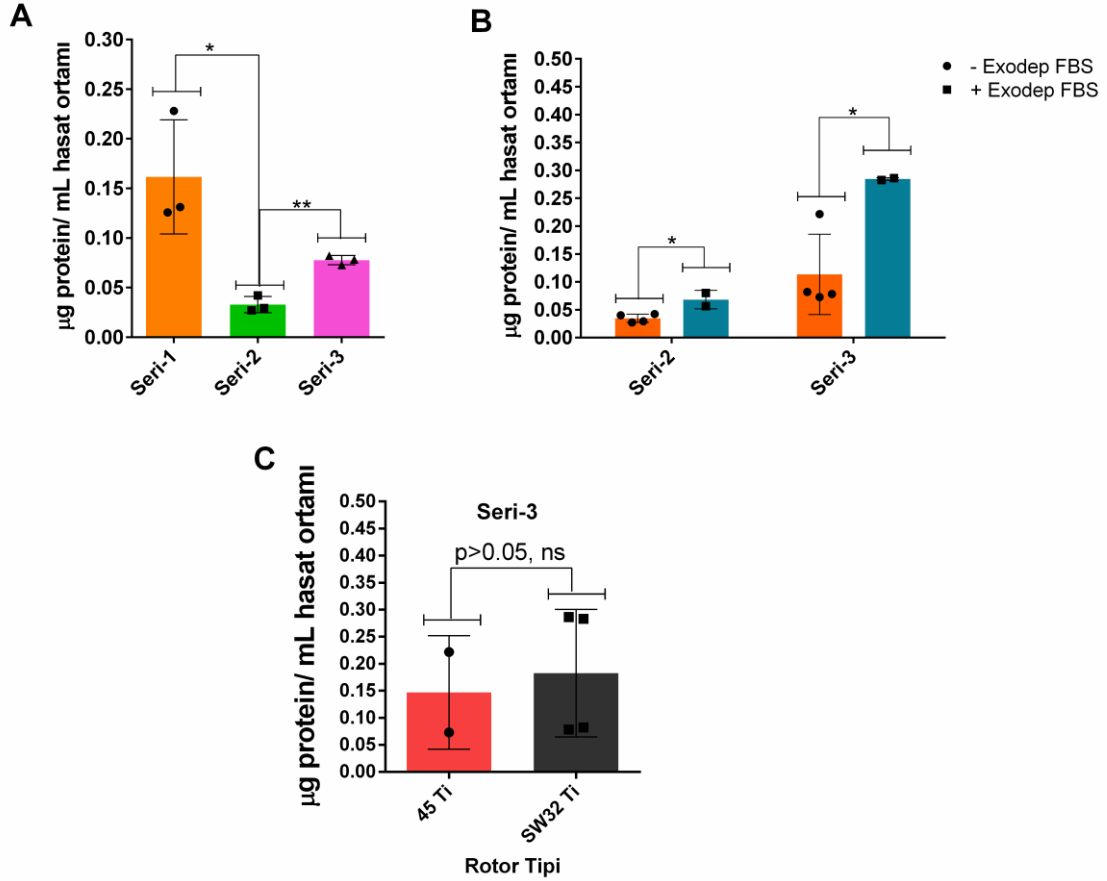
rt-MKH'lerden ekzozomların izolasyon verimini etkileyen unsurların araştırılması amacıyla farklı donörlerden izole edilen hücreler, hücre kültür koşulları ve rotor tipi olmak üzere 3 farklı parametre test edilmiştir. İlk olarak farklı yaş aralıklarına sahip donörlerden izole edilen rt-MKH'ler (seri-1, seri-2 ve seri-3) aynı kültür koşullarında P4 seviyesine getirilerek 48 saat boyunca serum içermeyen besi ortamında kültüre edilmiştir. 48 saat sonunda elde edilen süpernatant ortamından ekzozomlar izole edilmiş ve BCA analizi yapılarak μL ortam başına elde edilen μg protein hesaplanıp grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen sonuçlar donör kaynağının elde edilen ekzozom verimine doğrudan etki ettiğini göstermiştir. Yapılan analizler, seri-1, seri-2 ve seri-3 gruplarında ekzozom veriminin sırasıyla 0,161, 0,033 ve 0,078 μg protein/ μL olduğunu göstermiştir. İstatistiksel analiz, ekzozom verimi açısından kıyaslandığında seri-2 grubunda elde edilen verimin diğer iki gruba göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu ($p < 0,05$) ancak seri-1 ve seri-3 arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.4A). Bölüm 4.1'de belirtildiği üzere, seri-1 grubunda kullanılan donörlerin yaşı 8 haftalık iken seri-2 ve seri-3 gruplarında kullanılan donörlerin yaşı sırasıyla 5 ve 3 haftalıktır. Elde edilen sonuçlara göre donör yaşı ekzozom veriminde farklılıklara neden olmuş, 8 haftalık sıçanlardan izole edilen hücrelerin kullanıldığı çalışmada en yüksek ekzozom verimi elde edilmiştir. 2 aylık sıçanların yetişkin yaşa ermiş sıçan oldukları ve önemli sistemlerin olgunluğa ulaştığı rapor edilmiştir [167]. Dolayısı ile 2 aylık donörlerden izole edilen kök hücrelerin daha yüksek miktarda ekzozom üretmesi, donörün kemik iliği üretim fizyolojisinin genç olan (5 ve/veya 3 haftalık) donörlere göre daha olgun olduğu ve bu durumun da izole edilen hücrelerin biyolojik aktivitelerine yansıdığı düşünülmektedir. Literatürde gerek insan kaynaklı gerek sıçan kaynaklı kök hücrelerin farklılaşma ve çoğalma gibi davranışların donörün yaşı ile doğrudan ilintili olduğu, genç donörlerden izole edilen hücrelerin farklılaşma ve çoğalma kabiliyetlerinin yaşlı olan donörlerden izole edilen hücrelere göre daha fazla oldukları raporlanmıştır [168-170].

Tez kapsamında donör ve donör yaşının ekzozom verimine olan etkisinin yanında kültür koşullarının etkili olup olmadığı test edilmiştir. Bu amaçla kültür ortamı bileşenlerinden biri olan serumun varlığının etkisi araştırılmıştır. Seri-2 ve 3 gruplarından izole edilen kök hücreler P4 seviyesine geldiğinde serumsuz veya %10 ekzozomlarından arındırılmış serum (Exodep FBS) içeren hasat ortamında 48 saat kültüre edilmiş ve ekzozom izolasyonu yapılmıştır.

Serum varlığının ekzozom verimine olan etkisinin tespit edilmesi amacıyla BCA yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil.4.4B’de gösterilmiştir. Yapılan analiz sonucunda serum varlığının ekzozom verimini etkileyen oldukça önemli bir parametre olduğunu, serum varlığında anlamlı düzeyde yüksek miktarda ekzozom elde edildiğini göstermiştir ($p<0,05$). Ayrıca bu artışın kullanılan hücre kaynağından bağımsız olduğu, hem seri-2 hem de seri-3 gruplarında serum varlığında anlamlı düzeyde yüksek miktarda ekzozom elde edildiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin tutunması ve çoğalması için gerekli protein, sitokin ve hormonları içinde barındıran FBS, kültür ortamların oldukça kritik olan bir bileşenidir [171]. Ancak FBS’in yüksek miktarda ekzozom içermesi önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır [172]. Dolayısı ile kök hücre kaynaklı ekzozomların elde edilme aşamasında ultrasantrifüj temelli protokoller geliştirerek ekzozomlarından arındırılmış FBS veya kültür ortamı kullanmakta [173, 174] ya da serumsuz besi ortamı kullanılmaktadır. FBS içeren ortamda uygun sayıya getirilen hücrelerden ekzozomların elde edilmesi aşamasında serum içermeyen kültür ortamında kültür edildiklerinde, kültür koşulları değişmekte ve hücreler yoğun bir strese maruz kalmaktadır. Bu durum hücre çoğalma hızı ve karakterlerinde değişimler meydana getirmektedir. Dolayısı ile ekzozom verimini ve izole edilen ekzozomların özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [175-178]. Gudbergsson ve ark. yaptıkları sistematik çalışmada hasat aşamasında serumsuz ortam kullanılarak yapılan çalışmalarda, 10^6 hücre başına elde edilen protein miktarının 1.198 μg , ekzozomlarından temizlenmiş FBS (Exodep FBS) kullanılan çalışmalarda ise bu miktarın artarak 3.492 μg olduğunu raporlamışlardır [177]. Yine başka bir çalışmada, araştırmacılar göbek bağı, yağ doku ve kemik iliği kaynaklı MKH’leri 24 saat boyunca serumsuz ortamda kültüre ederek kültür koşullarının ekzozom verimine ve biyolojik fonksiyonlarına olan etkilerini araştırmışlardır. Yapılan analizler, serumsuz ortamda yapılan 24 saatlik kültürün kordon kanı MKH’lerin ekzozom salım verimini etkilemediğini ancak yağ doku kaynaklı MKH’lerde 6, kemik iliği kaynaklı MKH’lerde ise 10 katlık bir azalma meydana geldiğini göstermiştir. Ancak serum yoksunluğunun izole edilen ekzozomların aktivitesini artırarak protein içeriğini değiştirdiği de bulgularla desteklenmiştir [179]. Bu çalışmada da elde edilen veriler literatür ile uyumlu olup, hücre kaynağından bağımsız olarak hasat ortamında ekzozomlarından arınmış FBS’in kullanılmasının kültür koşullarını iyileştirerek ekzozom veriminin yükselmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Ancak elde edilen ekzozomların biyolojik aktivitelerine serum varlığının etkisi test edilmesi gerektiği vurgulanmalıdır.

İzolasyon verimini etkileyen diğer parametreler ise kullanılan rotor tipi, rotorun minimum ve maksimum çapı, g kuvveti, sedimentasyon yolu, sıcaklık, hasat ortamının vizkozitesi ve döndürme süresidir [180, 181]. Cvjetkovic ve ark. yaptıkları çalışmada rotor tipinin ve döndürme süresinin ekzozomların izolasyon verimine olan etkilerini araştırmış ve elde edilen veriler döndürme süresi artıkça izole edilen ekzozom miktarının arttığını ve açılan rotor kullanıldığında elde edilen protein/RNA oranının sabit açılı rotora göre anlamlı olarak arttığını göstermiştir [182]. Bu çalışmada da rotor tipinin ekzozom verimine etkisi incelenmiş ve kullanılan hücre tipi, döndürme zamanı, sıcaklığı ve ekzozomların yıkanması aşamasında kullanılan rotor tipi sabit tutularak sabit açılı (45 Tİ) ve açılan rotorlar (SW32 Ti) test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, açılan rotor kullanıldığında elde edilen ortalama protein miktarının sabit açılı rotor kullanıldığında elde edilen protein miktarına göre 1,23 kat daha fazla olduğunu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir ($p>0,05$) (Şekil.4.4C). Sabit açılı rotorlarla kıyaslandığında, açılan rotorların daha uzun bir sedimentasyon yolu uzunluğu ("*sedimentation path length*") bulunmaktadır. Bu durum, açılan rotorların kullanımını sedimentasyon kat sayısı benzer olan partiküllerin çöktürülmesi işleminde avantajlı hale getirmektedir. Diğer yandan sabit açılı rotorlar, sedimentasyon kat sayısı farklı olan partiküllerin çöktürülmesi için önerilmektedir [182, 183]. Yapılan çalışmada rotor tipinin ekzozom izolasyonunun kolay ve hızlı yapılabilmesinde de etkili olduğu tecrübe edilmiştir. 45 Ti rotorun en önemli avantajı SW32 Ti rotoruna göre tek seferde 2,3 kat daha fazla hasat ortamından izolasyon yapmaya imkan vermesidir. Ancak işlemin kolay ve hızlı yapılabilmesi bakımından karşılaştırıldığında SW32 Ti rotorunun önemli avantajları olduğu gözlemlenmiştir. 45 Ti rotorunda kullanılan tüplerin kapaklarının tasarımı kullanıcı kaynaklı hatalara imkan sağlarken, SW32 Ti rotorunda kullanıcı kaynaklı hatalar, kapak tasarımı ile minimize edilmiştir. Bu durum izolasyon için harcanan zamanı azaltarak izolasyon hızını artırmakta ve lotlar arasında izolasyon verimi bakımından standart sapmayı minimize etmektedir. Bununla birlikte sabit açılı rotorda ekzozomlar tüplerin yan duvarlarında yayılarak birikmekte, ancak açılan rotorda tasarım nedeniyle tüpün yanal yüzeylerine yayılmadan tüplerin dibinde birikmektedir [182, 183]. Bu durumun açılan rotorların diğer önemli bir avantajı olduğu gözlemlenmiştir. Sabit açılı rotorda kullanılan tüplerin yanal yüzeylerin geniş olması, ekzozomların çökmesi için daha geniş bir alanın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu da ekzozomların toplanmasını zorlaştırarak ekzozom kaybını azaltmaktadır. Ancak açılan rotorda ise ekzozomlar tüpün dibine çöktükleri için daha kolay, hızlı ve minimum kayıpla ekzozomlar toplanmaktadır.

Tüm bu veriler ekzozom veriminde açılan rotorun (SW32 Ti), sabit açılı rotora göre (45 Ti) daha stabil bir rotor olduğu sonucuna varmamızı sağlamış ve devam eden çalışmalarda açılan rotorun kullanılması planlanmıştır.



Şekil 4.4. Ekzozom izolasyon verimini etkileyen parametreler: A) Farklı hücre kaynaklarının, B) Serum etkisinin ve C) Rotor tipinin etkisi. Ekzozomlarından arındırılmış serum Exodep FBS olarak isimlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı t-test yapılarak tespit edilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ifade etmektedir. ns: anlamlı değil.

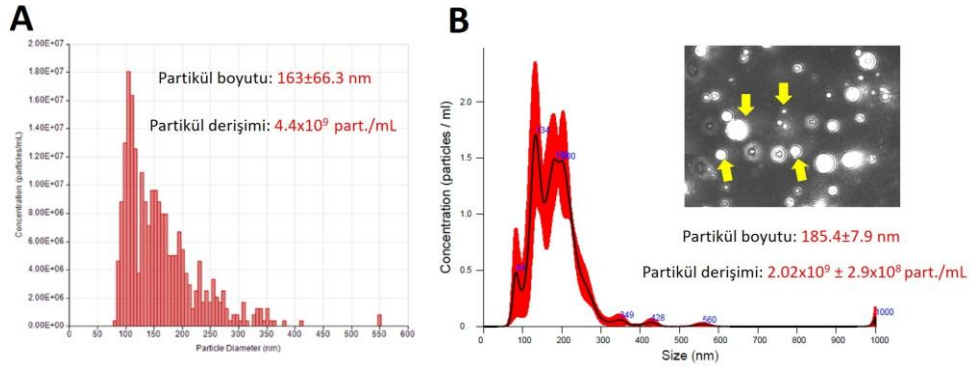
4.3. Ekzozomların Özellikleri

4.3.1. Partikül Boyutu ve Sayısı

rt-MKH'lerden ultrasantrifüj yöntemi ile izole edilen ekzozomların partikül boyutu ve sayısı qNano® ve NTA analiz yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Yapılan analizler, izole edilen partiküllerin boyut bakımından ekzozom özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir.

qNano® ve NTA analizleri 3 farklı lottan elde edilen partiküllerin ortalama boyutunun sırasıyla 159,4 ve 182,8 nm olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde ortalama partikül konsantrasyonu sırasıyla $2,4 \times 10^9$ ve $1,63 \times 10^9$ partikül/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Ekzozom boyutu tayini için yapılan qNano® ve NTA analiz sonuçları izole edilen partiküllerin ekzozom boyutlarında olduğunu göstermektedir [91]. Ancak elde edilen sonuçlar partikül boyutu ve derişimi açısından kullanılan yöntemle bağılı olarak farklı sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. qNano® yöntemi kullanıldığında partikül boyutu, NTA analizine göre daha küçük elde edilmiştir. van der Pol ve ark. yaptıkları çalışmada TEM, akış sitometrisi, NTA ve qNano® yöntemlerini ekzozomların ve mikroveziküllerin partikül boyutu ve konsantrasyonu açısından karşılaştırmışlardır. Elde edilen veriler her yöntemin farklı sonuçlar verdiğini göstermiştir. Araştırmacılar bunun temel sebebi olarak ölçülebilen minimum partikül boyutunun akış sitometrisi, NTA ve qNano® yöntemlerinde farklı olması şeklinde açıklamışlardır [184]. Bu çalışmada da qNano® ve NTA analizde farklı ekzozom boyutu elde edilmesinin nedeninin NTA ve qNano®'nin çalışma prensiplerinin farklı olmasıdır.

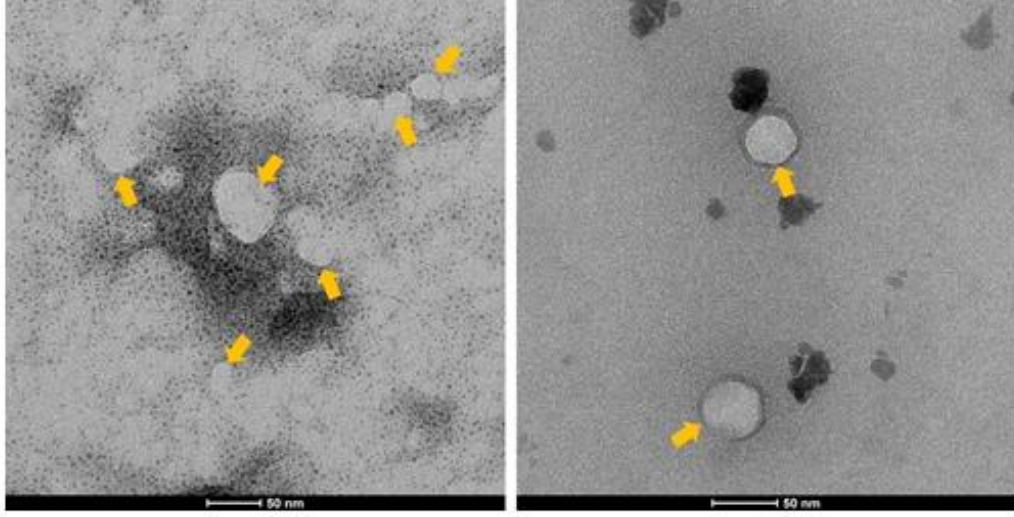


Şekil 4.5. A) qNano® B) NTA sonuçlarına göre partikül boyutlarının dağılımı ve partikül derişimi. Sarı oklar NTA analizi esnasında mikroskoptan alınan görüntüde gözlemlenen ekzozomları göstermektedir.

Partikül sayısı kültür şartlarına, izolasyon yöntemlerine göre değişiklik göstermektedir. Standart koşullar altında partikül sayısı yaklaşık 10^8 - 10^9 civarında olmaktadır. Bu çalışmada da elde edilen partikül sayısı 10^9 seviyesinde bulunmuştur. Ancak rejeneratif tıp uygulamalarında yüksek sayıda ekzozom ihtiyacı olduğu düşünüldüğünde rt-MKH kaynaklı ekzozomların partikül sayısı bakımından veriminin artırılması için kültür koşullarının iyileştirilmesi gerektiği vurgulanmalıdır. Nitekim, Nizamudeen ve ark. yaptıkları çalışmada ekzozom zenginleştirici besi ortamı kullanarak kültüre ettikleri MKH'lerden 10^{10} civarında partikül elde etmişlerdir [185, 186]. Ancak partikül sayılarının karşılaştırılabilmesi için kültür şartlarının yanında izolasyon yapılan hücre sayısı, hücrelerin pasaj sayısı ve izolasyon yapılan besi ortamı miktarlarının biliniyor olması gerekmektedir. Partikül sayısı açısından verim analizi aynı koşullar altında farklı gruplardan elde edilen ekzozomlar arasında yapılabilir.

4.3.2. Ekzozom Morfolojisi

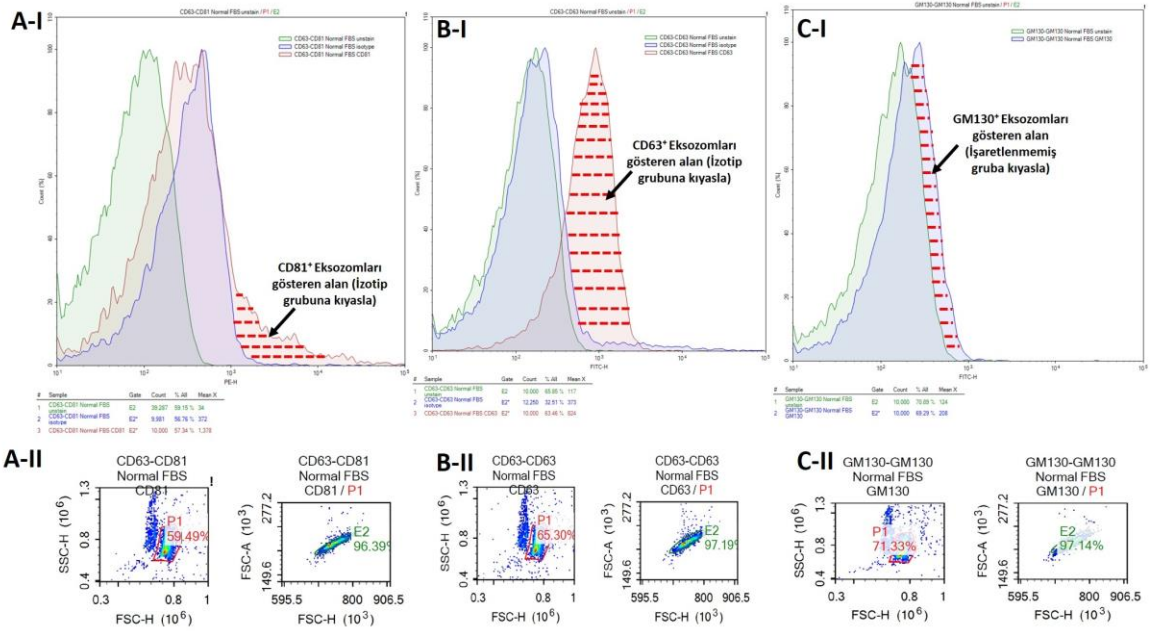
TEM analizi sonucunda elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 4.6'da sunulmuştur. Ekzozomların küresel formda ve disk şeklinde olduğu görülmektedir. Dış çeperlerindeki lipid tabakası da ayırt edilebilmekte olup bu sonuç literatür ile uyumlu bulunmuştur [187, 188]. TEM analizinde elde edilen görüntülerde yer alan 35 adet partikülün Image J programı kullanılarak boyut analizi yapılmış ve partikül boyutlarının ortalama 68 ± 47 nm olduğu tespit edilmiştir. TEM analizinde protokol gereği su kaybı ve büzülme meydana gelmesi nedeniyle ekzozom boyutları küçük bulunmuştur [48]. Dolayısıyla qNano® ve NTA sonuçları ile TEM sonuçları arasında görülen boyut farkı ekzozomların TEM protokolünde uygulanan kurutma işleminden dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ancak TEM görüntüleri izole edilen partiküllerin ekzozom morfolojisine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca partiküller tek tek ayırt edilebilmektedir. Bu da ekzozomların zar yapısının bozulmadığını ve agregasyon olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.6. rt-MKH kaynaklı ekzozomların TEM görüntüleri.

