

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA EKSOZOM TEMELLİ
TEDAVİ YAKLAŞIMLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Burçak YAVUZ

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Haziran, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA EKSOZOM TEMELLİ TEDAVİ
YAKLAŞIMLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Burçak YAVUZ tarafından hazırlanan tez çalışması 06.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Emrah Ş. ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emrah Ş. ABAMOR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İREZ, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek BALIK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Serap DERMAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI, Üye
İstinye Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR sorumluluğunda tarafımca hazırlanan **“Nörodejeneratif Hastalıklarda Eksozom Temelli Tedavi Yaklaşımlarının Geliştirilmesi”** başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Burçak YAVUZ

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün BAP-2021-4713 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Anneme,

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi, sabır ve desteğini benden esirgemeyen tecrübeleriyle daima yol gösteren Yıldız Teknik Üniversitesi Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı kurucuları çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melahat BAĞIROVA'ya, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bütün tez süreci boyunca bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, tecrübeleri ile yol gösteren, önerileri ve değerlendirmeleri ile çalışmaya katkıda bulunan çok değerli tez izleme komitesi jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Dr. Tülay İREZ'e ve Prof. Dilek TURGUT BALIK'a,

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünün kurucuları rahmetli hocalarımız Sayın Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE ve Sayın Prof. Dr. Huriye KUZU'ya,

Yıldız Teknik Üniversitesi sayın Rektör Hocam Prof. Dr. Tamer YILMAZ başta olmak üzere Fen Bilimleri Enstitüsüne, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Biyomühendislik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN'e ve bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına,

Tez sürecim boyunca her zaman desteğini içten hissettiğim bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan çok değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI ve İstinye Üniversitesi Arştırma ve Geliştirme Merkezi Doku Mühendisliği Laboratuvarı çalışanlarına,

Ayrıca değerli katkılarından dolayı Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi sayın Hocam Prof. Dr. Işıl KURNAZ'a ve İstanbul Medeniyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi sayın Hocam Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'a

Bu yolu beraber yürüdüğüm, her engeli beraber aştığım ve iyi ki tanıdığım dediğim çok kıymetli çalışma arkadaşım Aslı Pınar ZORBA YILDIZ ve değerli ailesine,

Hayatımın her alanında desteğini benden esirgemeyen kıymetli dostum Öğr. Gör. İrem ŞENSES'e,

ve doğduğum andan bugüne kadar beni özveriyle yetiştiren, maddi manevi bütün destekleri sağlayan, beni bu günlere getiren, karşılıksız sevgi ve güvenlerini bir gün olsun esirgemeyen, onların kızı olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim canımdan çok sevdiğim annem Fatma YAVUZ, babam Nürsel YAVUZ ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

İstanbul 2022,

Burçak YAVUZ



İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	XVII
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 Nörodejeneratif Hastalıklar	6
2.1.1 Parkinson Hastalığı.....	7
2.2 Ekstraselüler Veziküller	11
2.3. Eksozomlar	12
2.3.1 Eksozom biyogenezi	13
2.3.3 Eksozom Bileşenleri.....	16
2.3.4 Hücreler Arası iletişimde Eksozomlar.....	18
2.3.5 Eksozom İzolasyonu ve Yöntemleri.....	19
2.3.6 Eksozom Karakterizasyonu.....	25
2.3.7 Eksozomların Tanı ve Tedavi Amaçlı kullanımı.....	27
2.3.8 Eksozom Tabanlı İlaç Dağıtım Sistemleri.....	29
2.3.9 Mezenkimal Kök Hücrelerden (MKH) Elde Edilen Eksozomların Özellikleri.....	34
2.4 Biyomalzemeler.....	34
2.4.1 Biyomalzemelerin 3Boyutlu (3B) Hücre Kültüründe Uygulamaları.....	35
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	40
3.1 Materyal.....	40
3.1.1 Ekipman.....	40
3.1.2 Kimyasallar.....	41
3.2 Deneylerde Kullanılan Besiyerleri, Tampon ve Kimyasalların Hazırlanması.....	42
3.2.1 Tamponlar.....	42