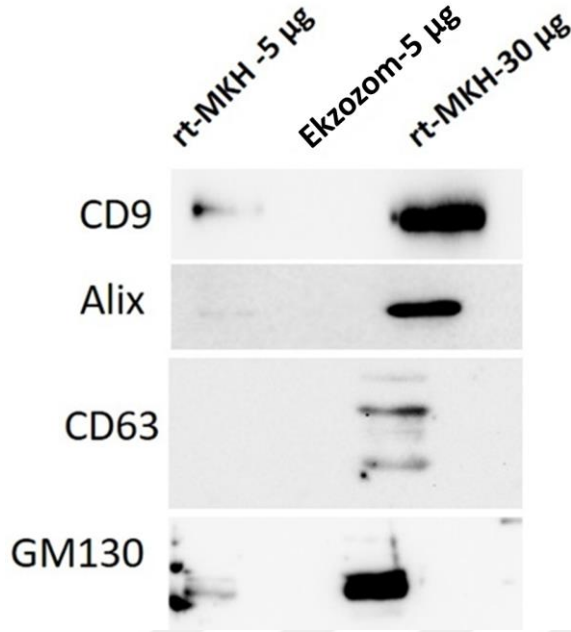
4.3.3. Ekzozomların Fenotipik Özellikleri

rt-MKH kaynaklı ekzozomların fenotipik karakterizasyonlarının yapılması, izole edilen partiküllerin ekzozom olduklarının kanıtlanması açısından kritik öneme sahiptir. Dolayısı ile bu çalışmada %10 FBS içeren serum ile pasaj 4 seviyesine getirilip ekzozomların elde edilmesi aşamasında 48 saat boyunca serum açlığına maruz bırakılan rt-MKH'lerden izole edilen eksozomlar akış sitometrisi ile CD81, CD63 ve GM130 belirteçleri ifadesi bakımından karakterize edilmiştir. Akış sitometri sonuçları izole edilen partiküllerin CD81 ve CD63 proteinlerini ifade ettiğini, GM130 ise düşük düzeyde pozitif olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7). Bu sonuçlar izolasyonu yapılan partiküllerin ekzozomların fenotipik karakter gösterdiğini kanıtlamaktadır. GM130 golgi belirteci olup, ekzozomlarda negatif olması beklenmektedir [189]. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda GM130 ifadesi daha çok western blot analizi ile tespit edilmiştir [190-192]. Dolayısı ile bu çalışmada izole edilen ekzozomlarda düşük miktarda da olsa GM130 ifadesinin tespit edilmiş olması kullanılan analiz metodu kaynaklı olabileceği şeklinde değerlendirilmektedir.



Şekil 4.7. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden izole edilen ekzozomların akış sitometri analizi. A-I) CD81, B-I) CD63 ve C-I) GM130 belirteçleri ile elde edilen grafikler. A-II) CD81, B-II) CD63 ve C-II) GM130 belirteçlerinin analizi için sınırları belirlenip çizilen kapılar.

Akış sitometrisi ile yapılan rt-MKH kaynaklı ekzozomların fenotipik karakterizasyonlarının teyit edilmesi amacıyla CD9, CD63, Alix ve GM130 ifadelerine *western blot* analizi yapılarak bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’de verilmiştir. Analiz sonuçları ekzozom kaynağı olan rt-MKH’lerde CD9, CD63, Alix ve GM130 proteinlerinin ifade olduğunu, ancak ekzozomlarda ifade edilmediğini göstermiştir. Bunun temel sebebinin ekzozom örneklerinde membrana yüklenen protein miktarının düşük olmasıdır. Çünkü Şekil 4.8’de de görüldüğü üzere, rt-MKH için 5 µg protein yüklemesi yapıldığında belirgin bir sonuç alınmazken, protein miktarı 30 µg çıktığında sonuç alınmıştır. Literatürde yapılan çalışmalar ekzozomların izole edildiği hücrelerde ekzozom belirteçlerinin pozitif olduğunu raporlamıştır [142, 187]. Yapılan çalışmalar Alix ifadesinin rt-MKH’lerde daha belirgin ancak rt-MKH kaynaklı ekzozomlarda ise daha düşük miktarda ifade olduğunu raporlamıştır [189]. Dolayısı ile *western blot* analizinde başarılı sonuç alınabilmesi için protokol optimizasyonuna devam edilmesi ve ekzozomlar için de yüksek miktarda (>30 µg) protein kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak yapılan karakterizasyon çalışmaları rt-MKH’lerden izole edilen partiküllerin ekzozom özelliklerini, morfolojisini ve fenotipik özelliklerini taşıdığını, dolayısıyla ekzozom olarak nitelendirilebileceğini açık bir biçimde kanıtlar niteliktedir.



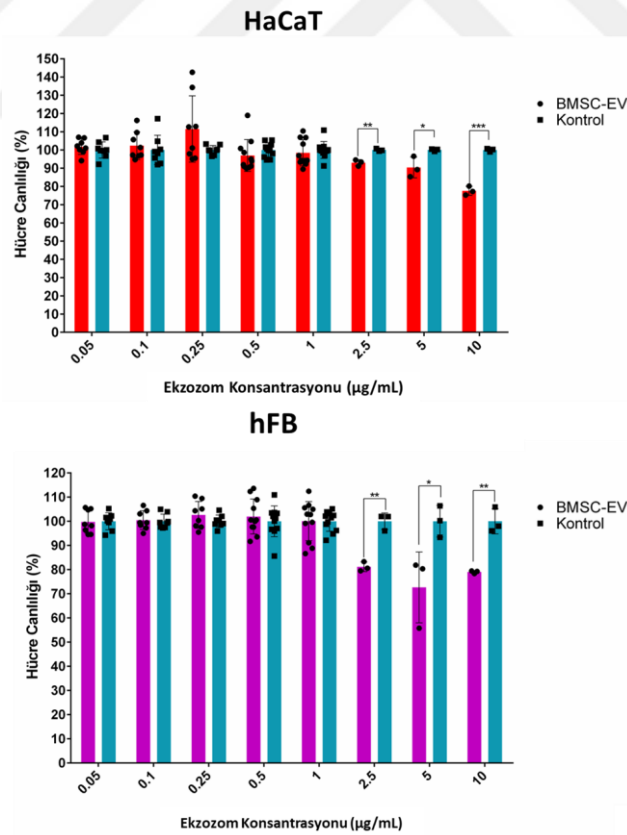
Şekil 4.8. rt-MKH ve izole edilen ekzozomların CD9, Alix, CD63 ve GM130 ifadesi

4.4. Ekzozomların Biyolojik Etkileri

4.4.1. Ekzozomların İnsan Fibroblast (hFB) ve Keratinosit (HaCaT) Hücre Proliferasyonuna Etkisi

rt-MKH kaynaklı ekzozomların insan kaynaklı deri fibroblast ve keratinosit hücrelerinin canlılığına olan etkilerinin araştırılması amacıyla farklı hücrelere farklı dozlarda ekzozom uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’da verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, rt-MKH kaynaklı ekzozomların hücre tipine ve kullanılan doza bağlı olarak hücre canlılığını etkilediğini kanıtlar niteliktedir. 48 saat boyunca rt-MKH kaynaklı ekzozomlara maruz kalan HaCaT ve hFB hücrelerinde kontrol grubuna göre konsantrasyon artıkça hücre canlılığının düştüğü tespit edilmiştir. 0,25 ve 10 µg/mL ekzozom uygulandığında hücre canlılığı HaCaT hücrelerinde sırasıyla %111 ($p>0,05$) ve %77 ($p<0,05$) olarak hesaplanmıştır. hFB gruplarında ise aynı ekzozom gruplarında hücre canlılığı %102 ($p>0,05$) ve %79 ($p<0,05$) olarak hesaplanmıştır. Jiang ve ark. yaptıkları çalışmada HaCaT ve insan dermal fibroblast hücrelerine insan kaynaklı kemik iliği MKH’lerden izole ettikleri ekzozomları uygulamış (25 µg/mL) ve zamana bağlı olarak hücre canlılığının arttığını göstermişlerdir [24, 116]. Yukarıda da bahsedildiği üzere bu çalışmada HaCaT ve hFB hücrelerine 10 µg/mL rt-MKH kaynaklı ekzozom uygulandığında hücre canlılığının anlamlı düzeyde düştüğü tespit edilmiştir.

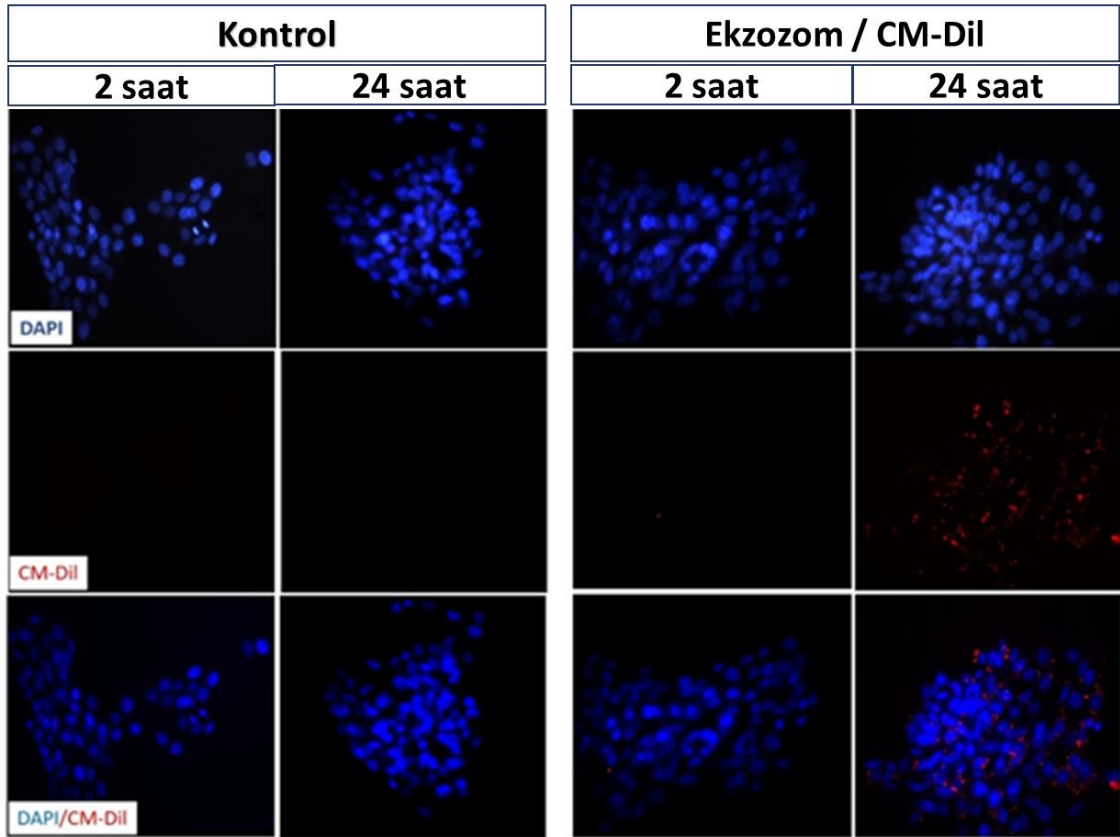
Bu durumun muhtemel nedeni olarak, kullanılan hücre kaynağı ve kültür koşullarının farklı olması olarak düşünülmüştür. Bu farklılıkların ekzozomların kargolarına dolayısıyla biyolojik aktivitelerine yansıdığı düşünülmektedir. Ancak bu hipotezlerin daha detaylı araştırmalar yaparak ortaya çıkarılması gerektiği vurgulanmalıdır. Bununla birlikte bu çalışmada elde edilen sonuçların literatür verileri ile uyuşmamasının diğer bir muhtemel nedeni ise literatürde yapılan çalışmalarda insan kaynaklı kök hücrelerden izole edilen ekzozomların yine insan kaynaklı hücrelere uygulanması olarak düşünülmektedir [24, 116]. Bu durumda sıçan kaynaklı kök hücrelerden izole edilen ekzozomlarda insan fibroblast ve keratinosit hücrelerinde hücre proliferasyon mekanizmalarını olumsuz yönde etkileyecek biyolojik moleküllerin olabileceği düşünülmüştür. Buna ek olarak elde edilen veriler farklı kaynaklardan elde edilen ekzozomların taşıdıkları kargolardaki farklılıklar nedeni ile etkin dozlarının değişebileceğini göstermiştir. Tüm bu hipotezlerin desteklenmesi için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlardaki ekzozomların HaCaT ve hFB hücrelerinin proliferasyonuna olan etkisi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ve *** $p < 0,001$ temsil etmektedir.

4.4.2. Ekzozomların Hücre İçine Alımı

Mikroskopik inceleme sonunda uygulanan protokol ile ekzozomların başarılı bir biçimde CM-Dil ile işaretlendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, rt-MKH kaynaklı ekzozomların epitel hücrelerine alımlarının zamana bağlı olarak gerçekleştiği anlaşılmıştır (Şekil 4.10). Ekzozomların epitel hücrelerine uygulanmasından 2 saat sonra yapılan mikroskopik gözlem ekzozomların hücre içine girmediğini ancak 24 saat sonra başarılı bir şekilde hücre içine girerek sitoplazmada lokalize olduklarını göstermektedir. Beklenildiği üzere kontrol grubunda spesifik boyama gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.10. rt-MKH kaynaklı ekzozomların zamana bağlı hücre içine alımı. 2 ve 24 saat sonunda floresan mikroskopta görüntüler alınmıştır. Hücre çekirdekleri mavi (DAPI), ekzozomlar ise kırmızı renkli görünmektedir.

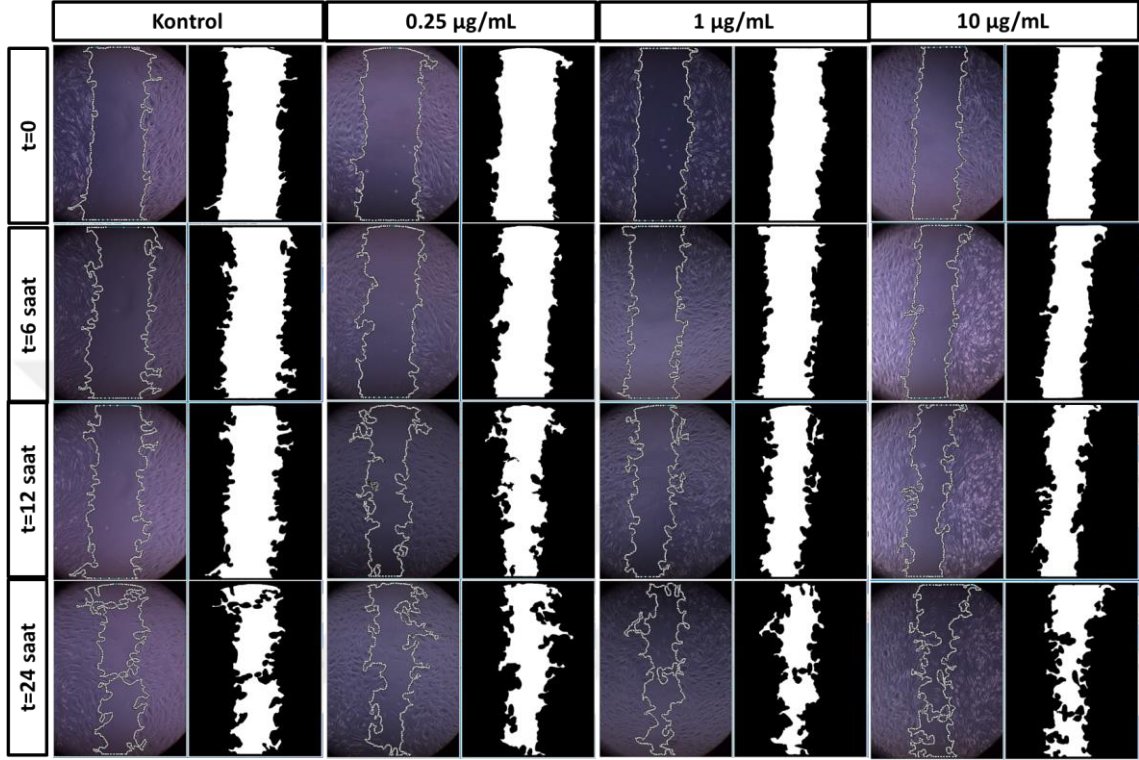
4.4.3. Ekzozomların Hücre Migrasyonuna Etkisi

Hücre göçü; hücrelerin bireysel, tabaka halinde veya kümeler halinde bir lokasyondan başka bir lokasyona hareket etmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Hücre tipine bağlı olarak hücre göçü bireysel veya toplu halde gerçekleşmektedir. Keratinosit hücreleri ve fibroblast hücreleri blok halinde göç etmektedir [193].

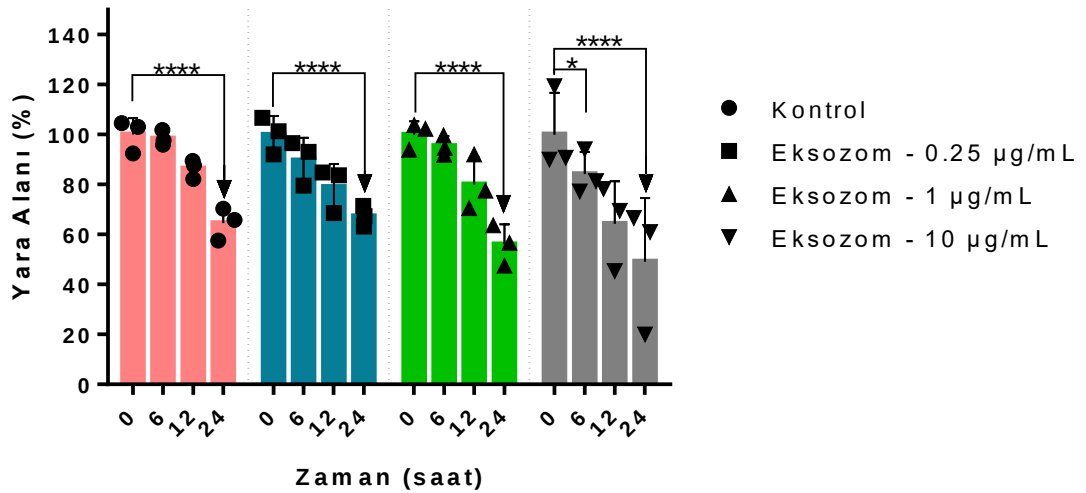
Bu davranış tipi yapılan migrasyon deneyinde de gözlemlenmiştir. Keratinosit ve fibroblast hücrelerinin iyileşme sürecine dahil olmaları bölgeye migrasyonları ile başlamaktadır. Özellikle küçük yaralarda keratinosit hücrelerinin göçü, çoğalmalarından daha kritik bir rol oynamaktadır. Bu hücreler ile beraber endotel hücreleri, melanositler ve diğer birçok deri hücresinin migrasyonu yara iyileşmesinde aktif rol almaktadır [193]. *in vitro* koşullarda hücrelerin migrasyon davranışı iyi tasarlanmış migrasyon deneyleri ile tayin edilebilir. Tek hücre migrasyon analizi ile migrasyon tayininin yapılabileceği veya blok halinde migrasyon ile yara kapanmasının taklit edilebileceği deney yöntemleri geliştirilmiştir. Blok halinde migrasyonun tayin edilebileceği çizik deneyi için keratinosit ve fibroblast hücreleri uygun davranışı göstermektedir.

Ekzozomların fibroblast ve keratinosit hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerine etkilerinin araştırıldığı çizik deneyinde üç farklı konsantrasyon (0,25, 1 ve 10 µg/mL) kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar hücre canlılığı çalışmalarında elde edilen sonuçlar baz alınarak tespit edilmiştir. Farklı zaman dilimlerinde (0., 6., 12. ve 24. saat) görüntüler alınarak çizik alanının kapanma süreci 24 saat boyunca takip edilmiştir. Yapılan analizler rt-MKH kaynaklı ekzozomların artan konsantrasyonda hücre migrasyonunu uyardığını, ancak hücre tipine bağlı olarak hücre göçü profilinin değiştiğini göstermiştir. Fibroblast hücrelerine üç farklı konsantrasyonda (0,25, 1 ve 10 µg/mL) ekzozom uygulandığında yara bölgesinde 24 saat sonunda, başlangıç alanına göre en yüksek kapanma oranı; %51 oranındaki azalma ile 10 µg/mL ekzozom uygulanan grupta hesaplanmıştır. En düşük kapanma ise %33 ile 0,25 µg/mL uygulanan grupta tespit edilmiştir. Bu değer 1 µg/mL ekzozom uygulanan ve kontrol gruplarda ise sırasıyla %44 ve %36 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11 ve 4.12). Keratinosit hücreleri ile yapılan çalışmalarda ise 24 saatin sonunda başlangıç alanına göre yara alanındaki en yüksek azalma %50 oranında kontrol grubunda, en düşük azalış ise 1 µg/mL ekzozom uygulanan grupta (%25) gerçekleşmiştir. 10 µg/mL ekzozom uygulanan grupta ise %40 azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13 ve 4.14). Elde edilen veriler literatür verileri ile uyusmaktadır. Hu ve ark. yaptıkları çalışmada adipoz kaynaklı MKH'lerden izole ettikleri ekzozomların fibroblast hücrelerinin migrasyon yeteneğini artan konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde arttırdığını tespit etmişlerdir [194]. Fibroblast hücrelerinin migrasyon yeteneğindeki artış 1 µg/mL ve üzeri ekzozom konsantrasyonlarında izlenmiştir. Ancak keratinosit hücreleri için uygulanan ekzozom konsantrasyonlarının hücre göçünü tetikleyemediği görülmüştür.