3.2.2 Besiyeri.....	42
3.3 Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu	42
3.3.1 Wharton Jeli Mezenkimal kök hücreleri (WJ-MKHs) Çoğaltılması ve Kriyoprezervasyonu.....	43
3.3.2 WJ-MKH Kökenli Eksozomların İzolasyonu.....	44
3.3.3 Eksozomların Karakterizasyonu.....	45
3.3.4 Eksozomlara Dopamin Yüklenmesi	46
3.3.5 Dopamin Yüklü Eksozomların Karakterizasyonu	47
3.3.6 Dopamin Yüklü Eksozomlar ve Eksozomların in vitro Sitotoksik Etkisinin Hücre Canlılık Testi ile Belirlenmesi.....	50
3.4 3B kültür Ortamının Hazırlanması ve Parkinson Modelin Oluşturulması...51	
3.4.1 3B Kültür Ortamının Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	51
3.4.2 Dopaminerjik Nöroblastoma Hücre Hattının (SH-SY5Y) Kültüre Edilmesi ve 3B Kültür Ortamının Hazırlanması.....	55
3.4.3 2B ve 3B Kültür Ortamında In vitro Parkinson Modelinin Oluşturulması Dopamin Yüklü Eksozomlar ve Eksozomların Terapötik Etkinliğinin Araştırılması.....	56
3.5 İstatistik Analiz.....	61
4 DENEYSEL SONUÇ	62
4.1. WJ-MKHs Kökenli Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	62
4.2. Dopamin Yüklü Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	64
4.2.2 İlaç Yükleme Kapasitesi.....	66
4.2.3 İn Vitro İlaç Salım Kinetiği.....	66
4.3 Dopamin Yüklü Eksozomlar ve Eksozomların in vitro Sitotoksik Etkisinin Hücre Canlılık Testi ile Belirlenmesi.....	67
4.4 3B kültür Ortamının Hazırlanması ve Parkinson Modelin Oluşturulması....69	
4.4.1 Dopaminerjik Nöroblastoma Hücre Hattının (SH-SY5Y) Kültüre Edilmesi ve 3B Kültür Ortamının Oluşturulması.....	72
4.4.2 2B ve 3B Kültür Ortamı Oluşturulan SH-SY5Y Hücre Hattında Parkinson Modeli Oluşturma ve Dopamin Yüklü Eksozomlar Terapötik Etkinliğinin Araştırılması.....	74
4.4.3 Görüntü Analizi.....	78
4.4.4 İmmün Boyama.....	84
SONUÇ VE ÖNERİLER	87
KAYNAKÇA	93
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	114

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
ml	Mililitre
Mg	Miligram
μ g	Mikrogram
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece



KISALTMA LİSTESİ

AH	Alzheimer hastalığı
A β	Amiploid Beta
ALS	Amiyotrofik lateral skleroz
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BDNF	Beyinden türetilmiş nörotrofik faktör
CASI	Sürekli Apomorfin Subkutan İnfüzyonu
DBS	Derin Beyin Stimülasyonu cerrahisi
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMEM –F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium- F12
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Hücre dışı matris
ESCRT	Endozomal sıralama kompleksi taşıyım
EV	Ekstraselüler veziküller
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GDNF	Gial hücre hattından türetilmiş nörotrofik faktör
HH	Huntington hastalığı
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ILV	intralüminal veziküllerin
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LC	Lewy cisimleri
LCIG	Levodopa-Carbidopa Bağırsak Jeli infüzyon
LN	Lewy nörit
LP	Lewy patolojisi
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MVE	Multiveziküler endozom
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Mikro RNA
MTT	Thylazoyl blue tetrazolium bromide
NTA	Nanoparçacık izleme analizi
PEG	Polietilen glikol

PEI	Polietilenimin
PH	Parkinson Hastalığı
pHEMA	Poli-2-hidroksietil metakrilat
PS	Fosfatidilserin
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
PTX	Paklitaksel
RBD	Uyku davranış bozukluğu
SEC	Boyut dışlama kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SH-SY5Y	Nöroblastoma hücre hattı
SM	Sfingomiyelin
SN	substantia Nigra
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
WJ	Wharton Jeli
VEGF	Endotel büyüme faktörü
2B	2 boyutlu
3B	3 boyutlu
6-OHDA	6-hidroksidopamin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Parkinson ve Sağlıklı birey beyin fonksiyonlarının karşılaştırılması	7
Şekil 2.2 PH evreleri ve klinik bulguları	9
Şekil 2.3 Eksozomların yapısı ve bileşimi	17
Şekil 2.4 3B kültür sisteminde sferoid oluşumu	36
Şekil 2.5 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 3.1 Wharton jeli hücrelerinin mikroskop görüntüsü	43
Şekil 3.2 Eksozom izolasyon prosedürü	45
Şekil 3.3 NTA cihazı	46
Şekil 3.4 Eksozom ilaç yükleme prosedürü.....	47
Şekil 3.5 MTT yöntemi.....	50
Şekil 3.6 Tripan Mavisi boyama prosedürü	53
Şekil 3.7 Bioinklerin damlatma yöntemi ile aktarımı.....	55
Şekil 3.8 SEM görüntüleme ve hazırlık aşaması.....	55
Şekil 4.1 Wharton Jeli hücrelerinin mikroskop görüntüsü	62
Şekil 4.2 WJ-MKH kökenli eksozomların NTA analizi.....	63
Şekil 4.3 WJ-MKH kökenli eksozomların DLS analizi.....	63
Şekil 4.4 Dopamin yüklü eksozomların NTA analizi.....	64
Şekil 4.5 DLS analizi.....	65
Şekil 4.6 Formülasyonunun HPLC analizi.....	66
Şekil 4.7 Kümülatif Salım Kinetiği.....	67
Şekil 4.8 Elde edilen formülasyonun sitotoksikite testi;	68
Şekil 4.9 Eksozomların sitotoksikite testi.....	69
Şekil 4.10 Baseink™ bioinkinin FTIR Analizi	70
Şekil 4.11 Hazırlanan bioinkin TEM görüntüleri.....	71
Şekil 4.12 SH-SY5Y hücre hattı.....	72
Şekil 4.13 SH-SY5Y hücre hattının 3 boyutlu kültür ortamında sferoid yapıları...	73
Şekil 4.14 SH-SY5Y hücre hattının 3 boyutlu kültür ortamında sferoid yapıları Floresans mikroskop görüntüsü.....	74
Şekil 4.15 2B Kültür ortamında 48 saatlik uygulamaların sonrasındaki Canlı&Ölü test sonuçlarını Floresan Mikroskop mikroskop görüntüleri.....	75

Şekil 4.16	2B Kültür ortamında 72 saatlik uygulamaların sonrasındaki Canlı&Ölü test sonuçlarını Floresan Mikroskop mikroskop görüntüleri.....	76
Şekil 4.17	3B Kültür ortamında 48 saatlik uygulamaların sonrasındaki Canlı&Ölü test sonuçlarını Floresan Mikroskop mikroskop görüntüleri	77
Şekil 4.18	3B Kültür ortamında 72 saatlik uygulamaların sonrasındaki Canlı&Ölü test sonuçlarını Floresan Mikroskop mikroskop görüntüleri.....	78
Şekil 4.19	Eğitilebilir Weka segmentasyonu 3B programı.	79
Şekil 4.20	48 saatlik uygulama sonuçlarının Weka analiz görüntüleri.....	81
Şekil 4.21	48 saatlik uygulama sonuçlarının Weka analiz verileri	82
Şekil 4.22	72 saatlik uygulama sonuçlarının Weka analiz görüntüleri.....	83
Şekil 4.23	48 saatlik uygulama sonuçlarının Weka analiz verileri.....	84
Şekil 4.24	İmmün Boyama sonuçları.....	85
Şekil 4.25	İmmün Boyama sonuçları.....	86

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Eksozom izolasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.....	24
Tablo 4.1 Zeta potansiyelleri.....	65



Nörodejeneratif Hastalıklarda Eksozom Temelli Tedavi Yaklaşımlarının Geliştirilmesi

Burçak YAVUZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Nörodejeneratif hastalıklar; merkezi sinir sisteminde yer alan nöronların yapısal veya fonksiyonel olarak işlev kayıpları ve kalıcı hasarları sonucunda ortaya çıkmaktadır. Günümüzde Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalık Parkinson hastalığıdır. 200 yıl önce tanısı koyulan bu hastalığın halen daha tedavisi bulunmamaktadır. Klinikte uygulanan tedaviler ise; destekleyici tedavinin ötesine geçememiş olup, sadece hastanın günlük yaşam kalitesini arttırma amacı taşımaktadır. Tedavisinin önündeki en büyük etmenler ise, geliştirilen formülasyonların kan beyin bariyerini geçmesi (KBB) ve rejenerasyonun sınırlı olması yatmaktadır. Bu yüzden Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmak özellikle KBB'ni geçebilen yeni nesil tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine büyük bir ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında; biyoaktif molekül olan eksozomlara dopamine yüklemesi yapılarak elde edilen formülasyonun Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmak alternatif tedavi yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Buna göre; Wharton jelly kök hücrelerinden(WJ-MKH'ler) eksozomlar izole edilmiş ve daha sonra inkübasyon yöntemi ile dopamin yüklemesi yapılmıştır. Elde edilen formülasyonda dopamin varlığı HPLC ile araştırılırken, yükleme