Artan konsantrasyona bağı farklılık göz önünde bulundurulduğunda daha yüksek konsantrasyonlarda ekzozom uygulaması ile keratinosit hücrelerinin migrasyon yeteneğinde artış görülebileceği düşünülmektedir.

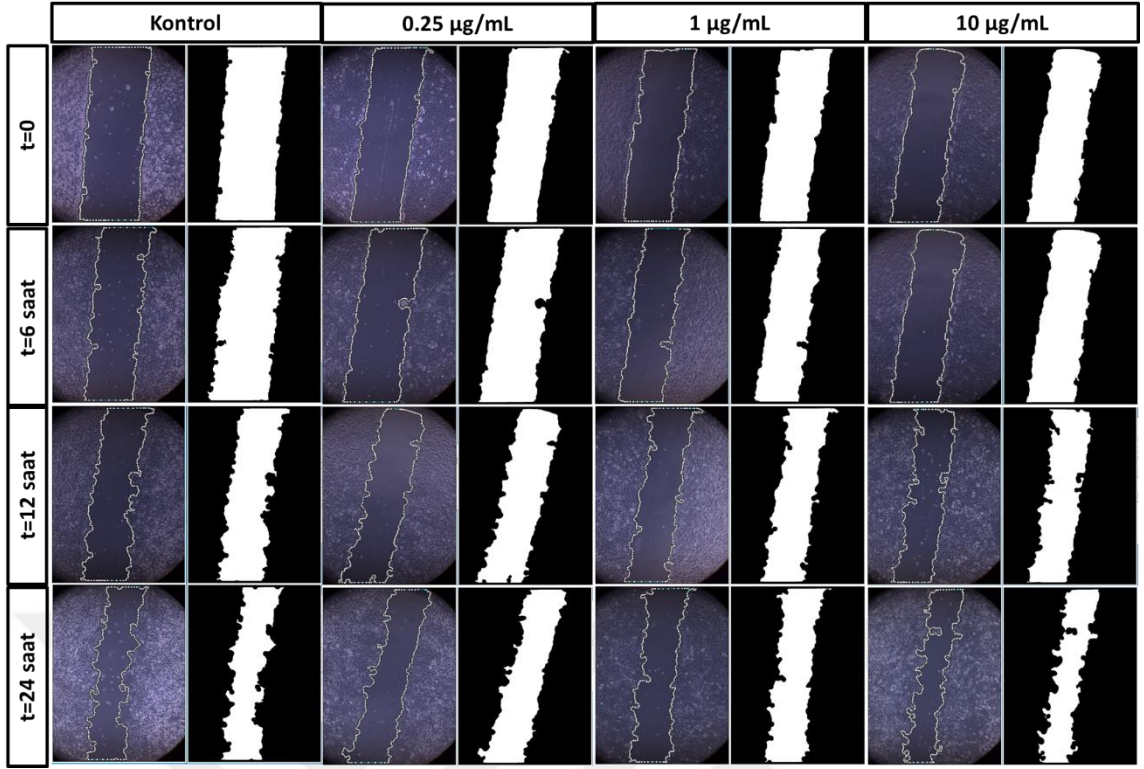


Şekil 4.11. rt-MKH kaynaklı ekzozomların hFB hücreleri üzerindeki migrasyon etkisi.

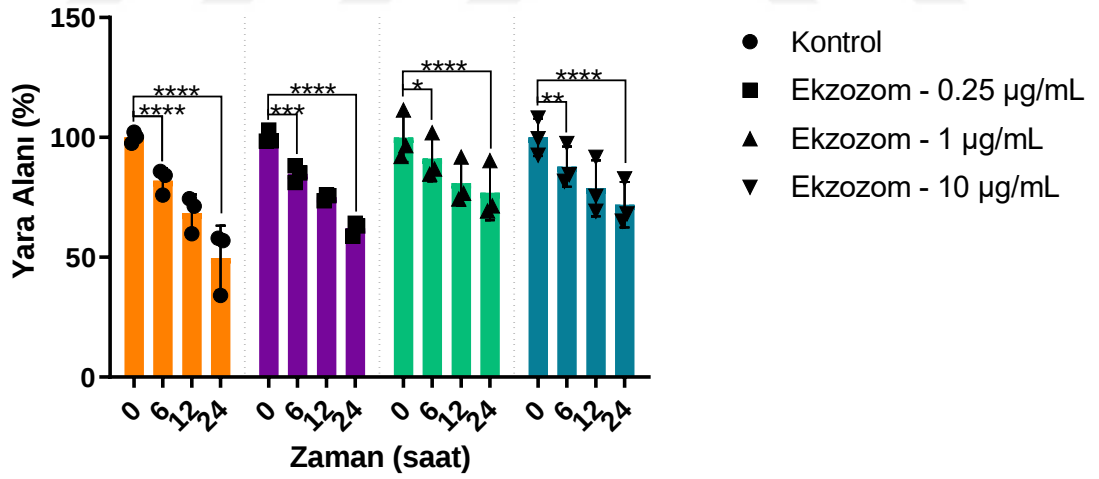


Şekil 4.12. rt-MKH kaynaklı ekzozomların hFB hücrelerinde yara kapanmasına etkisi.

* p<0,05, **** p<0.0001 temsil etmektedir.



Şekil 4.13. rt-MKH kaynaklı ekzozomların HaCaT hücreleri üzerindeki migrasyon etkisi.



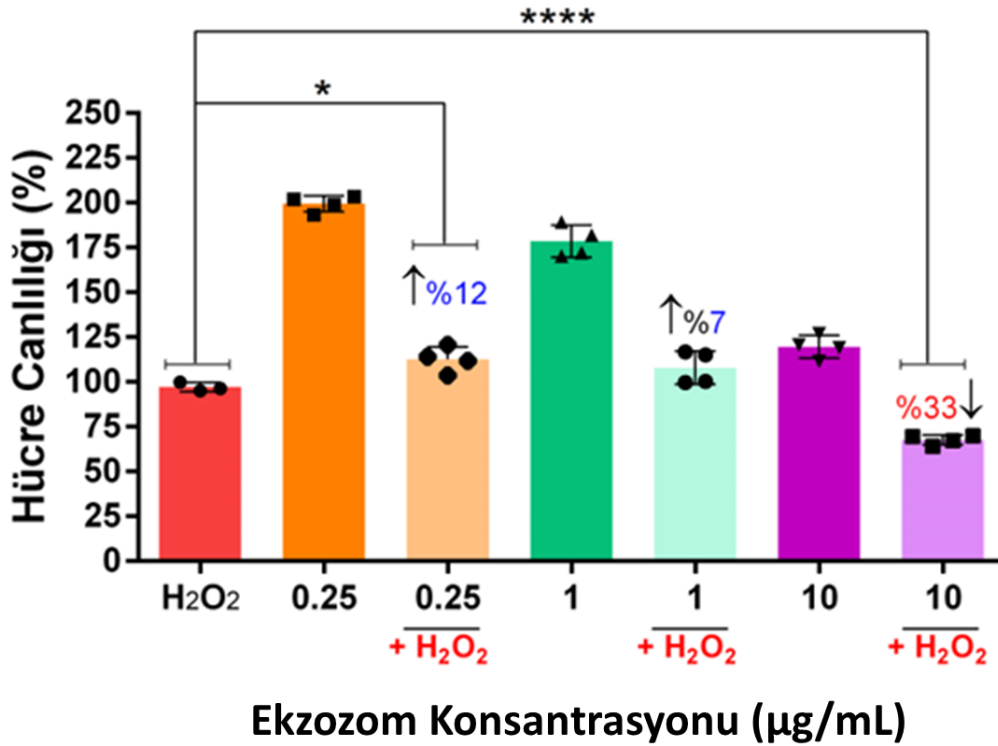
Şekil 4.14. rt-MKH kaynaklı ekzozomların HaCaT hücrelerinde yara kapanmasına etkisi* p<0,05, *** p<0,001, ***** p<0.0001 temsil etmektedir.

Hücre canlılığı analizlerinde, hFB ve HaCaT hücrelerine $>1 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda ekzozom uygulandığında 48 saat sonunda kontrol grubuna kıyasla canlılığın azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, hücre göçü çalışmaları özellikle fibroblastların $10 \mu\text{g/mL}$ ekzozom uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha hızlı bir şekilde yara bölgesini kapattıkları tespit edilmiştir. Bu durum, rt-MKH kaynaklı ekzozomların hedeflenen biyolojik fenomene göre doz bağımlı etki gösterdiğini düşündürmüştür. Ayrıca bu durumun ortaya çıkmasının muhtemel sebebi olarak hücre proliferasyonu ve migrasyonunda farklı biyolojik mekanizmaların etkili olması, fibroblastlara $10 \mu\text{g/mL}$ ekzozom uygulandığında hücre canlılığında rol alan mekanizmaların aktivasyonun azalması, hücre migrasyonunda etkili olan mekanizmaların ise aktivasyonun artması olarak düşünülmüştür. Bu durumun anlaşılması için daha detaylı çalışmaların yürütülmesi planlanmaktadır.

4.4.4. Ekzozomların Oksidatif Stres Altında Hücre Canlılığına Etkisi

Reaktif oksijen türleri (ROS) normal koşullar altında dengeli olarak hücreler tarafından üretilmektedir. Ancak yara oluşması gibi patolojik durumlarda “redoks sinyallerinin ve kontrolünün” bozulması ile birlikte pro-oksidanlar (ROS) ve anti-oksidanlar arasındaki denge kaybolmaktadır. Bu durumda H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$ gibi ROS birikimi ile oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres ise hücre ölümüne yol açmaktadır. Ekzozomların ise hücrelerin oksidatif strese karşı direncini artırdığı bildirilmiştir [146]. Bu çalışmada da rt-MKH kaynaklı ekzozomların oksidatif stres altında keratinosit hücrelerinin canlılığını artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Sadece H_2O_2 uygulanan grubun hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Buna göre H_2O_2 grubu ile kıyaslandığında hücrelere $0,25 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda ekzozom uygulandığında hücrelerin oksidatif strese karşı dirençleri %12 oranında artmaktadır ($p<0,05$). $1 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda ekzozom uygulandığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da %7’lik bir artış meydana gelmiştir ($p>0,05$). H_2O_2 grubu ile kıyaslandığında $10 \mu\text{g/mL}$ ekzozom uygulanan grupta ise hücre canlılığı anlamlı düzeyde düşük tespit edilmiştir ($p<0,0001$). HaCaT hücrelerine $10 \mu\text{g/mL}$ ekzozom uygulandığında hücre canlılığının daha çok düştüğü görülmüştür (Şekil 4.9). Dolayısı ile $10 \mu\text{g/mL}$ ekzozom, H_2O_2 ile birlikte hücrelere uygulandığında beklendiği üzere hücre canlılığını düşürmüştür. Yara iyileşmesi sürecinde ekzozomların miR-27b, miR-375, miR-5591-5p gibi miRNA’lar aracılığı ile ROS üretimini inhibe ederek yara iyileşmesini hızlandırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Buna ek olarak aynı grup tarafından hücre kaynağının ve hücre kültürü koşullarının ekzozomları taşıdığı RNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalar hücre kültürü şartları değiştiğinde ekzozom içeriğinin ve ekzozom uygulanan hücrelerin yanıtının değiştiğini göstermiştir [146]. Wang ve ark. umbilikal kord MKH'lerden izole ettikleri ekzozomlar ile beş farklı konsantrasyon (2, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$) ile keratinosit hücreleri üzerinde oksidatif stres uygulamışlar ve DNA hasarı üzerinden değerlendirmede en etkili konsantrasyonun 5 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu raporlamışlardır. Aynı konsantrasyonları *in vivo* modelde test ettiklerinde ise artan doz ile birlikte DNA hasarının azaldığını göstermişlerdir [195]. Bölüm 4.4.1'de bahsedildiği üzere bu çalışmada da en yüksek hücre canlılığı 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ekzozom uygulanan grupta tespit edilmiştir. Ekzozomların izole edildiği hücre kaynağı ve hücre kültür koşullarının aynı olması benzer sonuçların alınmasını sağlamıştır.



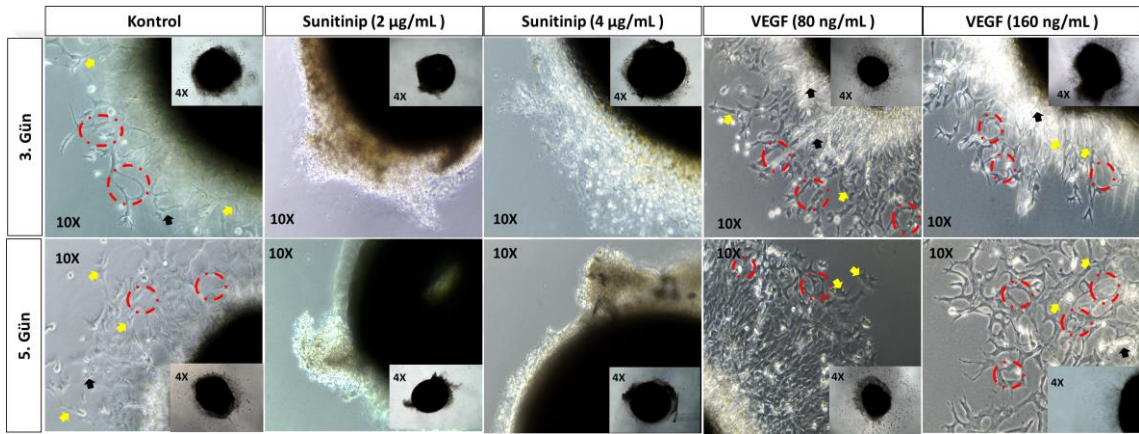
Şekil 4.15. rt-MKH kaynaklı ekzozomların oksidatif strese karşı etkisi. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ temsil etmektedir (Yukarı yönlü oklar artışı, aşağı yönlü oklar azalmayı temsil etmektedir).

4.4.5. Ekzozomların Anjiyojenik Etkilerinin Aortik Halka ile Değerlendirilmesi

rt-MKH kaynaklı ekzozomların anjiyojenik etkilerinin aortik halka deneyi ile değerlendirmesinden önce protokolün optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik gözlemlerde aortik halkaların başarılı bir biçimde Matrijel®'e gömülerek, halkalardan hücrelerin yürüdüğü ve filizlenme oluşturduğu, endotel hücre morfolojisi gösteren bu hücrelerin tüp oluşumlarını gerçekleştirdiği görülmüştür (Şekil 4.16). Tüp oluşturma karakteri endotel hücrelerine özgüdür. Endotel hücreleri *in vivo*'da ince ve özelleşmiş bazal membran ile sürekli temas halinde olup buradan beslenerek kan damarı tüp formunu korumaktadır. *in vitro*'da endotel hücrelerin tüp oluşumu göstermeleri için *in vivo*'dakine benzer bir bazal membrana ihtiyaçları vardır. Elde edilen sonuçlar kullanılan matrijelin endotel hücrelerin doğal morfolojisini göstermeleri için uygun koşulları sağladığını göstermiştir. Endotel hücrelerinin tüp benzeri yapılar oluşturmaları hücre hattı endotel hücreleri tarafından 2-3 saat içerisinde gerçekleştirilirken primer endotel hücreleri için bu süre 6-20 saat arasında olmaktadır [196]. Ancak bu şartlar izole edilen hücrelerin *in vitro* koşullarda koloniler halinde kültüre edilmesi durumunda geçerlidir. Aortik halka deneyinde damar dokusundan yürüyen hücrelerin basal membranda önce koloniler oluşturup daha sonra tüp benzeri yapılar oluşturmaları beklendiğinden bu süreler uzamaktadır. Endotel hücrelerinin *in vitro* koşullarda oluşturdıkları tüp formasyonu angiyoenez için kullanılan bir deney yöntemidir. Bununla birlikte bu deney anti-anjiyojenik veya pro-anjiyojenik faktörlerin etkilerini tayin etmede tek başına kullanılmamaktadır. Bu deney başka *in vitro* veya *in vivo* deneyler ile desteklenmelidir. Aortik halka deneyi sadece *in vitro* koşullarda endotel hücrelerinin anjiyojenik etkilerini incelemek yerine angiyoenezin var olan damardan yeni damarlar oluşması biyolojisinin taklit edilmesini sağlamaktadır.

Aortik halka deneyinin optimizasyonu için öncelikle anti-anjiyojenik ve pro-anjiyojenik etkileri bilinen faktörler kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak %2,5 FBS içeren besi ortamı, anti-anjiyojenik faktör olarak doza bağlı bir etki olup olmadığını görmek üzere iki farklı konsantrasyonda sunitinib (2 ve 4 µg/mL) ve pro-anjiyojenik olarak ise iki farklı konsantrasyonda VEGF kullanılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında iki sunitinib konsantrasyonunda endotel hücrelerinin halkalardan yürümesinin ve yeni filizlerin oluşumunun inhibe olduğu görülmüştür. Yine elde edilen sonuçlar 2 µg/mL sunitinib aortik halka testinde anti-anjiyojenik etkinin görülmesi için yeterli olmuştur. Bu sunitinib konsantrasyonu devam eden çalışmalarda kullanılmıştır.

Bununla birlikte yine kontrol grubu ile kıyaslandığında uygulanan VEGF (80 ve 160 ng/mL) konsantrasyonlarının halkalardaki hücrelerin migrasyon hızını ve tüp oluşturma süreçlerini hızlandırdığı görülmüştür. Test edilen VEGF konsantrasyonları arasında ise 3. ve 5. günde VEGF uygulanan halkalardaki endotel hücrelerinin anjiyojenik tepkileri açısından belirgin fark gözlenmemiştir (Şekil 4.16). Bu bilgiler doğrultusunda ise pro-anjiyojenik doz olarak kontrol grubuna göre etkinin görülebildiği 80 ng/mL konsantrasyonunda VEGF seçilmiştir. Bu sonuçlar matrijel ile kültüre edilen aort damarlarının anti-anjiyojenik ve pro-anjiyojenik faktörlere beklenen yanıtları verdiğini göstermiştir.

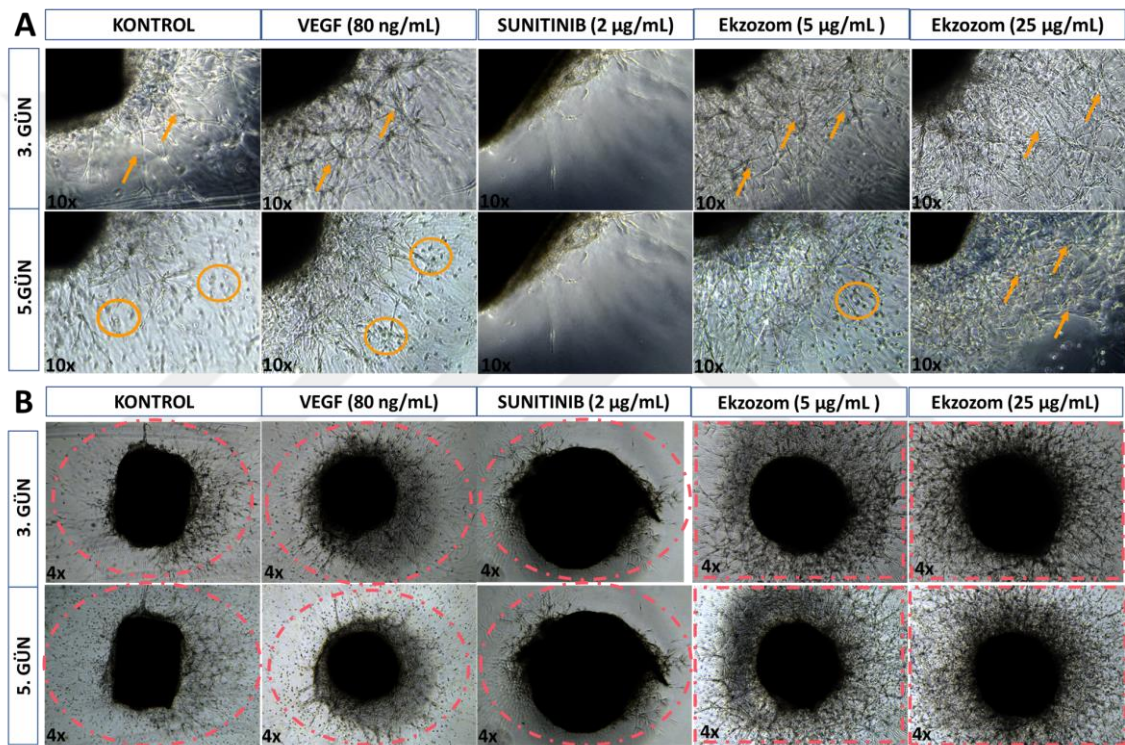


Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda sunitinib ve VEGF'in aortik halkalarda etkisinin test edilmesi (Kırmızı halkalar tüp oluşumlarını, siyah oklar halkalardan çıkan ince uzantıları ve sarı oklar halkalardan yürüyen endotel morfolojisi gösteren hücreleri göstermektedir).

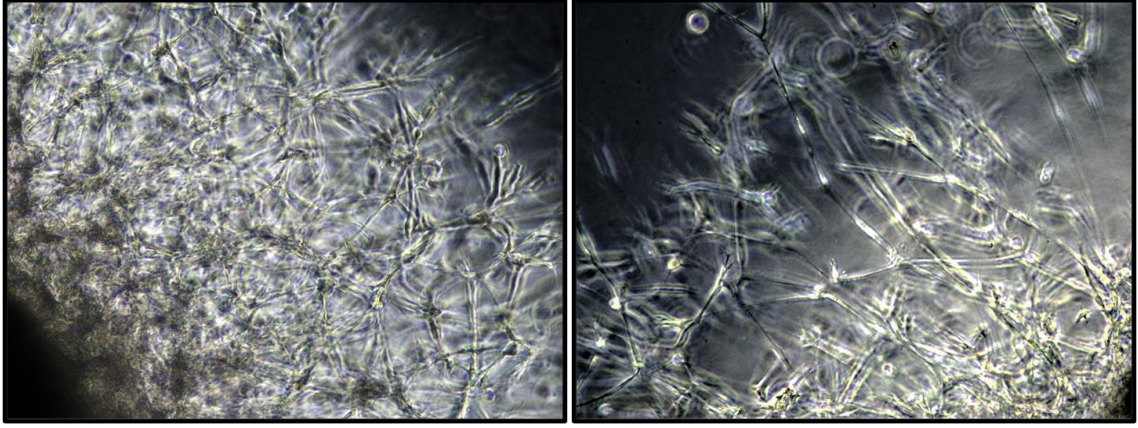
Aortik halka deneyinde anti-anjiyojenik ve pro-anjiyojenik kontrol grupları belirlendikten sonra ekzozomların anjiyojenik etkileri araştırılmıştır. Ekzozomların endotel hücreleri üzerindeki etkileri iki farklı konsantrasyon (5 ve 25 µg/mL) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu konsantrasyonlar, birçok farklı çalışmada MKH'lerden izole edilen ekzozomların tüp formasyonu ve endotel hücreleri ile yapılan migrasyon deneylerinde kullanılan konsantrasyonlar göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Endotel hücreleri ile yapılan tüp formasyonu deneylerinde genel olarak 25 ile 50 µg/mL aralığında yüksek konsantrasyonda ekzozom uygulanmaktadır [197, 198].

Bu konsantrasyonlar arasından yüksek doz olarak 25 µg/mL, artan doza bağlı etkinin analiz edilebilmesi açısından ise düşük doz olarak 5 µg/mL konsantrasyonu seçilmiştir. Ekzozom uygulamasından sonraki 3. ve 5. günlerde alınan görüntüler Şekil 4.17’de sunulmuştur. Mikroskopik gözlemler sonucu aortik halkaların başarılı bir biçimde matrijele gömüldüğü, endotel hücrelerin aort damarından migrasyon ile endotel filizlenmeleri ve tüp formasyonları oluşturduğu izlenmiştir (Şekil 4.18). Deney sonuçlarına göre anti-anjiyojenik faktör sunitinib (2 µg/mL) uygulanan halkalarda öngörüldüğü üzere filizlenme oluşmadığı ve endotel morfolojisine sahip hücrelerin bulunmadığı görülmüştür. Pro-anjiyojenik faktör VEGF (80 ng/mL) ise endotel hücrelerinin migrasyon ve filizlenmeler açısından anjiyojenik etkinliğini artırdığı görülmüştür. Ekzozom konsantrasyonları (5 ve 25 µg/mL) ile kontrol ve VEGF grupları kıyaslandığında ise her iki egzozom konsantrasyonun da endotel hücrelerinin migrasyonunu ve filizlenmelerini artırdığı görülmüştür. Buna ek olarak VEGF ve kontrol gruplarına göre egzozom gruplarında daha homojen bir büyüme görülmektedir. Anjiyojenik etkinin değerlendirilmesi açısından endotel hücrelerinin migrasyon ile aort damarının en dış katmanından başlayarak kat ettikleri en uzak mesafe, hücrelerin birbirleri ile oluşturdukları endotel filizlenmeleri ve oluşan 3-boyutlu ağ yapısını oluşturan tüp formasyonları göz önünde bulundurulmuştur. Ekzozom konsantrasyonlarının 3. ve 5. günlerdeki etkileri kıyaslandığında ise 5. günde endotel hücre ağ yapısının hücre ölümüyle bozulmaya başladığı gözlemlenmiştir. Bu etki egzozomların aortik halka üzerindeki etkisinin VEGF’ten daha fazla olması, egzozom kargolarında VEGF gibi büyüme faktörlerinin yanında çeşitli anjiyojenik miRNA’ların bulunması ile açıklanabilir [199, 200]. 5 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonundaki egzozomların aortik halka endotel hücre filizlenmesi üzerine etkileri kıyaslandığında ise 25 µg/mL konsantrasyonundaki egzozomların aortik halka endotel hücre ağ yapısını daha çok artırdığı görülmektedir. Anjiyojenik etkinin değerlendirilmesi açısından endotel hücrelerinin migrasyon ile aort damarının en dış katmanından başlayarak kat ettikleri en uzak mesafe, hücrelerin birbirleri ile oluşturdukları endotel filizlenmeleri ve endotel hücrelerinin üç boyutlu ortamda oluşturdukları tüp formasyonları göz önünde bulundurulmuştur. Sonuç olarak artan konsantrasyonda egzozomların endotel hücrelerinin migrasyonunu hızlandırdığı ve filizlenmeler ile birlikte tüp formasyonunu artırdığı görülmüştür.

Elde edilen veriler civciv aort damarlarının kullanılmasının ve herhangi bir modifikasyon yapılmaksızın rt-MKH'lerden izole edilen ekzozomların aortik halka deneyi ile anjiyojenik etkilerinin araştırılması açısından ilk olma özelliği taşımaktadır. Literatürdeki aortik halka deneyinde kaynak olarak fare kullanılmaktadır [201]. Fare aort damar endotel hücreleri immünohistokimyasal analiz ile karakterize edilebilir. Ayrıca endotel hücre filizlenmeleri ağ yapı oluşturmada daha belirgin şekilde büyümekte ve daha kolay analiz edilmektedir. Ancak deneyin başarıya ulaşma oranı çalışılan dokunun büyümesi ve daha az hücre bulunduğu için daha düşük olmaktadır.



Şekil 4.17. Aortik halkalarda ekzozom, sunitinip ve VEGF'nin anjiyojenik etkisi. A) Endotel hücre filizlenmeleri (ok), ölmüş hücreler (halka) (10X), B) Aortik halkaların etrafındaki filizlenmeler ve hücre büyümesi (4X).

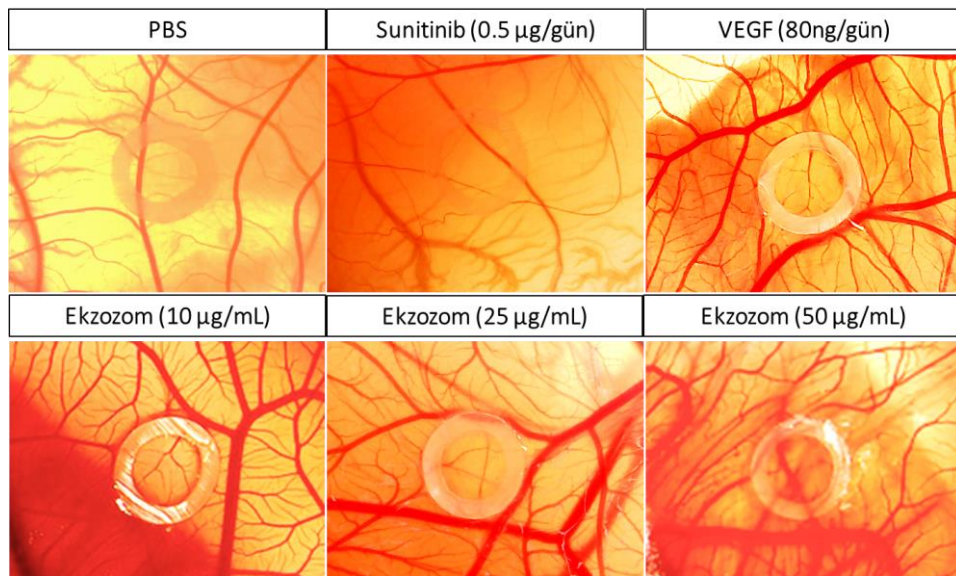


Şekil 4.18. Endotel hücre filizlenmelerinin ağ yapısı ve filizlenmeleri (20X).

4.4.6. Ekzozomların Anjiyojenik Etkilerinin CAM ile Değerlendirilmesi

Ekzozomların anjiyojenik etkilerinin araştırılması amacı ile kullanılan bir diğer yöntem ise koryoallantoik membran deneyidir. Aortik halka deneyi endotel hücreleri ile yapılan *in vitro* deneylerin bir adım ileri götürülerek organ kültürü ile yapılmasını sağlamıştır. CAM deneyi ise yaşayan bir canlı üzerinde anjiyogenez çalışması yapılmasını mümkün kılmaktadır. CAM deneyi, aortik halka deneyi ile endotel hücrelerinin davranışı açısından farklılık göstermektedir. Aortik halka deneyinde endotel hücreleri başlangıçta oluşan endotel filizlenmelerinin uzatılması yönünde bir davranış sergilerler ancak bu filizlenmelerin hücre kültüründe kılcal damar oluşturması mümkün değildir. CAM deneyinde ise oluşan endotel filizlenmeleri komşu kılcal damarlar arasında sık ve kısa kılcal damarların oluşmasını sağlamaktadır. Oluşan kılcal damarlar ile birlikte anjiyogenez etkisi daha açık bir şekilde tayin edilebilmektedir. CAM'lere uygulanacak ekzozom konsantrasyonları aortik halkada uygulanan ve *in vitro* çalışmalara göre belirlenen 25 µg/mL konsantrasyonundan yola çıkılarak belirlenmiştir. Toksik etki gösterip göstermeyeceğini görmek amacı ile 50 µg/mL ve artan konsantrasyonun etkisinin görülebilmesi amacı ile düşük konsantrasyon olarak 10 µg/mL konsantrasyonlarında ekzozom solüsyonları hazırlanarak CAM'lere uygulanmıştır. Embriyonik gelişimin 10. gününde fotoğraflama yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Damar oluşumu, embriyonunun gelişim sürecine bağlı olarak değişmektedir. Embriyonik gelişimin 5-7.günleri arasında kılcal damar ağının başladığı endotel filizlenmeleri oluşmaktadır. 8-12. günler arasında ise endotel filizlenmelerinin yerini kılcal damarlar almaktadır. 13. ve 14. günler itibari ile yeni damar oluşumu durur ve mevcut kılcal damarlar genişlemeye başlar [202]. CAM deneyi sonuçları Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

Anti-anjiyojenik faktör olarak kullanılan ve konsantrasyonları aortik halka deneyinde belirlenen sunitinibin (2 µg/mL) CAM'ler üzerinde de yeni kılcal damar oluşumunu durdurarak inhibisyon etkisi gösterdiği görülmüştür. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan VEGF'in aynı şekilde uygulama bölgesini belirleyen halkanın içerisinde ve çevresinde kılcal damar oluşumunu artırarak pro-anjiyojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ekzozom konsantrasyonlarının (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL) hiçbirinde toksik etki görülmemiştir. PBS grubu ile karşılaştırıldığında ise ekzozom uygulanan CAM'lerde kılcal damar oluşumunun arttığı izlenmiş ancak ekzozom konsantrasyonları arasında anjiyojenik etki açısından belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Uygulama alanları kullanılan halkalar ile belirlenmiş ancak yapılan gözlemler ve görüntülemeler lokal uygulamanın sistemik bir sonuca da sebep olduğunu göstermiştir. Bu durum verilen biyolojik ajanların kan dolaşımına dahil olduğunu kanıtlar niteliktedir. Bu veriler rt-MKH'lerden elde edilen ekzozomların direkt olarak CAM'lere uygulanarak anjiyojenik etkilerinin araştırması açısından ilk olma özelliği taşımaktadır. Ayrıca deney protokolü açısından literatüre göre farklı bir yol izlenmiştir. Genel olarak CAM deneyleri yumurta kabuğunda açılan bir delik içerisinden uygulama yapılarak gerçekleştirilmektedir [203]. Ancak yumurtanın tamamen kabuğundan çıkartılarak hücre kültürü koşullarında büyütüldüğü bu deney protokolünde biyolojik ajanın etkisi bir bütün halinde görülebilmektedir. Sonuç olarak CAM deneyi başarı ile uygulanmış ve ekzozomların anjiyojenik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.



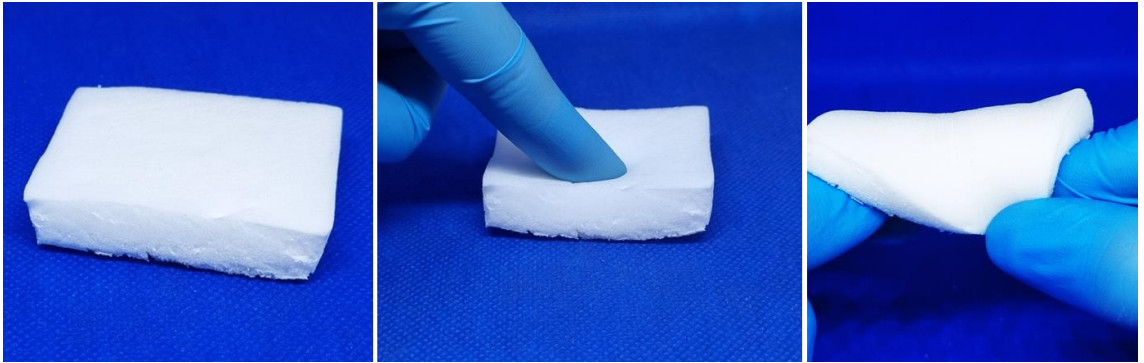
Şekil 4.19. CAM analizinde ekzozomların pro-anjiyojenik aktivitelerinin incelenmesi.

4.5. Jelatin Süngerlerin Özellikleri

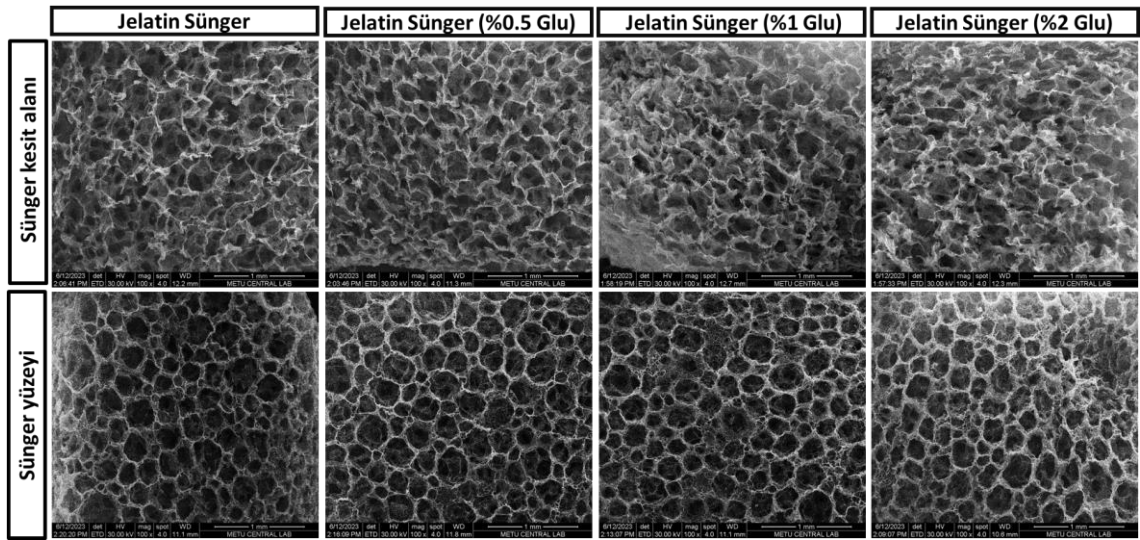
Jelatin süngerlerin doğal protein yapıları, biyouyumlu olmaları ve gözenekli yapıları nedeniyle hücre dışı matriksi taklit etmektedirler. Bu nedenle hem yapısal olarak hem de biyolojik olarak yara iyileşmesinin ilk adımı olan hemostaz fazından başlayarak yara iyileşmesinde rol alırlar. Bu tez kapsamında jelatin süngerlere ekzozomların yüklenerek biyoaktif süngerlerin yara iyileşmesinde bir rol üstlenmesi ve hücresel ve anjiyojenik etkileri sayesinde yara iyileşmesini hızlandıracağı öngörülmüştür. Bu amaçla hazırlanan jelatin süngerlerin ekzozomlar için uygun bir taşıyıcı sistem oldukları aşağıda sunulan özellikleriyle değerlendirilmiştir.

4.5.1. Jelatin Süngerlerin Morfolojik Karakterizasyonu

Dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanan jelatin süngerler beyaz renkte, gözenekli, yumuşak ve esnek bir dokuya sahiptir (Şekil 4.20). Bu özellikleri nedeniyle yara bölgesine yapısal olarak kolay uyum sağlar. Hazırlanan süngerlerin gözenek çapları ortalama 200 – 250 μm aralığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21). Jelatin süngerlerin yüksek oranda gözenekli yapıya sahip olduğu gözenek yapılarının birbirleri ile bağlantılı ve homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür. Bu nedenle hazırlanan süngerlerin morfolojik özellikleri ekzozomlar için uygun bir taşıyıcı sistem olduğunu göstermektedir. Gao ve ark. gözenek boyutu ortalama $235.7 \pm 30,5 \mu\text{m}$ olan ekzozom yüklü PLGA mikrokürelerden ekzozomların 21 gün boyunca uzatılmış bir salım profili sergilediklerini göstermişlerdir [204]. Kullanılan glutaraldehit konsantrasyonuna bağlı olarak jelatin süngerlerin gözenek yapıları arasında göz ile görülebilir bir fark oluşmamıştır. Ancak degradasyon gibi kimyasal bağların rol aldığı analizlerde gruplar arasındaki farklar daha net olarak ortaya çıkmaktadır [205].



Şekil 4.20. Jelatin süngerlerin makroskobik görünümü.



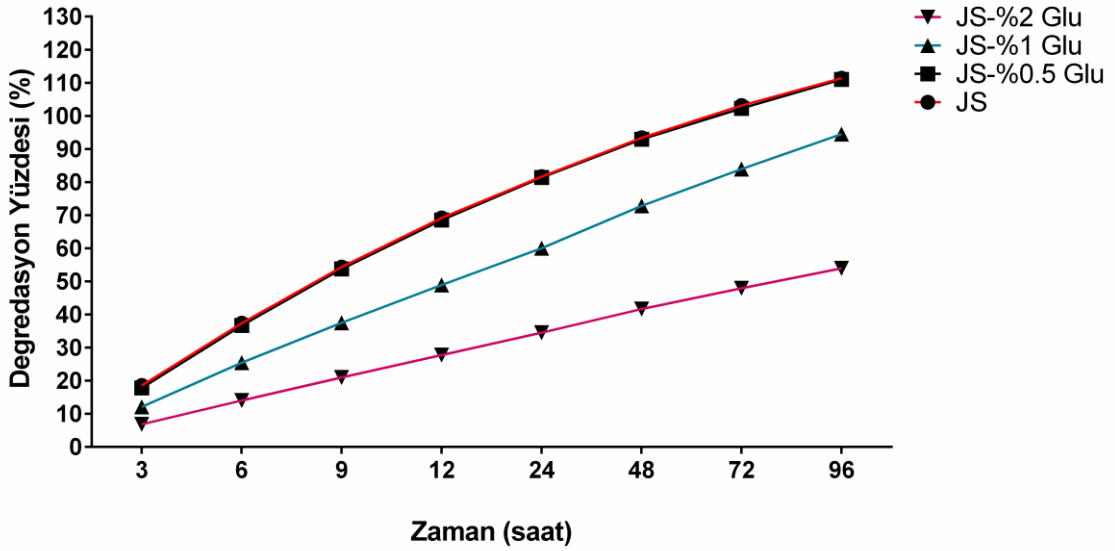
Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda (%0,5, %1, %2) glutaraldehit kullanılarak hazırlanmış jelatin süngerlerin kesit alanı ve yüzeyinden SEM görüntüleri (100X). Glu: Glutaraldehit

4.5.2. 3B Jelatin Süngerlerin Hidrolitik Bozunma Davranışları

Hidrofilik yapıda olan jelatin süngerlerin en büyük dezavantajı sulu ortamda çözünmeleridir. Bu nedenle süngerlerin yapısal bütünlüğünü korumak ve kararlılıklarını artırmak için ısı, UV veya çeşitli kimyasal çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok tercih edilenler glutaraldehit, genipin, transglutaminaz, karbodimid çapraz bağlayıcılarıdır [206]. Bunlar arasında glutaraldehit ucuz olması ve oda sıcaklığında hızlıca reaksiyona girmesi nedeniyle tercih edilmiştir. Glutaraldehit jelatin moleküllerinin amin grupları arasında çapraz bağlar oluşturmaktadır [207]. Çapraz bağlanma ile hidrolitik ve enzimatik degradasyon koşullarının bulunduğu ortamlarda jelatin zincirlerinin birbirlerinden ayrılma süresi uzamaktadır. Böylece jelatin süngere yüklenen biyolojik ajanların uygulanan bölgede daha uzun süre boyunca yapısını koruyabilmektedir.

Bu tez kapsamında jelatin süngerler farklı glutaraldehit konsantrasyonları ile çapraz bağlanarak zamana bağlı bozunmaları incelenmiş ve ekzozom yüklemek için en uygun sünger yapısına karar verilmiştir.