kapasitesi ve in vitro salım çalışması da yapılmıştır. Dopamin yüklü eksozomlar farklı konsantrasyonlarında sitotoksikite araştırılmıştır. Çalışmanın tamamlanan bu kısmının ardından, dopaminerjik nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) ile 2 Boyutlu (2B) ve 3 boyutlu (3B) kültür ortamı oluşturulmuş ve bu kültür ortamları 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) ile Parkinson modeline indüklenmiştir. Parkinson modelinin in vitro koşullarda oluşturulduktan sonra, dopamin yüklü eksozomlar uygulanarak terapötik etkinlik Canlı& Ölü (Live&Dead) analizi belirlenmiştir. Canlı&Ölü test analiz görüntüleri eğitilebilir Weka Programı ile işlenerek görüntü analizleri tamamlanmıştır. Bu analizlere ek terapötik etkinlik immün boyama yöntemi ile de araştırılmıştır. Bu arada nöron belirteci olarak bilinen Beta Tubulin-III (β -Tubulin) ekspresyon seviyesi incelenmiştir.

Sonuçlara göre; ilk defa, WJ-MKH'lerinden izole edilen eksozomlara dopamin yüklemesi başarıyla yapılmış olup formülasyon içeriğinde dopamin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca Parkinson hastalık modeline indüklenen 2B ve 3B kültür ortamlarındaki nöroprotektif etkisi kanıtlanmıştır. Buna göre eksozom temelli tedavi yaklaşımı Parkinson tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirileceğini öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: eksozom, ilaç taşıyıcı sistem, Parkinson hastalığı, 3B kültür ortamı, dopamin

Development of Exosome-Based Therapy Approaches for Neurodegenerative Diseases

Burçak YAVUZ

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah Sefik ABAMOR

Neurodegenerative diseases; It occurs as a result of structural or functional loss of function and permanent damage of neurons in the central nervous system. Today, Parkinson's disease is the most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. Although the mortality rate is low in Parkinson's disease(PD), which is known to be important factors, especially age and genetic predisposition, it is possible to come across patients who have this disease and struggle to survive for 20 years in the clinic. Diagnosed 200 years ago, this disease still has no cure. The treatments applied in the clinic are; It has not gone beyond supportive treatment, and it only aims to increase the patient's quality of daily life. The most important factors in front of its treatment are that the developed formulations cannot pass the blood-brain barrier (BBB) and neuronal regeneration is limited. Therefore, there is a great need for the development of new generation treatment approaches that can be used in the treatment of Parkinson's disease, especially those that can surpass BBB.

In this thesis study; It is aimed to develop an alternative treatment method for the use of the formulation obtained by loading dopamine into exosomes, which is a

bioactive molecule, in the treatment of Parkinson's disease. According to this; Exosomes from Wharton jelly stem cells (WJ-MSCs) were loaded with dopamine by the incubation method. With this method, dopamine loading into exosomes has been successfully completed. Then 2-Dimensional (2D) and 3-dimensional (3D) culture medium were created with the dopaminergic neuroblastoma cell line (SH-SY5Y), and these culture medium were induced to Parkinson's model. The therapeutic efficacy was investigated by Live&Dead analysis, processing these analysis images in the trainable Weka Program program and finally by immunostaining method. According to the results; The neuroprotective effect of dopamine-loaded exosomes has been proven in 2D and 3D culture medium induced in the PD model. Accordingly, we predict that exosome-based treatment methods will be considered as a promising approach in the treatment of Parkinson's.

Keywords: exosome, drug delivery system, Parkinson's disease, 3D culture medium, dopamine

1.1 Literatür Özeti

Merkezi sinir sisteminin bozulmasıyla ortaya çıkan nörolojik hastalıklar, dünya çapında engelliliğin ve ölümün başlıca nedenlerinden biridir. 2016 yılı verilerine göre ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Engellilik durumu ise en çok yine sinir sistemindeki bozukluk yada hasardan dolayı ortaya çıkmaktadır [1].