BCA analizi sonuçlarına göre 4. günün sonunda %2 ve %1 glutaraldehit ile çapraz bağlanan jelatin süngerlerin sırasıyla %54 ve %94 oranında bozunduğu izlenmiştir. Hiç çapraz bağlanmayan ve %0,5 glutaraldehit ile çapraz bağlanan jelatin süngerlerin ise %100 bozunduğu tespit edilmiştir. Beklenildiği üzere glutaraldehit konsantrasyonu arttıkça jelatin süngerlerin daha yavaş bozunduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında jelatin süngerlerin yara bölgesinde kararlılıklarını korumak ve ekzozomların yara bölgesinde uzatılmış bir salım profili sergilemesi için %2 glutaraldehit ile çapraz bağlanan jelatin süngerlerin (JS-%2 Glu) bundan sonraki uygulamalar için uygun olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlardaki glutaraldehit ile hazırlanan jelatin süngerlerin zamana bağlı olarak oluşan hidrolitik bozunma davranışları. JS: Jelatin Sünger, Glu: Glutaraldehit

4.5.3. Jelatin Süngerlerin Su Tutma Kapasiteleri

Farklı glutaraldehit konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan 3B jelatin süngerlerin su tutma kapasiteleri %3380-4504 aralığında bulunmuştur (Tablo 4.1). Bu sonuçlar jelatin süngerlerin başlangıç ağırlıklarının yaklaşık 40 katı kadar su tutabildiğini göstermiştir. Yüksek gözenekli yapılarına bağlı olarak su tutma kapasitelerinin de oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Yapılarındaki glutaraldehit konsantrasyonu azaldıkça jelatin süngerlerin su tutma kapasiteleri beklendiği üzere artmıştır.

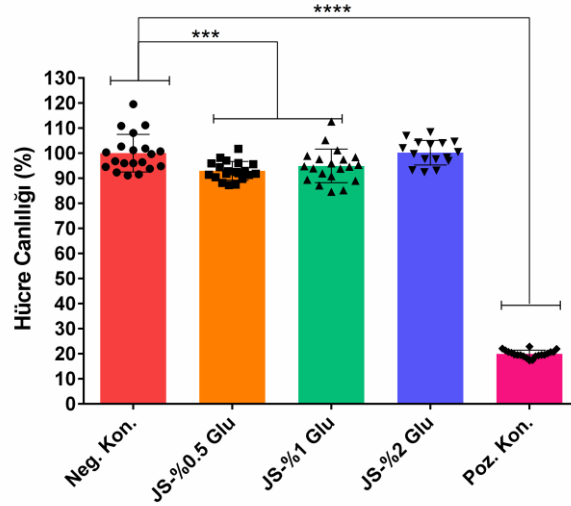
Imani ve ark. %0,5, %1 ve %2 konsantrasyonlarında glutaraldehit kullanarak hazırladıkları jelatin süngerlerin yaklaşık 40 katı kadar su tutma kapasitesine sahip iken glutaraldehit konsantrasyonu %1,5'e çıkarıldığında bu değerin 35'e indiğini bildirmişlerdir [208]. Jelatin süngerlerin yüksek su tutma kapasitesinin yara iyileşmesinde eksüda emilimini artırarak daha etkili olacağı düşünülmektedir.

Tablo 4.1. Farklı glutaraldehit konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan jelatin süngerlerin % su tutma kapasitesi

Örnek	Su Tutma Kapasitesi (%)
JS	4504
JS-%0,5 Glu	4446
JS-%1 Glu	4305
JS-%2 Glu	3380

4.5.4. Jelatin Süngerlerin Hücre Canlılığına Etkisi

Ekzozom taşıyıcı olarak kullanılması amaçlanan jelatin süngerler üç farklı glutaraldehit konsantrasyonu (%0,5, %1, %2) kullanılarak hazırlanmıştır. Glutaraldehit toksik bir kimyasal olduğundan glutaraldehit artıklarının hücreler üzerinde toksik bir etki oluşturup oluşturmadığının tespit edilmesi kritik öneme sahiptir. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan jelatin süngerlerin L929 fibroblast hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılığının %70'in altına düşmesi toksik bir maddenin varlığını göstermektedir. Elde edilen verilere göre kontrol grubundaki hücre canlılık oranı %100 kabul edildiğinde jelatin sünger gruplarından hiçbirisi toksik etki göstermemiştir. Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında %2 Glu grubunda hücre canlılığı %100 ($p>0,05$), %1 Glu grubunda %95 ($p<0,001$) ve %0,5 Glu grubunda ise %93 ($p<0,001$) olarak hesaplanmıştır ($n=20$) (Şekil 4.23). Bu sonuçlar ve degradasyon verileri göz önünde bulundurularak devam eden deneylerde %2 Glu ile hazırlanan jelatin süngerlerin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda glutaraldehit içeren jelatin süngerlerin hücre canlılığına etkisi. JS: Jelatin Sünger, Glu: Glutaraldehit. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ temsil etmektedir.

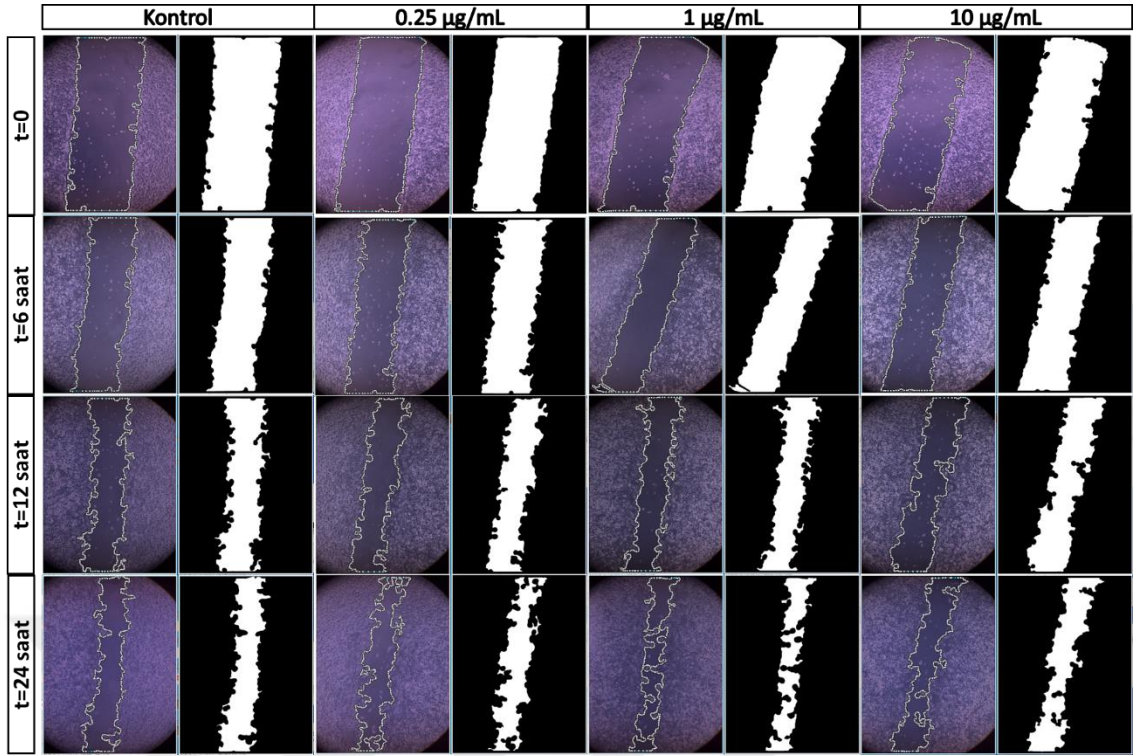
4.6. Ekzozom Entegre Jelatin Süngerin Biyolojik Etkileri

4.6.1. Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Hücre Migrasyonuna Etkisi

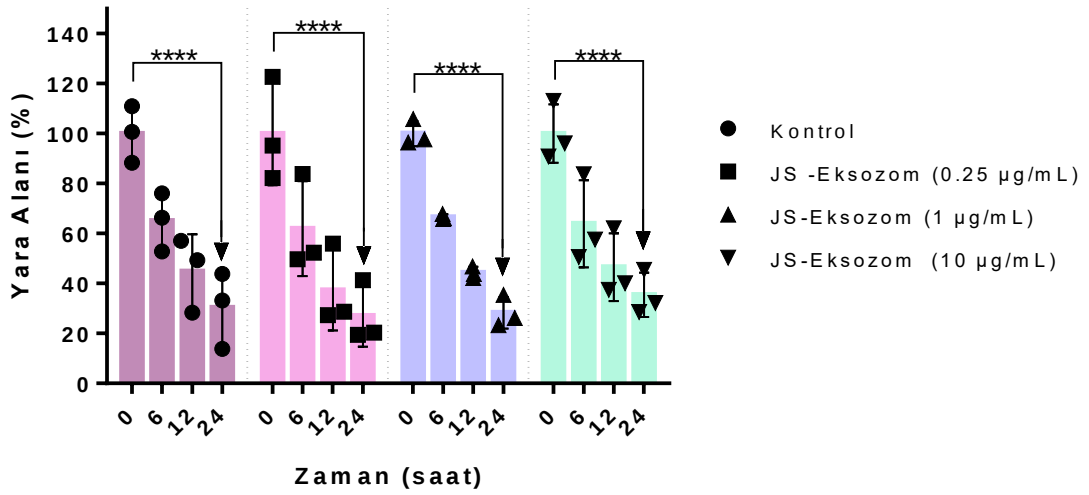
Önceki bölümlerde ekzozomların farklı konsantrasyonlarda hFB ve HaCaT hücreleri üzerinde migrasyon etkisi araştırılmıştır (Bknz Başlık 4.4.3). Elde edilen bu verilerden yola çıkılarak aynı konsantrasyonda ekzozom jelatin süngerlere yüklenerek HaCaT hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerine etkileri araştırılmıştır. Ekzozomlar serbest olarak hücrelere uygulandığında hFB hücrelerinin migrasyon yeteneğini arttırdığı görülmüştür. Ancak HaCaT hücrelerinde ekzozomların hücre migrasyonu üzerine pozitif bir etki görülmemiştir. Ekzozomların jelatin süngerlere yüklenerek stabiliteilerinin korunabileceği düşüncesi ile üç farklı konsantrasyonda (0,25, 1 ve 10 $\mu\text{g/mL}$) ekzozom jelatin süngerlere entegre edilmiş ve HaCaT hücrelerinin migrasyon yeteneğine üzerinde etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla ekzozom yüklü jelatin süngerler 24 saat boyunca *insert*'ler ile HaCaT hücrelerine uygulanmıştır ve uygulamanın 0., 6., 12. ve 24. saatlerinde görüntüler alınarak zamana bağlı yara kapanma profili çıkartılmıştır. Elde edilen sonuçlar jelatin süngere entegre edilmiş ekzozom konsantrasyonları arasında belirgin bir fark olmadığını göstermiştir (Şekil 4.24). Kontrol grubu da dahil bütün gruplarda 24 saatin sonunda başlangıçta açılan yara alanı yaklaşık %70 oranında kapanmıştır (Şekil 4.25).

Bu sonuçlar serbest ekzozomların hücre migrasyonuna etkisi ile karşılaştırıldığında ekzozomların jelatin süngere entegre edilmesi ile birlikte serbest ekzozomlarda görülen yavaş hücre migrasyon etkisinin ortadan kaldırılabilceğini göstermiştir. Yara iyileşmesi sürecinde anahtar faktör hücreler tarafından algılanan ve hücrelerin maruz kaldığı sitokin konsantrasyonudur. Belirli sitokinlerin varlığında hücrelerin migrasyondan proliferasyona fenotipik değişimi gerçekleşmektedir. Proliferasyon geri çevrilemez bir süreçtir ancak migrasyon, proliferasyondan farklı olarak geri çevrilebilir. Migrasyon bir noktada durabilir, yönü veya hızı değişebilir [209]. Bu açıdan bakıldığında ekzozomların jelatin süngerlere entegre edilmesi ile birlikte ortamdaki sitokin miktarı kontrol altında tutulmuş ve sonuç olarak da HaCaT hücrelerinin migrasyon davranışında bir farklılık meydana geldiği görülmüştür.





Şekil 4.24. Eksozom entegre jelatin süngerlerin HaCaT hücreleri üzerindeki migrasyon etkisi.



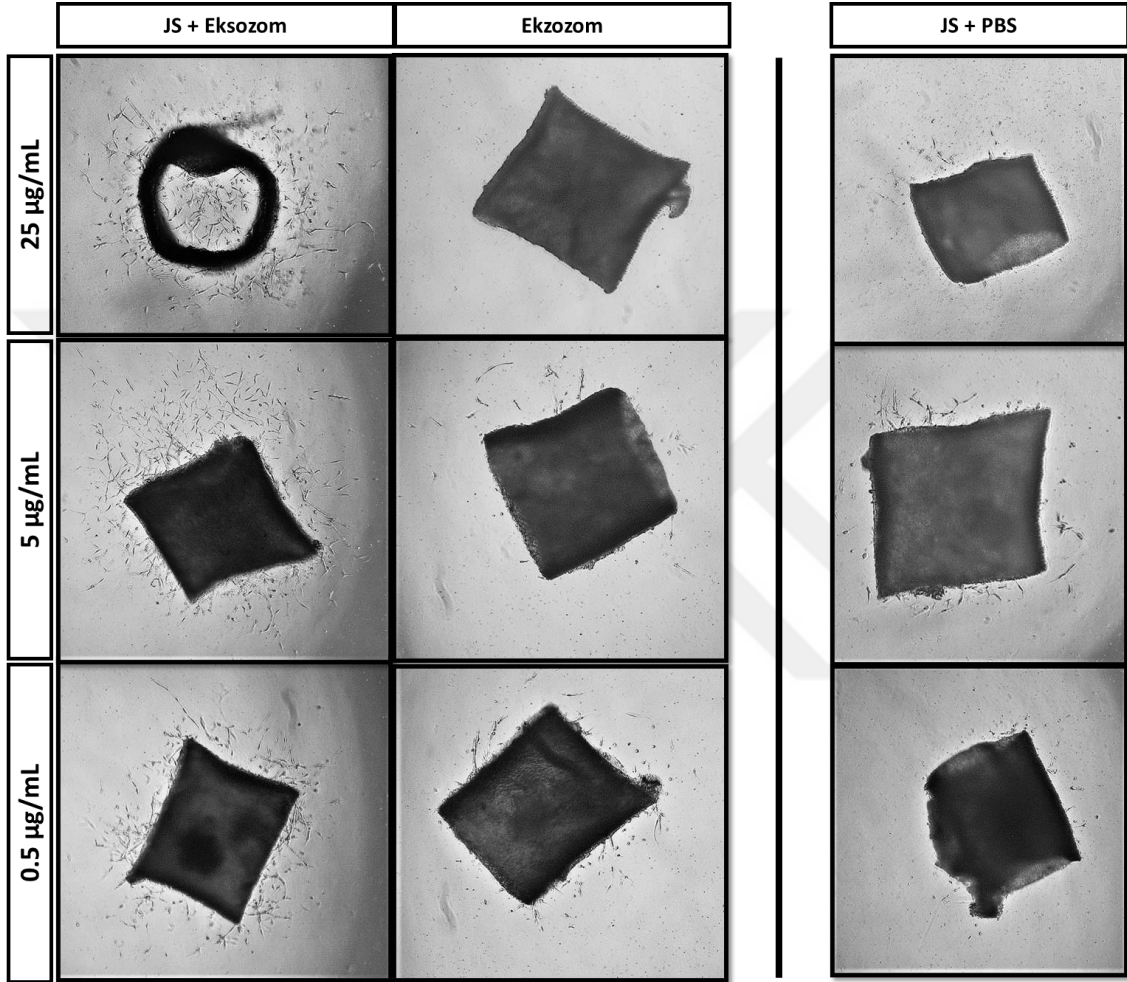
Şekil 4. 25. Eksozom entegre jelatin süngerlerin HaCaT hücrelerinde yara kapanmasına etkisi. **** p<0,0001 temsil etmektedir.

4.6.2. Ekzozom Entegre Jelatin Süngerlerin Anjiyojenik Etkileri

Anjiyogenez yara iyileşmesinde önemli rol oynayan bir süreçtir. Bu süreçte yara bölgesindeki hücrelerin oksijen ve besin ihtiyacının karşılanabilmesi için var olan damarlardan yeni damarlar oluşmalıdır. Yeni damar oluşumu yani anjiyogenezi uyarmak yara iyileşmesini hızlandırmak için sıklıkla başvurulan bir tedavi stratejisidir. Ekzozomların taşıdıkları proteinler, RNA'lar ve dahil oldukları sinyal iletim yolları ile anjiyogenezi tetiklediği bilinmektedir. Tutuianu ve ark. ekzozomların anjiyogenez uyarıcı angiopoietin-2 ve endotelin proteinlerini endotel hücrelerine taşıyarak anjiyogenezi arttırdığını migrasyon deneyi ile göstermişlerdir. Aynı zamanda ekzozomların taşıdıkları miR-21, miR125a, miR31 RNA'larının anjiyogenezde etkili olduğu bilinmektedir. Ekzozomların dahil oldukları anjiyogenez sinyal iletim yolları ise PI3/AKT, AKT/eNOS ve Wnt4/ β -katenin sinyal yolaklarıdır [210].

Tez kapsamında ekzozomların anjiyojenik özellikleri ilk olarak serbest ekzozomların tavuk aortik halkalarına uygulanması ile araştırılmıştır. Sonuçlar ekzozom uygulanan aortik halkarda ekzozom konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak endotel filizlenmelerinin ve ağ yapısının önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Bununla birlikte bu artışın yoğun olmasından dolayı elde edilen sonuçlar sayısal veriye dönüştürülememiştir. Analiz şartlarını kolaylaştırmak amacı ile ekzozom entegre jelatin süngerler fare aortik halkalarına uygulanmıştır [154]. Ancak endotel hücre yoğunluğunun azalması deney başarısının düşmesine sebep olmaktadır. Ekzozom entegre jelatin süngerler aortik halkalara uygulandıktan sonra 8 gün boyunca aortik halkaların durumu takip edilmiş ve 8. günde görüntüleme yapılarak deney sonlandırılmıştır. Aortik halkalar inkübasyonun 5-9. günleri arasında etkinlik göstermektedir. Görüntülemenin yapıldığı gün aortik halkaların büyümesinin durmasından önce yapılmıştır. Yapılan mikroskopik gözlem en fazla endotel filizlenmeleri ve hücre çoğalmasının ekzozom entegre edilmiş jelatin sünger gruplarında gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 4.26). 5 ve 0,25 μ g/mL serbest ekzozom uygulanan gruplarda ve jelatin sünger (JS-PBS) grubunda belirgin bir endotel filizlenmesi gerçekleşmemekle birlikte hücrelerin halkadan yürümeye başladığı gözlemlenmiştir. Jelatin süngere entegre edilmiş ekzozom konsantrasyonları arasında ise belirgin bir fark görülmemiştir. Kontrol olarak kullanılan jelatin grubunda ve serbest ekzozom gruplarında filizlenmelerin görülmemesi aortik halkalar için oluşturulan koşulların yetersiz olduğunu göstermektedir. Ancak jelatin süngerlerden kültür süresi boyunca ekzozom salımının olduğu durumda filizlenmelerin olgunlaşması için uygun koşulların sağlandığı

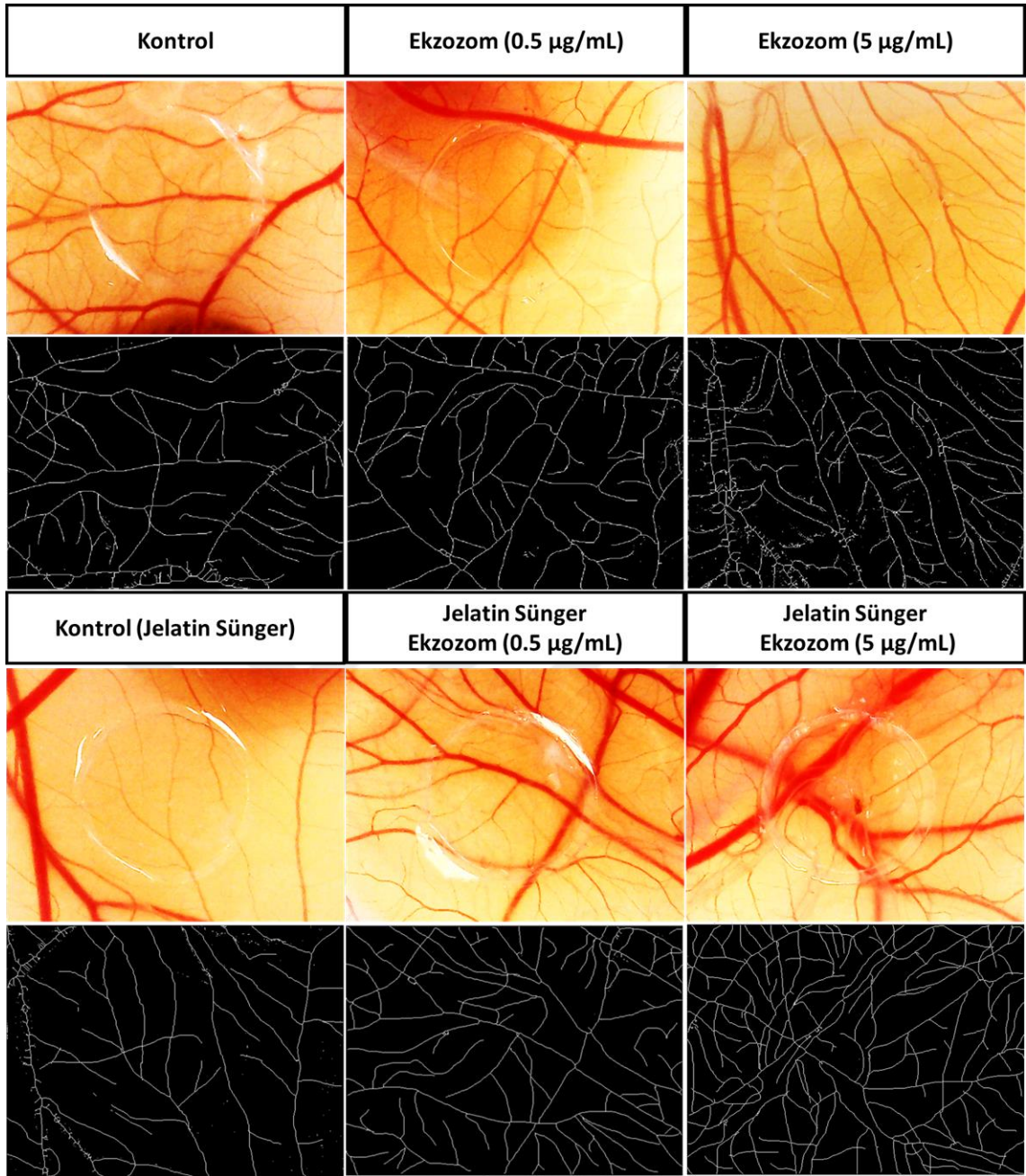
düşünülmektedir. Bu sonuçlar ekzozomların jelatin süngerlere entegre edilmesinin ekzozomların biyolojik aktivitelerini olumsuz yönde etkilemediğini, aksine bir taşıyıcı görevi görerek ekzozomların uygulama bölgesindeki kalış sürelerini artırarak yara iyileşmesi gibi zorlu koşullarda daha etkin bir tedavi sağlayacağı düşünülmektedir.



Şekil 4.26. Ekzozom entegre edilmiş jelatin süngerlerin, serbest ekzozomların ve jelatin sünger kontrol grubunun aortik halkalar üzerindeki anjiyojenik etkisi. JS: Jelatin Sünger.

Bölüm 4.4.6’da bahsedildiği üzere ekzozomların anjiyojenik etkilerinin tayini ilk olarak ekzozomların CAM’lere serbest olarak uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Serbest olarak uygulanan konsantrasyonlarda (10, $\mu\text{g/mL}$ 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$) pro-anjiyojenik etki tayin edilememiştir ancak toksik etki de görülmemiştir.

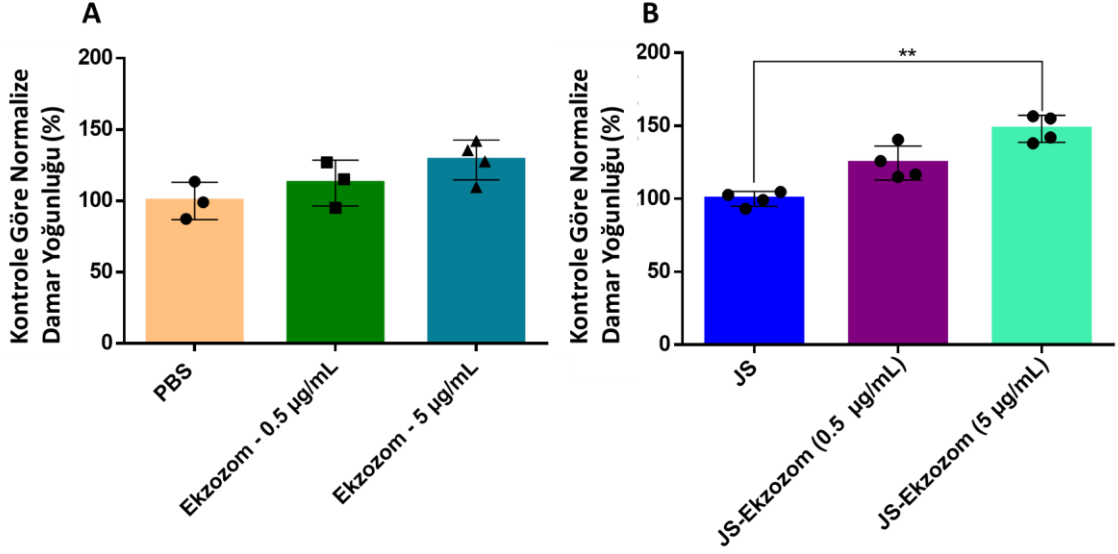
Ekzozom yüklü jelatin süngerlerin anjiyojenik etkileri daha önce ayrıntıları verilen CAM yöntemi ile araştırılmıştır. Jelatin süngerlerin CAM üzerinde bir iskele görevi göreceği şekilde kullanılması 1997 yılında Ribatti ve ark. tarafından CAM deneyinin yeni bir modeli olarak sunulmuştur. Böylelikle CAM'lere uygulanan biyolojik faktörlerin uygulama bölgesinde daha uzun süre kalması sağlanarak değerlendirmenin de daha güvenilir olacağı belirtilmiştir [211]. Bu bilgiler ve hücre canlılığı verileri göz önünde bulundurularak CAM uygulamasında jelatin süngerlere yüklenecek ekzozom konsantrasyonları 0,5 ve 5 µg/mL olacak şekilde belirlenmiştir. Seçilen konsantrasyonlarda ekzozomlar serbest olarak ve jelatin süngerlere yüklenerek CAM'lere uygulanmıştır. 9. gün sonunda ekzozom uygulanan embriyolar üzerindeki halkalar fotoğraflanmış (Şekil 4.27) ve anjiyojenik etkinin daha güvenilir bir biçimde raporlanabilmesi için Image J ile görüntü işleme yapılmıştır. İşlenen görüntüler image J programının “damar yoğunluğu” ölçme fonksiyonu ile sayısal veriye dönüştürülmüştür (Şekil 4.28). Elde edilen veriler her iki grup için de artan konsantrasyona bağlı damar yoğunluğunda artış meydana geldiğini göstermiştir. Aynı zamanda jelatin süngerin CAM üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediği de kanıtlanmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Serbest ekzozom ve jelatin süngere entegre edilmiş ekzozomların CAM üzerindeki etkisi ve image J ile analiz edilmiş fotoğrafları.

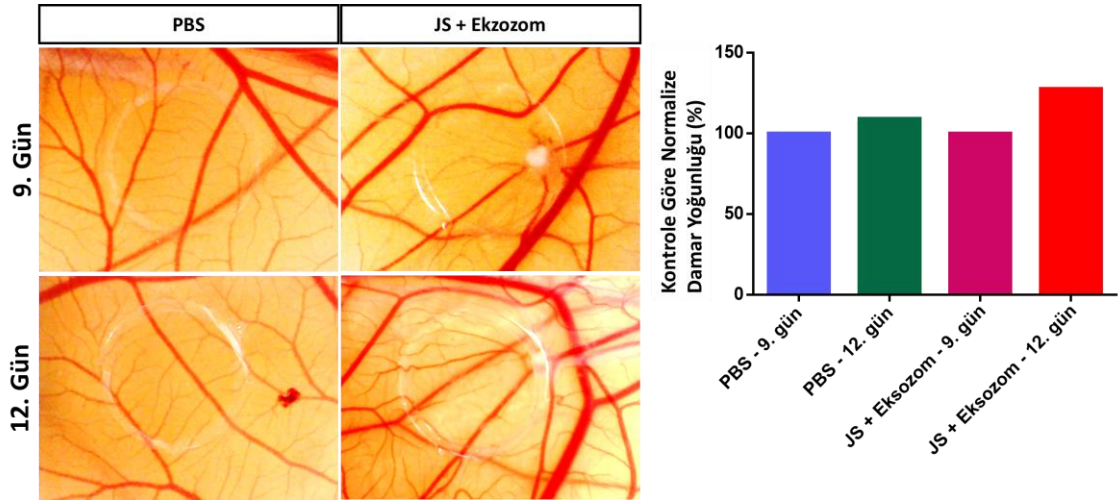
Ekzozomlar jelatin süngerlere entegre edilerek uygulandığında jelatin sünger (JS) grubuna göre damar yoğunluğunda 0,5 µg/mL konsantrasyonunda %25, 5 µg/mL konsantrasyonunda ise yaklaşık %50 ($p<0,01$) oranında artış sağladığı görülmüştür. Serbest ekzozomlarda ise aynı konsantrasyonda sırasıyla %10 ve %30 oranında artış görülmüştür (Şekil 4.28). Bu sonuçlar ekzozomların jelatin süngerlere yüklendiğinde CAM bölgesinde daha uzun süre kalarak anjiyogenezi tetiklediğini göstermektedir.

Merckx ve ark. ekzozomları taşıyıcı olarak plastik disk kullandıkları bir yöntem ile uygulamışlardır. Ancak çalışmanın sonuçları veriler arasında konsantrasyon bilgisinin bulunmaması ve kontrol olarak serbest ekzozom uygulanmamış olması sebebi ile karşılaştırılabilir bulunmamıştır [212]. Ekzozomların anjiyojenik etkileri *in vitro* koşullarda migrasyon ve tüp formasyonu deneyleri ile araştırılmaktadır. Geng ve ark. insan umbilikal ven endotel hücrelerine (HUVEC) ekzozom uygulayarak migrasyon ve tüp formasyonu ile anjiyogenez etkisini araştırmışlardır. Migrasyon deneyinde 10 µg/mL ve 50 µg/mL, tüp formasyonu deneyinde ise 50 µg/mL konsantrasyonunda ekzozom uygulamışlardır. Sonuçlar yüksek konsantrasyondaki ekzozomların biyolojik olarak daha etkili olduğunu göstermiştir [197]. Bu çalışmada da test edilen konsantrasyonlar arasında yüksek olan ekzozom konsantrasyonunun anjiyogenezi artırdığı tespit edilmiştir. Ancak literatür ile kıyaslandığında anjiyojenik etki daha düşük konsantrasyonlarda gözlemlenmiştir. Bu durumun muhtemel sebebi kullanılan hücre kaynağı, kültür koşulları ve ekzozomların jelatin süngerlere entegre edilmesi sonucu biyolojik aktivitelerini kaybetmeden fizyolojik ortama yavaş yavaş salınması olarak düşünülmüştür. Wu ve ark. yaptıkları tek partikül takip analizi ile serbest ekzozomların daha çok yer değiştirme sebebi ile zar bozulmalarının ve agregasyonların meydana geldiğini göstermişlerdir. Ekzozomları GelMA'ya yüklediklerinde ise stabilitelerinin arttığı ve biyolojik aktivitelerini korunduğunu göstermişlerdir [131]. Li ve ark. ise kök hücrelerden elde ettikleri ekzozomları jelatin süngerlere yükleyerek yüklenen ekzozomların bir hafta boyunca jelatin süngerlerden kontrollü bir şekilde saldıgını göstermişlerdir [213]. Bu çalışmalar ekzozomların jelatin süngerler aracılığı ile biyolojik aktivitelerinin kaybetmeden taşınabildiğini ve fizyolojik koşullar altında kontrollü salım gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak çalışmalarda ekzozom uygulanan hücre sayısı ve ekzozom konsantrasyonu verilirken uygulanan ekzozom hacmi belirtilmediğinden dolayı uygulanan ekzozom miktarı tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçların literatür bilgileri ile karşılaştırılmasının doğru olmayacağı düşünülmüştür.



Şekil 4.28. A) Serbest ekzozom ve B) Jelatin süngere entegre edilmiş ekzozomların CAM sonuçlarının sayısal analizi. ** p<0,005 temsil etmektedir. JS: Jelatin Sünger.

CAM'lere ekzozom uygulaması embriyonik gelişimin 7. gününde yapılmıştır. Embriyoların fotoğraflanması ise 9. günde yapılarak analiz yapılmıştır. Deney süresinin uzaması halinde PBS veya jelatin süngere entegre edilmiş ekzozom uygulanan CAM'lerin damar yoğunluğunda meydana gelen değişim yüzdeleri Şekil 4.29'te verilmiştir. PBS uygulanan CAM grubunda üç gün içerisinde %10'luk bir artış meydana gelirken ekzozom entegre edilmiş jelatin sünger grubunda %30'luk bir artış meydana gelmiştir. *Ex ovo* koşullarda embriyoların canlılığı 10. gün itibarı ile yaklaşık %10 olarak hesaplanmıştır. Bu sebeple fotoğraflamalar 9. günde yapılmıştır. Ancak yaşayan embriyolardan elde edilen bu sonuçlar embriyonik gelişimin ilerleyen sürecinde ekzozomların anjiyogenez etkisinin çok daha net bir şekilde görülebileceğini göstermiştir.



Şekil 4.29. PBS ve jelatin süngere entegre edilmiş ekzozomların 9. ve 12. günlerde CAM üzerindeki etkisi. JS: Jelatin Sünger.

5. YORUM

Bu tez kapsamında sıçan kemik iliği kaynaklı MKH'lerden ekzozom izolasyonu yapılarak jelatin süngerlere yüklenmiş ve geliştirilen ekzozom yüklü jelatin süngerlerin yara iyileşmesinde kritik öneme sahip olan biyolojik süreçlerdeki etkisi araştırılmıştır.

rt-MKH kaynaklı ekzozom izolasyonuna yönelik uygun protokolünün oluşturulması için hücre kaynağı, kültür koşulları ve ultrasantrifüj aşamasında kullanılan rotor tipinin ekzozom izolasyon verimine etkileri araştırılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda ultrasantrifüj yöntemi kullanılarak rt-MKH kaynaklı ekzozomların başarılı bir şekilde izole edildiği gösterilmiştir. 8 haftalık sıçanlardan izole edilen hücre kaynaklı ekzozom miktarının 5 ve 3 haftalık sıçanlardan izole edilen hücre kaynaklı ekzozomlara göre sırasıyla 4.8 ve 2 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ekzozom izolasyonunda kültür ortamı bileşeni olarak %10 Exodep FBS kullanıldığında ise verimin 2 kat arttığı gözlenmiştir.

rt-MKH kaynaklı ekzozomların boyut analizleri qNano® ve NTA ile gerçekleştirilmiş olup ortalama ekzozom boyutunun sırasıyla 159.4 ve 182.8 nm, ortalama partikül konsantrasyonun ise sırasıyla 2.4×10^9 ve 1.63×10^9 partikül/mL olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen ekzozomların küresel formda ve disk şeklinde bir morfolojiye sahip oldukları TEM analizi ile tespit edilmiştir. Akış sitometrisi sonuçları ise ekzozomların, spesifik belirteçleri olan CD81 ve CD63 ifade ettiklerini göstermiştir. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, rt-MKH kaynaklı ekzozomların başarılı bir şekilde izole edildiği sonucuna varılmıştır.

Ekzozomların hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde ise bunun doza bağlı olduğu tespit edilmiştir. 0,25 µg/mL ekzozom konsantrasyonunun keratinosit hücre canlılığını kontrole göre %11 artırdığı, fibroblast hücrelerinde ise bu artışın %2 olduğu tespit edilmiştir. 1 µg/mL üzerinde uygulanan ekzozom konsantrasyonunun ise insan dermal fibroblast ve keratinosit hücre canlılığını düşürdüğü gözlenmiştir. Benzer şekilde ekzozomlar (0.25 µg/mL) oksidatif stres altında keratinosit hücrelerine uygulandığında hücre canlılığı %12 oranında artmıştır.

Ekzozomların hücre migrasyonu üzerine etkileri incelendiğinde; 10 µg/mL konsantrasyonunda uygulanan ekzozomların fibroblast hücrelerinde kontrol grubuna göre migrasyon etkisi görülürken bu etki keratinosit hücrelerinde izlenmemiştir. Ekzozomların, 25 µg/mL konsantrasyonda aortik halka endotel hücre ağ yapısını daha çok artırdığı izlenmiş olup bu sonuç CAM analizi ile desteklenmiştir. Sonuç olarak bu veriler izole edilen ekzozomların yara iyileşmesinde kritik öneme sahip hücre çoğalması, migrasyonu, anti-oksidan etki ve anjiyogenez gibi biyolojik süreçleri etkilediği ve aynı zamanda bu etkilerin hücre tipine ve ekzozom konsantrasyonuna bağlı olduğu değerlendirilmiştir.

Ekzozomların stabilitesini artırmak ve yara bölgesinde kalış sürelerini artırmak için jelatin sünger taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla ortalama 200 – 250 µm gözenek çapına ve yüksek su tutma kapasitesine sahip biyobozunur jelatin süngerler geliştirilmiştir. Geliştirilen jelatin süngerlere rt-MKH kaynaklı ekzozomlar yüklenerek biyolojik etkileri incelenmiştir. Ekzozom entegre jelatin süngerlerin keratinosit hücre migrasyonu üzerinde konsantrasyona bağlı olarak önemli bir etkilerinin olmadığı, ancak serbest uygulanan ekzozomlarla karşılaştırıldığında 10 µg/mL ekzozom serbest uygulandığında yara alanı başlangıç zamanına göre %40, jelatin süngerlere entegre edildiğinde ise bu oran %65 olarak hesaplanmıştır. CAM analizinde; 5 µg/mL ekzozom entegre edilen jelatin süngerlerin damar yoğunluğunun jelatin süngerlere göre (JS grubu) yaklaşık olarak %50 oranında arttırdığı izlenmiştir. Diğer taraftan ekzozom (5 µg/mL) entegre jelatin süngerler embriyolara uygulandığında damar yoğunluğunu %50 artırırken serbest ekzozomlar (5 µg/mL) yaklaşık %30 oranında artırmıştır. Bu sonuçlar aortik halka yöntemi ile teyit edilmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen *in vitro* sonuçlar; ekzozomların jelatin süngerlere yüklendiğinde biyolojik aktivitelerini koruduklarını göstermiştir. Aynı zamanda ekzozom uygulaması için jelatin süngerin bir taşıyıcı sistem olarak yara iyileşmesinde uygulama kolaylığı sağlayacağı sonucuna varılmıştır. Bu bilgiler ışığında ekzozom yüklü jelatin süngerlerin yara iyileşmesindeki etkileri gelecekte yapılması planlanan pre-klinik deneylerle, akut ve/veya kronik yara modellerinde daha detaylı olarak araştırılacaktır.

6. KAYNAKLAR

- [1] S. Mathivanan, C.J. Fahner, G.E. Reid, R.J. Simpson, ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids, *Nucleic Acids Res*, 40 (2012) D1241-1244.
- [2] C. Harding, P. Stahl, Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing, *Biochem Biophys Res Commun*, 113 (1983) 650-658.
- [3] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J.J. Lee, J.O. Lötvall, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat Cell Biol*, 9 (2007) 654-659.
- [4] Y. Zhang, Y. Xie, Z. Hao, P. Zhou, P. Wang, S. Fang, L. Li, S. Xu, Y. Xia, Umbilical Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome-Encapsulated Hydrogels Accelerate Bone Repair by Enhancing Angiogenesis, *ACS Appl Mater Interfaces*, 13 (2021) 18472-18487.
- [5] H. Xin, Y. Li, Y. Cui, J.J. Yang, Z.G. Zhang, M. Chopp, Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats, *J Cereb Blood Flow Metab*, 33 (2013) 1711-1715.
- [6] M. Li, T. Wang, H. Tian, G. Wei, L. Zhao, Y. Shi, Macrophage-derived exosomes accelerate wound healing through their anti-inflammation effects in a diabetic rat model, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47 (2019) 3793-3803.
- [7] L. Cheng, Y. Wang, L. Huang, Exosomes from M1-Polarized Macrophages Potentiate the Cancer Vaccine by Creating a Pro-inflammatory Microenvironment in the Lymph Node, *Mol Ther*, 25 (2017) 1665-1675.
- [8] A. Reza, Y.J. Choi, H. Yasuda, J.H. Kim, Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti-proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells, *Sci Rep*, 6 (2016) 38498.
- [9] J. Rezaie, M. Feghhi, T. Etemadi, A review on exosomes application in clinical trials: perspective, questions, and challenges, *Cell Commun Signal*, 20 (2022) 145.
- [10] C.K. Sen, Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 10 (2021) 281-292.
- [11] D. Chouhan, N. Dey, N. Bhardwaj, B.B. Mandal, Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances, *Biomaterials*, 216 (2019) 119267.

- [12] B.M. Borena, A. Martens, S.Y. Broeckx, E. Meyer, K. Chiers, L. Duchateau, J.H. Spaas, Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments, *Cell Physiol Biochem*, 36 (2015) 1-23.
- [13] M. Isakson, C. de Blacam, D. Whelan, A. McArdle, A.J. Clover, Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential, *Stem Cells Int*, 2015 (2015) 831095.
- [14] J. Koehler, F.P. Brandl, A.M. Goepferich, Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds, *European Polymer Journal*, 100 (2018) 1-11.
- [15] K. Ulubayram, A.N. Cakar, P. Korkusuz, C. Ertan, N. Hasirci, EGF containing gelatin-based wound dressings, *Biomaterials*, 22 (2001) 1345-1356.
- [16] B.K. Sun, Z. Siprashvili, P.A. Khavari, Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds, *Science*, 346 (2014) 941-945.
- [17] K. Zhang, K. Cheng, Stem cell-derived exosome versus stem cell therapy, *Nature Reviews Bioengineering*, (2023).
- [18] P. Hu, Q. Yang, Q. Wang, C. Shi, D. Wang, U. Armato, I.D. Prà, A. Chiarini, Mesenchymal stromal cells-exosomes: a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration, *Burns & Trauma*, 7 (2019) s41038-41019-40178-41038.
- [19] B. Zhang, X. Wu, X. Zhang, Y. Sun, Y. Yan, H. Shi, Y. Zhu, L. Wu, Z. Pan, W. Zhu, H. Qian, W. Xu, Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Exosomes Enhance Angiogenesis Through the Wnt4/ β -Catenin Pathway, *Stem Cells Translational Medicine*, 4 (2015) 513-522.
- [20] L. Wang, L. Hu, X. Zhou, Z. Xiong, C. Zhang, H.M.A. Shehada, B. Hu, J. Song, L. Chen, Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling, *Sci Rep-Uk*, 7 (2017) 13321.
- [21] K. Ulubayram, A. Cakar, P. Korkusuz, C. Ertan, N. Hasirci, EGF containing gelatin-based wound dressing, *Biomaterials*, 22 (2001) 1345-1356.
- [22] A.P. Veith, K. Henderson, A. Spencer, A.D. Sligar, A.B. Baker, Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing, *Adv Drug Deliv Rev*, 146 (2019) 97-125.
- [23] J.S. Heo, S. Kim, Human adipose mesenchymal stem cells modulate inflammation and angiogenesis through exosomes, *Sci Rep*, 12 (2022) 2776.

- [24] Y. Han, J. Ren, Y. Bai, X. Pei, Y. Han, Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R, *Int J Biochem Cell Biol*, 109 (2019) 59-68.
- [25] K. Wang, R. Dong, J. Tang, H. Li, J. Dang, Z. Zhang, Z. Yu, B. Guo, C. Yi, Exosomes laden self-healing injectable hydrogel enhances diabetic wound healing via regulating macrophage polarization to accelerate angiogenesis, *Chemical Engineering Journal*, 430 (2022) 132664.
- [26] E. Chargaff, R. West, The biological significance of the thromboplastic protein of blood, *J Biol Chem*, 166 (1946) 189-197.
- [27] C. de Duve, B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans, Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue*, *Biochemical Journal*, 60 (1955) 604-617.
- [28] L.A. Hargett, N.N. Bauer, On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication, *Pulm Circ*, 3 (2013) 329-340.
- [29] B.T. Pan, R.M. Johnstone, Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor, *Cell*, 33 (1983) 967-978.
- [30] G. Raposo, H.W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C.V. Harding, C.J. Melief, H.J. Geuze, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *J Exp Med*, 183 (1996) 1161-1172.
- [31] R.M. Hershberg, P.E. Framson, D.H. Cho, L.Y. Lee, S. Kovats, J. Beitz, J.S. Blum, G.T. Nepom, Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing, *J Clin Invest*, 100 (1997) 204-215.
- [32] R.J. Simpson, S.S. Jensen, J.W. Lim, Proteomic profiling of exosomes: current perspectives, *Proteomics*, 8 (2008) 4083-4099.
- [33] C. Bang, T. Thum, Exosomes: new players in cell-cell communication, *Int J Biochem Cell Biol*, 44 (2012) 2060-2064.
- [34] N. Arraud, R. Linares, S. Tan, C. Gounou, J.M. Pasquet, S. Mornet, A.R. Brisson, Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration, *J Thromb Haemost*, 12 (2014) 614-627.
- [35] Z. Andreu, M. Yáñez-Mó, Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function, *Frontiers in Immunology*, 5 (2014).

- [36] M.E. Hemler, Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19 (2003) 397-422.
- [37] J. Jankovičová, P. Sečová, K. Michalková, J. Antalíková, Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction, *Int J Mol Sci*, 21 (2020).
- [38] H. Peinado, H. Zhang, I.R. Matei, B. Costa-Silva, A. Hoshino, G. Rodrigues, B. Psaila, R.N. Kaplan, J.F. Bromberg, Y. Kang, M.J. Bissell, T.R. Cox, A.J. Giaccia, J.T. Erler, S. Hiratsuka, C.M. Ghajar, D. Lyden, Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases, *Nat Rev Cancer*, 17 (2017) 302-317.
- [39] S.N. Hurwitz, D. Nkosi, M.M. Conlon, S.B. York, X. Liu, D.C. Tremblay, D.G. Meckes, Jr., CD63 Regulates Epstein-Barr Virus LMP1 Exosomal Packaging, Enhancement of Vesicle Production, and Noncanonical NF-kappaB Signaling, *J Virol*, 91 (2017).
- [40] D.M. Pegtel, S.J. Gould, Exosomes, *Annu Rev Biochem*, 88 (2019) 487-514.
- [41] S. López-Cobo, C. Campos-Silva, M. Valés-Gómez, Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anchors and Metalloproteases: Their Roles in the Regulation of Exosome Composition and NKG2D-Mediated Immune Recognition, *Front Cell Dev Biol*, 4 (2016) 97.
- [42] H.G. Zhang, W.E. Grizzle, Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions, *Am J Pathol*, 184 (2014) 28-41.
- [43] J. Ashley, B. Cordy, D. Lucia, L.G. Fradkin, V. Budnik, T. Thomson, Retrovirus-like Gag Protein Arc1 Binds RNA and Traffics across Synaptic Boutons, *Cell*, 172 (2018) 262-274.e211.
- [44] M. Radulovic, H. Stenmark, ESCRTs in membrane sealing, *Biochem Soc Trans*, 46 (2018) 773-778.
- [45] A. Mathew, A. Bell, R.M. Johnstone, Hsp-70 is closely associated with the transferrin receptor in exosomes from maturing reticulocytes, *Biochem J*, 308 (Pt 3) (1995) 823-830.
- [46] B.S. Batista, W.S. Eng, K.T. Pilobello, K.D. Hendricks-Muñoz, L.K. Mahal, Identification of a conserved glycan signature for microvesicles, *J Proteome Res*, 10 (2011) 4624-4633.
- [47] B.K. Thakur, H. Zhang, A. Becker, I. Matei, Y. Huang, B. Costa-Silva, Y. Zheng, A. Hoshino, H. Brazier, J. Xiang, C. Williams, R. Rodriguez-Barrueco, J.M. Silva, W.

Zhang, S. Hearn, O. Elemento, N. Paknejad, K. Manova-Todorova, K. Welte, J. Bromberg, H. Peinado, D. Lyden, Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection, *Cell Res*, 24 (2014) 766-769.

[48] M. Colombo, G. Raposo, C. Thery, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30 (2014) 255-289.

[49] S. Gurung, D. Perocheau, L. Touramanidou, J. Baruteau, The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling, *Cell Communication and Signaling*, 19 (2021) 47.

[50] S. Casado, M.D.T. Lobo, C.L. Paino, Dynamics of plasma membrane surface related to the release of extracellular vesicles by mesenchymal stem cells in culture, *Sci Rep-Uk*, 7 (2017).

[51] K.F. Francis, G.D. George, J.G. Stephen, A shared pathway of exosome biogenesis operates at plasma and endosome membranes, *bioRxiv*, (2019) 545228.

[52] M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, C. Thery, Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication, *Nature Cell Biology*, 21 (2019) 9-17.

[53] O. Schmidt, D. Teis, The ESCRT machinery, *Curr Biol*, 22 (2012) R116-120.

[54] M. Record, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, M.J.O. Wakelam, Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions, *J Lipid Res*, 59 (2018) 1316-1324.

[55] J. Donoso-Quezada, S. Ayala-Mar, J. Gonzalez-Valdez, The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications, *Traffic*, 22 (2021) 204-220.

[56] G. van Niel, S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, M.S. Marks, E. Rubinstein, G. Raposo, The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis, *Dev Cell*, 21 (2011) 708-721.

[57] L. Blanc, M. Vidal, New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion, *Small GTPases*, 9 (2018) 95-106.

[58] H.M. van Dongen, N. Masoumi, K.W. Witwer, D.M. Pegtel, Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery, *Microbiol Mol Biol Rev*, 80 (2016) 369-386.

- [59] L.A. Mulcahy, R.C. Pink, D.R. Carter, Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake, *J Extracell Vesicles*, 3 (2014).
- [60] S.V. Krylova, D. Feng, The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake, *Int J Mol Sci*, 24 (2023).
- [61] J. Saint-Pol, F. Gosselet, S. Duban-Deweer, G. Pottiez, Y. Karamanos, Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles, *Cells*, 9 (2020).
- [62] C. Gardiner, D.D. Vizio, S. Sahoo, C. Théry, K.W. Witwer, M. Wauben, A.F. Hill, Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey, *Journal of Extracellular Vesicles*, 5 (2016) 32945.
- [63] M.F. Peterson, N. Otoc, J.K. Sethi, A. Gupta, T.J. Antes, Integrated systems for exosome investigation, *Methods*, 87 (2015) 31-45.
- [64] C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids, *Current Protocols in Cell Biology*, 30 (2006) 3.22.21-23.22.29.
- [65] K.W. Witwer, E.I. Buzás, L.T. Bemis, A. Bora, C. Lässer, J. Lötvall, E.N. Nolte-'t Hoen, M.G. Piper, S. Sivaraman, J. Skog, C. Théry, M.H. Wauben, F. Hochberg, Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research, *J Extracell Vesicles*, 2 (2013).
- [66] P.H.L. Tran, T. Wang, W. Yin, T.T.D. Tran, H.T. Barua, Y. Zhang, S.B. Midge, T.N.G. Nguyen, B.J. Lee, W. Duan, Development of a nanoamorphous exosomal delivery system as an effective biological platform for improved encapsulation of hydrophobic drugs, *Int J Pharm*, 566 (2019) 697-707.
- [67] L. Paolini, A. Zendrini, G. Di Noto, S. Busatto, E. Lottini, A. Radeghieri, A. Dossi, A. Caneschi, D. Ricotta, P. Bergese, Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity, *Sci Rep*, 6 (2016) 23550.
- [68] S. Shu, C.L. Allen, S. Benjamin-Davalos, M. Koroleva, D. MacFarland, H. Minderman, M.S. Ernstoff, A Rapid Exosome Isolation Using Ultrafiltration and Size Exclusion Chromatography (REIUS) Method for Exosome Isolation from Melanoma Cell Lines, *Methods Mol Biol*, 2265 (2021) 289-304.
- [69] M. Popović, A. de Marco, Canonical and selective approaches in exosome purification and their implications for diagnostic accuracy, *Translational Cancer Research*, (2017) S209-S225.

- [70] M.Y. Konoshenko, E.A. Lekchnov, A.V. Vlassov, P.P. Laktionov, Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends, *Biomed Res Int*, 2018 (2018) 8545347.
- [71] K. Kim, J. Park, J.-H. Jung, R. Lee, J.-H. Park, J.M. Yuk, H. Hwang, J.H. Yeon, Cyclic tangential flow filtration system for isolation of extracellular vesicles, *APL Bioengineering*, 5 (2021) 016103.
- [72] G.H. Lathe, C.R. Ruthven, The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water, *Biochem J*, 60 (1955) xxxiv.
- [73] A. Gámez-Valero, M. Monguió-Tortajada, L. Carreras-Planella, M. Franquesa, K. Beyer, F.E. Borràs, Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents, *Sci Rep*, 6 (2016) 33641.
- [74] N. García-Romero, R. Madurga, G. Rackov, I. Palacín-Aliana, R. Núñez-Torres, A. Asensi-Puig, J. Carrión-Navarro, S. Esteban-Rubio, H. Peinado, A. González-Neira, V. González-Rumayor, C. Belda-Iniesta, A. Ayuso-Sacido, Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation, *J Transl Med*, 17 (2019) 75.
- [75] P.N. Brown, H. Yin, Polymer-Based Purification of Extracellular Vesicles, *Methods Mol Biol*, 1660 (2017) 91-103.
- [76] N. Kastelowitz, H. Yin, Exosomes and microvesicles: identification and targeting by particle size and lipid chemical probes, *Chembiochem*, 15 (2014) 923-928.
- [77] A.K. Rupp, C. Rupp, S. Keller, J.C. Brase, R. Ehehalt, M. Fogel, G. Moldenhauer, F. Marmé, H. Sülthmann, P. Altevogt, Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage, *Gynecol Oncol*, 122 (2011) 437-446.
- [78] C. Liu, C. Su, Design strategies and application progress of therapeutic exosomes, *Theranostics*, 9 (2019) 1015-1028.
- [79] S. Gholizadeh, M. Shehata Draz, M. Zarghooni, A. Sanati-Nezhad, S. Ghavami, H. Shafiee, M. Akbari, Microfluidic approaches for isolation, detection, and characterization of extracellular vesicles: Current status and future directions, *Biosens Bioelectron*, 91 (2017) 588-605.
- [80] S.S. Kanwar, C.J. Dunlay, D.M. Simeone, S. Nagrath, Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes, *Lab Chip*, 14 (2014) 1891-1900.

- [81] R.A. Dragovic, C. Gardiner, A.S. Brooks, D.S. Tannetta, D.J. Ferguson, P. Hole, B. Carr, C.W. Redman, A.L. Harris, P.J. Dobson, P. Harrison, I.L. Sargent, Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis, *Nanomedicine*, 7 (2011) 780-788.
- [82] R. Szatanek, M. Baj-Krzyworzeka, J. Zimoch, M. Lekka, M. Siedlar, J. Baran, The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization, *Int J Mol Sci*, 18 (2017).
- [83] G. Bryant, C. Abeynayake, J.C. Thomas, Improved Particle Size Distribution Measurements Using Multiangle Dynamic Light Scattering. 2. Refinements and Applications, *Langmuir*, 12 (1996) 6224-6228.
- [84] W. Anderson, R. Lane, D. Korbie, M. Trau, Observations of Tunable Resistive Pulse Sensing for Exosome Analysis: Improving System Sensitivity and Stability, *Langmuir*, 31 (2015) 6577-6587.
- [85] K. Shimbo, S. Miyaki, H. Ishitobi, Y. Kato, T. Kubo, S. Shimose, M. Ochi, Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration, *Biochem Biophys Res Commun*, 445 (2014) 381-387.
- [86] T. Katsuda, N. Kosaka, F. Takeshita, T. Ochiya, The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, *Proteomics*, 13 (2013) 1637-1653.
- [87] Y. Yuana, T.H. Oosterkamp, S. Bahatyrova, B. Ashcroft, P. Garcia Rodriguez, R.M. Bertina, S. Osanto, Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles, *J Thromb Haemost*, 8 (2010) 315-323.
- [88] S. Sharma, F. Zuñiga, G.E. Rice, L.C. Perrin, J.D. Hooper, C. Salomon, Tumor-derived exosomes in ovarian cancer - liquid biopsies for early detection and real-time monitoring of cancer progression, *Oncotarget*, 8 (2017) 104687-104703.
- [89] S. Sharma, M. LeClaire, J.K. Gimzewski, Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles, *Nanotechnology*, 29 (2018).
- [90] Y. Yuana, R.I. Koning, M.E. Kuil, P.C. Rensen, A.J. Koster, R.M. Bertina, S. Osanto, Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma, *J Extracell Vesicles*, 2 (2013).
- [91] M.P. Zaborowski, L. Balaj, X.O. Breakefield, C.P. Lai, Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study, *BioScience*, 65 (2015) 783-797.

- [92] A.V. Agronskaia, J.A. Valentijn, L.F. van Driel, C.T.W.M. Schneijdenberg, B.M. Humbel, P.M.P. van Bergen en Henegouwen, A.J. Verkleij, A.J. Koster, H.C. Gerritsen, Integrated fluorescence and transmission electron microscopy, *Journal of Structural Biology*, 164 (2008) 183-189.
- [93] E.J. van der Vlist, E.N. Nolte-'t Hoen, W. Stoorvogel, G.J. Arkesteijn, M.H. Wauben, Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry, *Nat Protoc*, 7 (2012) 1311-1326.
- [94] S. Hirano, Western Blot Analysis, in: J. Reineke (Ed.) *Nanotoxicity: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2012, pp. 87-97.
- [95] K. Stefanius, K. Servage, M. de Souza Santos, H.F. Gray, J.E. Toombs, S. Chimalapati, M.S. Kim, V.S. Malladi, R. Brekken, K. Orth, Human pancreatic cancer cell exosomes, but not human normal cell exosomes, act as an initiator in cell transformation, *Elife*, 8 (2019).
- [96] S.A. Melo, H. Sugimoto, J.T. O'Connell, N. Kato, A. Villanueva, A. Vidal, L. Qiu, E. Vitkin, L.T. Perelman, C.A. Melo, A. Lucci, C. Ivan, G.A. Calin, R. Kalluri, Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis, *Cancer Cell*, 26 (2014) 707-721.
- [97] M.T. Le, P. Hamar, C. Guo, E. Basar, R. Perdigão-Henriques, L. Balaj, J. Lieberman, miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis, *J Clin Invest*, 124 (2014) 5109-5128.
- [98] B.Y. Nabet, Y. Qiu, J.E. Shabason, T.J. Wu, T. Yoon, B.C. Kim, J.L. Benci, A.M. DeMichele, J. Tchou, J. Marcotrigiano, A.J. Minn, Exosome RNA Unshielding Couples Stromal Activation to Pattern Recognition Receptor Signaling in Cancer, *Cell*, 170 (2017) 352-366.e313.
- [99] R. Kalluri, V.S. LeBleu, The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, 367 (2020).
- [100] W. Zhou, M.Y. Fong, Y. Min, G. Somlo, L. Liu, M.R. Palomares, Y. Yu, A. Chow, S.T. O'Connor, A.R. Chin, Y. Yen, Y. Wang, E.G. Marcusson, P. Chu, J. Wu, X. Wu, A.X. Li, Z. Li, H. Gao, X. Ren, M.P. Boldin, P.C. Lin, S.E. Wang, Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis, *Cancer Cell*, 25 (2014) 501-515.
- [101] P. Kucharzewska, H.C. Christianson, J.E. Welch, K.J. Svensson, E. Fredlund, M. Ringnér, M. Mörgelin, E. Bourseau-Guilmain, J. Bengzon, M. Belting, Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (2013) 7312-7317.

- [102] T. Aung, B. Chapuy, D. Vogel, D. Wenzel, M. Oppermann, M. Lahmann, T. Weinlage, K. Menck, T. Hupfeld, R. Koch, L. Trümper, G.G. Wulf, Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (2011) 15336-15341.
- [103] L. Qu, J. Ding, C. Chen, Z.J. Wu, B. Liu, Y. Gao, W. Chen, F. Liu, W. Sun, X.F. Li, X. Wang, Y. Wang, Z.Y. Xu, L. Gao, Q. Yang, B. Xu, Y.M. Li, Z.Y. Fang, Z.P. Xu, Y. Bao, D.S. Wu, X. Miao, H.Y. Sun, Y.H. Sun, H.Y. Wang, L.H. Wang, Exosome-Transmitted lncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA, *Cancer Cell*, 29 (2016) 653-668.
- [104] B.B. Guo, S.A. Bellingham, A.F. Hill, Stimulating the Release of Exosomes Increases the Intercellular Transfer of Prions, *J Biol Chem*, 291 (2016) 5128-5137.
- [105] S. Baker, J.C. Polanco, J. Götz, Extracellular Vesicles Containing P301L Mutant Tau Accelerate Pathological Tau Phosphorylation and Oligomer Formation but Do Not Seed Mature Neurofibrillary Tangles in ALZ17 Mice, *J Alzheimers Dis*, 54 (2016) 1207-1217.
- [106] C. Castaño, S. Kalko, A. Novials, M. Párrizas, Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115 (2018) 12158-12163.
- [107] S. Srikanthan, W. Li, R.L. Silverstein, T.M. McIntyre, Exosome poly-ubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions, *J Thromb Haemost*, 12 (2014) 1906-1917.
- [108] A.N. Kapustin, M. Schoppet, L.J. Schurgers, J.L. Reynolds, R. McNair, A. Heiss, W. Jahnke-Dechent, T.M. Hackeng, G. Schlieper, P. Harrison, C.M. Shanahan, Prothrombin Loading of Vascular Smooth Muscle Cell-Derived Exosomes Regulates Coagulation and Calcification, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37 (2017) e22-e32.
- [109] H. Chen, L. Wang, X. Zeng, H. Schwarz, H.S. Nanda, X. Peng, Y. Zhou, Exosomes, a New Star for Targeted Delivery, *Front Cell Dev Biol*, 9 (2021) 751079.
- [110] X. Yang, B. Geng, J. Yan, L. Lin, X. Zhao, H. Xiao, H. Hu, L. Ye, I. Wenqi, W. Zeng, The role of exosomes in regulation and application of vascular homeostasis and vascular grafts, *Smart Materials in Medicine*, (2023).
- [111] M.S. Kim, M.J. Haney, Y. Zhao, V. Mahajan, I. Deygen, N.L. Klyachko, E. Inskoe, A. Piroyan, M. Sokolsky, O. Okolie, S.D. Hingtgen, A.V. Kabanov, E.V. Batrakova, Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells, *Nanomedicine*, 12 (2016) 655-664.

- [112] S. Kamekar, V.S. LeBleu, H. Sugimoto, S. Yang, C.F. Ruivo, S.A. Melo, J.J. Lee, R. Kalluri, Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer, *Nature*, 546 (2017) 498-503.
- [113] J. Mondal, S. Pillarisetti, V. Junnuthula, M. Saha, S.R. Hwang, I.-k. Park, Y.-k. Lee, Hybrid exosomes, exosome-like nanovesicles and engineered exosomes for therapeutic applications, *Journal of Controlled Release*, 353 (2023) 1127-1149.
- [114] M. Salehi, M. Sharifi, Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities, *J Cell Physiol*, 233 (2018) 6370-6380.
- [115] X. He, Z. Dong, Y. Cao, H. Wang, S. Liu, L. Liao, Y. Jin, L. Yuan, B. Li, MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing, *Stem Cells International*, 2019 (2019) 7132708.
- [116] T. Jiang, Z. Wang, J. Sun, Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cutaneous wound healing mediates through TGF- β /Smad signaling pathway, *Stem Cell Research & Therapy*, 11 (2020) 198.
- [117] S. Fang, C. Xu, Y. Zhang, C. Xue, C. Yang, H. Bi, X. Qian, M. Wu, K. Ji, Y. Zhao, Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs suppress myofibroblast differentiation by inhibiting the transforming growth factor- β /SMAD2 pathway during wound healing, *Stem cells translational medicine*, 5 (2016) 1425-1439.
- [118] Q. Li, S. Gong, W. Yao, Z. Yang, R. Wang, Z. Yu, M. Wei, Exosome loaded genipin crosslinked hydrogel facilitates full thickness cutaneous wound healing in rat animal model, *Drug Delivery*, 28 (2021) 884-893.
- [119] M. Wang, C. Wang, M. Chen, Y. Xi, W. Cheng, C. Mao, T. Xu, X. Zhang, C. Lin, W. Gao, Efficient angiogenesis-based diabetic wound healing/skin reconstruction through bioactive antibacterial adhesive ultraviolet shielding nanodressing with exosome release, *ACS nano*, 13 (2019) 10279-10293.
- [120] N. Xu, L. Wang, J. Guan, C. Tang, N. He, W. Zhang, S. Fu, Wound healing effects of a Curcuma zedoaria polysaccharide with platelet-rich plasma exosomes assembled on chitosan/silk hydrogel sponge in a diabetic rat model, *International journal of biological macromolecules*, 117 (2018) 102-107.
- [121] S. Zhou, Q. Wang, A. Huang, H. Fan, S. Yan, Q. Zhang, Advances in skin wound and scar repair by polymer scaffolds, *Molecules*, 26 (2021) 6110.
- [122] P.A. Shiekh, A. Singh, A. Kumar, Exosome laden oxygen releasing antioxidant and antibacterial cryogel wound dressing OxOBand alleviate diabetic and infectious wound healing, *Biomaterials*, 249 (2020) 120020.

- [123] N. Xu, L. Wang, J. Guan, C. Tang, N. He, W. Zhang, S. Fu, Wound healing effects of a Curcuma zedoaria polysaccharide with platelet-rich plasma exosomes assembled on chitosan/silk hydrogel sponge in a diabetic rat model, *Int J Biol Macromol*, 117 (2018) 102-107.
- [124] J. Wang, E.E. Bonacquisti, A.D. Brown, J. Nguyen, Boosting the Biogenesis and Secretion of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes, *Cells*, 9 (2020).
- [125] Z. Yang, J. Shi, J. Xie, Y. Wang, J. Sun, T. Liu, Y. Zhao, X. Zhao, X. Wang, Y. Ma, V. Malkoc, C. Chiang, W. Deng, Y. Chen, Y. Fu, K.J. Kwak, Y. Fan, C. Kang, C. Yin, J. Rhee, P. Bertani, J. Otero, W. Lu, K. Yun, A.S. Lee, W. Jiang, L. Teng, B.Y.S. Kim, L.J. Lee, Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation, *Nat Biomed Eng*, 4 (2020) 69-83.
- [126] W. Pan, H. Chen, A. Wang, F. Wang, X. Zhang, Challenges and strategies: Scalable and efficient production of mesenchymal stem cells-derived exosomes for cell-free therapy, *Life Sciences*, 319 (2023) 121524.
- [127] J. Wang, D. Chen, E.A. Ho, Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems, *J Control Release*, 329 (2021) 894-906.
- [128] S. Rahmati, M. Khazaei, A. Nadi, M. Alizadeh, L. Rezakhani, Exosome-loaded scaffolds for regenerative medicine in hard tissues, *Tissue and Cell*, 82 (2023) 102102.
- [129] G.D. Kusuma, M. Barabadi, J.L. Tan, D.A.V. Morton, J.E. Frith, R. Lim, To Protect and to Preserve: Novel Preservation Strategies for Extracellular Vesicles, *Front Pharmacol*, 9 (2018) 1199.
- [130] Q. Shi, Z. Qian, D. Liu, J. Sun, X. Wang, H. Liu, J. Xu, X. Guo, GMSC-Derived Exosomes Combined with a Chitosan/Silk Hydrogel Sponge Accelerates Wound Healing in a Diabetic Rat Skin Defect Model, *Front Physiol*, 8 (2017) 904.
- [131] K. Wu, C. He, Y. Wu, X. Zhou, P. Liu, W. Tang, M. Yu, W. Tian, Preservation of Small Extracellular Vesicle in Gelatin Methacryloyl Hydrogel Through Reduced Particles Aggregation for Therapeutic Applications, *Int J Nanomedicine*, 16 (2021) 7831-7846.
- [132] Ş. Öztürk, R. Shahbazi, N.D. Zeybek, B. Kurum, M. Gultekinoglu, E.A. Aksoy, M. Demircin, K. Ulubayram, Assessment of electromechanically stimulated bone marrow stem cells seeded acellular cardiac patch in a rat myocardial infarct model, *Biomed Mater*, 16 (2021).
- [133] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent

mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8 (2006) 315-317.

[134] D.B. Patel, K.M. Gray, Y. Santharam, T.N. Lamichhane, K.M. Stroka, S.M. Jay, Impact of cell culture parameters on production and vascularization bioactivity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, *Bioengineering & Translational Medicine*, 2 (2017) 170-179.

[135] C. Gorgun, D. Ceresa, R. Lesage, F. Villa, D. Reverberi, C. Balbi, S. Santamaria, K. Cortese, P. Malatesta, L. Geris, R. Quarto, R. Tasso, Dissecting the effects of preconditioning with inflammatory cytokines and hypoxia on the angiogenic potential of mesenchymal stromal cell (MSC)-derived soluble proteins and extracellular vesicles (EVs), *Biomaterials*, 269 (2021) 120633.

[136] J. Chen, R. Liu, T. Huang, H. Sun, H. Jiang, Adipose stem cells-released extracellular vesicles as a next-generation cargo delivery vehicles: a survey of minimal information implementation, mass production and functional modification, *Stem Cell Research & Therapy*, 13 (2022) 1-16.

[137] C. Han, J. Zhou, C. Liang, B. Liu, X. Pan, Y. Zhang, Y. Wang, B. Yan, W. Xie, F. Liu, X.Y. Yu, Y. Li, Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes encapsulated in functional peptide hydrogels promote cardiac repair, *Biomater Sci*, 7 (2019) 2920-2933.

[138] C. Théry, K.W. Witwer, E. Aikawa, M.J. Alcaraz, J.D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G.K. Atkin-Smith, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *Journal of extracellular vesicles*, 7 (2018) 1535750.

[139] K.W. Witwer, E.I. Buzás, L.T. Bemis, A. Bora, C. Lässer, J. Lötvall, E.N. Nolte-'T Hoen, M.G. Piper, S. Sivaraman, J. Skog, C. Théry, M.H. Wauben, F. Hochberg, Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2 (2013) 20360.

[140] W. Zhang, L. Jiang, R.J. Diefenbach, D.H. Campbell, B.J. Walsh, N.H. Packer, Y. Wang, Enabling Sensitive Phenotypic Profiling of Cancer-Derived Small Extracellular Vesicles Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Nanotags, *ACS Sensors*, 5 (2020) 764-771.

[141] B. Vestad, A. Llorente, A. Neurauter, S. Phuyal, B. Kierulf, P. Kierulf, T. Skotland, K. Sandvig, K.B.F. Haug, R. Øvstebø, Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study, *Journal of Extracellular Vesicles*, 6 (2017) 1344087.

- [142] C. Gorgun, M.E.F. Palamà, D. Reverberi, M.C. Gagliani, K. Cortese, R. Tasso, C. Gentili, Role of Extracellular Vesicles from Adipose Tissue- and Bone Marrow-Mesenchymal Stromal Cells in Endothelial Proliferation and Chondrogenesis, *Stem Cells Translational Medicine*, 10 (2021) 1680-1695.
- [143] T. Kahraman, G. Gucluler, I. Simsek, F.C. Yagci, M. Yildirim, C. Ozen, A. Dinc, M. Gursel, L. Ikromzoda, T. Sutlu, Circulating LL37 targets plasma extracellular vesicles to immune cells and intensifies Behçet's disease severity, *Journal of Extracellular Vesicles*, 6 (2017) 1284449.
- [144] K.J. McKelvey, K.L. Powell, A.W. Ashton, J.M. Morris, S.A. McCracken, Exosomes: Mechanisms of Uptake, *J Circ Biomark*, 4 (2015) 7.
- [145] C.R. Justus, N. Leffler, M. Ruiz-Echevarria, L.V. Yang, In vitro cell migration and invasion assays, *J Vis Exp*, (2014).
- [146] M. Eldh, K. Ekström, H. Valadi, M. Sjöstrand, B. Olsson, M. Jernås, J. Lötvall, Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA, *PLoS One*, 5 (2010) e15353.
- [147] D.C. Snow-Lisy, E.S. Sabanegh Jr, M.K. Samplaski, V.B. Morris, V. Labhasetwar, Superoxide dismutase-loaded biodegradable nanoparticles targeted with a follicle-stimulating hormone peptide protect Sertoli cells from oxidative stress, *Fertil Steril*, 101 (2014) 560-567. e563.
- [148] M.G. Tonnesen, X. Feng, R.A.F. Clark, Angiogenesis in Wound Healing, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5 (2000) 40-46.
- [149] S. Sahoo, E. Klychko, T. Thorne, S. Misener, K.M. Schultz, M. Millay, A. Ito, T. Liu, C. Kamide, H. Agrawal, H. Perlman, G. Qin, R. Kishore, D.W. Losordo, Exosomes From Human CD34⁺ Stem Cells Mediate Their Proangiogenic Paracrine Activity, *Circulation Research*, 109 (2011) 724-728.
- [150] G. Eke, N. Mangir, N. Hasirci, S. MacNeil, V. Hasirci, Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering, *Biomaterials*, 129 (2017) 188-198.
- [151] T. Valdes, D. Kreutzer, F. Moussy, The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62 (2002) 273-282.

- [152] N. Mangir, C.J. Hillary, C.R. Chapple, S. MacNeil, Oestradiol-releasing biodegradable mesh stimulates collagen production and angiogenesis: an approach to improving biomaterial integration in pelvic floor repair, *European urology focus*, 5 (2019) 280-289.
- [153] N. Mangir, Developing biocompatible materials with improved angiogenic potential for surgical treatment of stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse, University of Sheffield, 2019.
- [154] M. Baker, S.D. Robinson, T. Lechertier, P.R. Barber, B. Tavora, G. D'Amico, D.T. Jones, B. Vojnovic, K. Hodivala-Dilke, Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis, *Nature Protocols*, 7 (2012) 89-104.
- [155] M. Baker, S.D. Robinson, T. Lechertier, P.R. Barber, B. Tavora, G. D'Amico, D.T. Jones, B. Vojnovic, K. Hodivala-Dilke, Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis, *Nat Protoc*, 7 (2011) 89-104.
- [156] G. Merckx, B. Hosseinkhani, S. Kuypers, S. Deville, J. Irobi, I. Nelissen, L. Michiels, I. Lambrichts, A. Bronckaers, Angiogenic effects of human dental pulp and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles, *Cells*, 9 (2020) 312.
- [157] N.-C. Cheng, W.-J. Lin, T.-Y. Ling, T.-H. Young, Sustained release of adipose-derived stem cells by thermosensitive chitosan/gelatin hydrogel for therapeutic angiogenesis, *Acta biomaterialia*, 51 (2017) 258-267.
- [158] F.M. Elahi, D.G. Farwell, J.A. Nolte, J.D. Anderson, Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells, *Stem cells*, 38 (2020) 15-21.
- [159] R.A. Musina, E.S. Bekchanova, G.T. Sukhikh, Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 139 (2005) 504-509.
- [160] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *science*, 284 (1999) 143-147.
- [161] L. Jackson, D. Jones, P. Scotting, V. Sottile, Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications, *Journal of postgraduate medicine*, 53 (2007) 121.
- [162] L.D.S. Meirelles, N.B. Nardi, Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization, *British Journal of Haematology*, 123 (2003) 702-711.

- [163] H. Aksel, Ş. Öztürk, A. Serper, K. Ulubayram, VEGF/BMP-2 loaded three-dimensional model for enhanced angiogenic and odontogenic potential of dental pulp stem cells, *International endodontic journal*, (2017).
- [164] S. Ozturk, R. Shahbazi, N.D. Zeybek, B. Kurum, M. Gultekinoglu, E. Aksoy, M. Demircin, K. Ulubayram, Assessment of electromechanically stimulated bone marrow stem cells seeded acellular cardiac patch in a rat myocardial infarct model, *Biomedical Materials*, (2021).
- [165] G. Siegel, T. Kluba, U. Hermanutz-Klein, K. Bieback, H. Northoff, R. Schäfer, Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells, *BMC Medicine*, 11 (2013) 146.
- [166] S. Giancaterino, C. Boi, Alternative biological sources for extracellular vesicles production and purification strategies for process scale-up, *Biotechnology Advances*, 63 (2023) 108092.
- [167] S.K. Sudakov, E.V. Alekseeva, G.A. Nazarova, V.G. Bashkatova, Age-related individual behavioural characteristics of adult wistar rats, *Animals*, 11 (2021) 2282.
- [168] C. Li, G.J. Wei, Q. Gu, G. Wen, B.C. Qi, L. Xu, S.Q. Tao, Donor Age and Cell Passage Affect Osteogenic Ability of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, *Cell Biochem. Biophys.*, 72 (2015) 543-549.
- [169] H. Alzer, H. Kalbouneh, F. Alsoleihat, N. Abu Shahin, S. Ryalat, M. Alsalem, H. Alahmad, L. Tahtamouni, Age of the donor affects the nature of in vitro cultured human dental pulp stem cells, *Saudi Dent. J.*, 33 (2021) 524-532.
- [170] S. Huang, C.J. Feng, Y. Wu, S.M. Yang, K. Ma, X. Wu, X.B. Fu, Dissimilar characteristics of umbilical cord mesenchymal stem cells from donors of different ages, *Cell Tissue Banking*, 14 (2013) 707-713.
- [171] N. Bryan, K.D. Andrews, M.J. Loughran, N.P. Rhodes, J.A. Hunt, Elucidating the contribution of the elemental composition of fetal calf serum to antigenic expression of primary human umbilical-vein endothelial cells in vitro, *Bioscience reports*, 31 (2011) 199-210.
- [172] A. Grigor'Eva, N. Dyrkheeva, O. Bryzgunova, S. Tamkovich, B. Chelobanov, E. Ryabchikova, Contamination of exosome preparations, isolated from biological fluids, *Biochemistry (Moscow)*, Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 11 (2017) 265-271.
- [173] J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J.P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, C. Théry, Proteomic comparison defines novel markers to

characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (2016) E968-E977.

[174] Q. Wu, X. Fu, X. Li, J. Li, W. Han, Y. Wang, Modification of adipose mesenchymal stem cells-derived small extracellular vesicles with fibrin-targeting peptide CREKA for enhanced bone repair, *Bioactive Materials*, 20 (2023) 208-220.

[175] B.M. Lehrich, Y. Liang, M.S. Fiandaca, Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses, *J Extracell Vesicles*, 10 (2021) e12061.

[176] J.Y. Kim, W.-K. Rhim, H.J. Seo, J.Y. Lee, C.G. Park, D.K. Han, Comparative Analysis of MSC-Derived Exosomes Depending on Cell Culture Media for Regenerative Bioactivity, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 18 (2021) 355-367.

[177] J.M. Gudbergsson, K.B. Johnsen, M.N. Skov, M. Duroux, Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures, *Cytotechnology*, 68 (2016) 579-592.

[178] W.K. Wan Safwani, C.W. Wong, K.W. Yong, J.R. Choi, N.A. Mat Adenan, S.Z. Omar, W.A. Wan Abas, B. Pingguan-Murphy, The effects of hypoxia and serum-free conditions on the stemness properties of human adipose-derived stem cells, *Cytotechnology*, 68 (2016) 1859-1872.

[179] R.A. Haraszti, R. Miller, M.L. Dubuke, H.E. Rockwell, A.H. Coles, E. Sapp, M.-C. Didiot, D. Echeverria, M. Stoppato, Y.Y. Sere, Serum deprivation of mesenchymal stem cells improves exosome activity and alters lipid and protein composition, *Iscience*, 16 (2019) 230-241.

[180] M.A. Livshits, E. Khomyakova, E.G. Evtushenko, V.N. Lazarev, N.A. Kulemin, S.E. Semina, E.V. Generozov, V.M. Govorun, Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol, *Sci Rep-Uk*, 5 (2015) 17319.

[181] E.I. Yakubovich, A.G. Polischouk, V.I. Evtushenko, Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids, *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 16 (2022) 115-126.

[182] A. Cvjetkovic, J. Lötvall, C. Lässer, The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles, *Journal of extracellular vesicles*, 3 (2014) 23111.

[183] F. Momen-Heravi, L. Balaj, S. Alian, P.-Y. Mantel, A.E. Halleck, A.J. Trachtenberg, C.E. Soria, S. Oquin, C.M. Bonebreak, E. Saracoglu, Current methods for the isolation of extracellular vesicles, *Biological chemistry*, 394 (2013) 1253-1262.

- [184] E. Van Der Pol, F.A.W. Coumans, A.E. Grootemaat, C. Gardiner, I.L. Sargent, P. Harrison, A. Sturk, T.G. Van Leeuwen, R. Nieuwland, Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing, *J Thromb Haemost*, 12 (2014) 1182-1192.
- [185] E. Ciftci, N. Bozbeyoglu, I. Gursel, F. Korkusuz, F. Bakan Misirlioglu, P. Korkusuz, Comparative analysis of magnetically activated cell sorting and ultracentrifugation methods for exosome isolation, *PLoS One*, 18 (2023) e0282238.
- [186] Z. Nizamudeen, R. Markus, R. Lodge, C. Parmenter, M. Platt, L. Chakrabarti, V. Sottile, Rapid and accurate analysis of stem cell-derived extracellular vesicles with super resolution microscopy and live imaging, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1865 (2018) 1891-1900.
- [187] K. Zhang, X. Zhao, X. Chen, Y. Wei, W. Du, Y. Wang, L. Liu, W. Zhao, Z. Han, D. Kong, Q. Zhao, Z. Guo, Z. Han, N. Liu, F. Ma, Z. Li, Enhanced Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes with an Injectable Hydrogel for Hindlimb Ischemia Treatment, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10 (2018) 30081-30091.
- [188] S. Abolghait, S. Abdelkader, M. Aboushelib, E. Omar, R. Mehanna, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and extracellular vesicles enriched collagen chitosan scaffold in skin wound healing (a rat model), *Journal of Biomaterials Applications*, 36 (2021) 128-139.
- [189] S. Kalimuthu, P. Gangadaran, R.L. Rajendran, L. Zhu, J.M. Oh, H.W. Lee, A. Gopal, S.H. Baek, S.Y. Jeong, S.-W. Lee, A new approach for loading anticancer drugs into mesenchymal stem cell-derived exosome mimetics for cancer therapy, *Frontiers in pharmacology*, 9 (2018) 1116.
- [190] J. Yang, X. Zhang, X. Chen, L. Wang, G. Yang, Exosome Mediated Delivery of miR-124 Promotes Neurogenesis after Ischemia, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 7 (2017) 278-287.
- [191] Q. Wei, L. Wei, J. Zhang, Z. Li, H. Feng, L. Ren, EphA2-enriched exosomes promote cell migration and are a potential diagnostic serum marker in pancreatic cancer, *Molecular Medicine Reports*, (2020).
- [192] S.L. Li, N. An, B. Liu, S.Y. Wang, J.J. Wang, Y. Ye, Exosomes from LNCaP cells promote osteoblast activity through miR-375 transfer, *Oncology Letters*, (2019).
- [193] A. Grada, M. Otero-Vinas, F. Prieto-Castrillo, Z. Obagi, V. Falanga, Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay, *Journal of Investigative Dermatology*, 137 (2017) e11-e16.

- [194] L. Hu, J. Wang, X. Zhou, Z. Xiong, J. Zhao, R. Yu, F. Huang, H. Zhang, L. Chen, Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts, *Sci Rep-Uk*, 6 (2016) 32993.
- [195] T. Wang, Z. Jian, A. Baskys, J. Yang, J. Li, H. Guo, Y. Hei, P. Xian, Z. He, Z. Li, N. Li, Q. Long, MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system, *Biomaterials*, 257 (2020) 120264.
- [196] I. Arnaoutova, J. George, H.K. Kleinman, G. Benton, The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art, *Angiogenesis*, 12 (2009) 267-274.
- [197] X. Geng, Y. Qi, X. Liu, Y. Shi, H. Li, L. Zhao, A multifunctional antibacterial and self-healing hydrogel laden with bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes for accelerating diabetic wound healing, *Biomaterials Advances*, 133 (2022) 112613.
- [198] J. Liu, Z. Yan, F. Yang, Y. Huang, Y. Yu, L. Zhou, Z. Sun, D. Cui, Y. Yan, Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Enhancing Angiogenesis through Delivering Angiopoietin-2, *Stem Cell Reviews and Reports*, 17 (2021) 305-317.
- [199] Y. Han, J. Ren, Y. Bai, X. Pei, Y. Han, Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 109 (2019) 59-68.
- [200] P. Gondaliya, A.A. Sayyed, P. Bhat, M. Mali, N. Arya, A. Khairnar, K. Kalia, Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Loaded with miR-155 Inhibitor Ameliorate Diabetic Wound Healing, *Molecular Pharmaceutics*, 19 (2022) 1294-1308.
- [201] K.Y. Han, J.A. Tran, J.H. Chang, D.T. Azar, J.D. Zieske, Potential role of corneal epithelial cell-derived exosomes in corneal wound healing and neovascularization, *Sci Rep*, 7 (2017) 40548.
- [202] J. Hasan, S.D. Shnyder, M. Bibby, J.A. Double, R. Bicknel, G.C. Jayson, Quantitative angiogenesis assays in vivo--a review, *Angiogenesis*, 7 (2004) 1-16.
- [203] F.Z. Kocak, A.C. Talari, M. Yar, I.U. Rehman, In-situ forming pH and thermosensitive injectable hydrogels to stimulate angiogenesis: Potential candidates for fast bone regeneration applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020) 1633.

- [204] Y. Gao, Z. Yuan, X. Yuan, Z. Wan, Y. Yu, Q. Zhan, Y. Zhao, J. Han, J. Huang, C. Xiong, Q. Cai, Bioinspired porous microspheres for sustained hypoxic exosomes release and vascularized bone regeneration, *Bioactive Materials*, 14 (2022) 377-388.
- [205] B. Safari, M. Aghazadeh, S. Davaran, L. Roshangar, Exosome-loaded hydrogels: A new cell-free therapeutic approach for skin regeneration, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 171 (2022) 50-59.
- [206] K. Ulubayram, E. Aksu, S.I.D. Gurhan, K. Serbetci, N. Hasirci, Cytotoxicity evaluation of gelatin sponges prepared with different cross-linking agents, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 13 (2002) 1203-1219.
- [207] S. Young, M. Wong, Y. Tabata, A.G. Mikos, Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules, *J Control Release*, 109 (2005) 256-274.
- [208] R. Imani, M. Rafienia, S.H. Emami, Synthesis and characterization of glutaraldehyde-based crosslinked gelatin as a local hemostat sponge in surgery: an in vitro study, *Biomed Mater Eng*, 23 (2013) 211-224.
- [209] A. De Donatis, F. Ranaldi, P. Cirri, Reciprocal control of cell proliferation and migration, *Cell Communication and Signaling*, 8 (2010) 20.
- [210] H. Lv, H. Liu, T. Sun, H. Wang, X. Zhang, W. Xu, Exosome derived from stem cell: A promising therapeutics for wound healing, *Front Pharmacol*, 13 (2022) 957771.
- [211] D. Ribatti, A. Gualandris, M. Bastaki, A. Vacca, M. Iurlaro, L. Roncali, M. Presta, New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay, *J Vasc Res*, 34 (1997) 455-463.
- [212] G. Merckx, B. Hosseinkhani, S. Kuypers, S. Deville, J. Irobi, I. Nelissen, L. Michiels, I. Lambrichts, A. Bronckers, Angiogenic Effects of Human Dental Pulp and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells and their Extracellular Vesicles, *Cells*, 2020.
- [213] G. Li, Y. Zhang, J. Wu, R. Yang, Q. Sun, Y. Xu, B. Wang, M. Cai, Y. Xu, C. Zhuang, L. Wang, Adipose stem cells-derived exosomes modified gelatin sponge promotes bone regeneration, *Front Bioeng Biotechnol*, 11 (2023) 1096390.