Nörodejeneratif hastalıklar her geçen gün artan prevalansı nedeniyle dikkat çekmeye başlanmıştır. Günümüzde en sık görülen nörodejeneratif hastalık arasında ikinci sırada Parkinson Hastalığı (PH) olduğu görülmüştür [2]. 1817 yılından James Parkinson tarafından tanılanan bu hastalık karmaşık, ilerleyici, nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanmıştır [3,4]. Hastalığın patolojisi; mezensefalonda bulunan substantia nigra pars compacta'daki (SN) dopaminerjik nöronların farklı sebeplerden dolayı dejenere olması ve buna bağlı olarak dopamin eksikliğiyle gelişen ve motor nöronların fonksiyon kaybıyla karakterize olmasıyla bilinmektedir [5]. PH'nın halen daha tedavisi bulunmamaktadır. Hatta patolojisi altında yatan pek çok mekanizma aydınlatılmamıştır. Bu yüzden gerek tedavisel yaklaşımları gerekse patolojisinin aydınlatılmasına yönelik özellikler eksozom temelli çalışmalar ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyoteknolojik çalışmaların hız kazanmasıyla birlikte, nano boyutta bir çok bileşenin de keşfinin önünü açılmıştır. Hücre membranından salgılanan köken aldığı hücrenin “parmak izi” olarak adlandırılan, hücreler arası iletişimin de çok önemli rol oynadığı bilinen eksozomlar da bu keşiflerin arasında yer almaktadır [6]. Nano boyuttaki bu yapılar, başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere pek çok hastalığın tanısında [7] ve tedavisinde özellikle ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilmesiyle yeni terapötik ajanlar oluşturulabileceğinin önünü açmıştır [8]. Ayrıca gerek somatik hücrelerden gerekse de kök hücrelerden eksozom izole edebiliyor olmak avantajlarından birisidir. Eksozomlar sahip oldukları bileşenler

ve morfolojik özellikleri sayesinde bir çok hastlığın tedavisi için seçilebilecek en önemli ajan olduğu düşünülmektedir. Omurilik hasarı oluşturulmuş sıçanlarda mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların enjeksiyonu sonucunda enflamasyonun azaldığı ve aynı zamanda nöronal rejenerasyona katkı sağladığı görülmüştür [9, 10, 11]. Mezenkimal kök hücre kökenli eksozomlar ile yapılan diğer bir çalışmada ise; Adipoz kök hücre kaynaklı eksozomların Alzheimer hastalığında yüksek seviyelerde salgılanan amiloid β ($A\beta$) peptidini parçalama özelliğine sahip neprilisin (NEP) enzimini eksprese ettiği, beyinde $A\beta$ seviyelerinde önemli ölçüde azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Bu nedenle eksozom temelli tedavinin hastalık seyrini olumlu etkilediği ve yeni terapötik ajan olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür [12]. Yapılan diğer bir çalışmada ise; 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile Parkinson modeli oluşturulmuş sıçanlarda mezenkimal kök hücre sekretomunun enjeksiyonundan sonra, kontrol grubuna kıyasla hayvan davranışlarında iyileşmelerin yaşandığı, nöronal düzenleyici molekül (endotel büyüme faktörü-VEGF, beyinden türetilmiş nörotrofik faktör-BDNF ve glial hücre hattından türetilmiş nörotrofik faktör- GDNF) seviyelerinin arttığı ve sekretomların özellikle dopaminerjik nöron hücreleri üzerinde nörotrofik ve nöroprotektif etki gösterdikleri rapor edilmiştir [13]. Chen ve ekibinin (2020) yapmış olduğu başka bir çalışma da ise, insan göbek kordonundan elden edilen eksozomların in vitro deneylerde 6-OHDA ile uyarılan SH-SY5Y hücre hattının proliferasyonuna katkıda bulunduğu, aynı zamanda Parkinson modeli oluşturulmuş ratlarda substantia nigradaki dopaminerjik nöron kaybını ve apoptozu azaltırken striatumdaki dopamin seviyesini yükselttiği tespit edilmiştir [14].

Diğer yandan çok sınırlı sayıda olmakla birlikte literatürde farklı kaynaklardan izole edilen eksozomlara ilaç yüklenmesi sonucunda elde edilen formülasyonların Parkinson hastalığına karşı ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, oksitadatif stres birikimi sonucunda dopaminerjik nöronlarda hasar oluşturulan hayvan modellerinde antioksidan etkinliği bilinen katalaz içeren eksozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak Parkinson hastalığı üzerindeki teröpatik etkinliğini araştırılmıştır. Raw 264.7 makrofaj hücrelerinden izole edilen eksozomlara donma-çözülme döngüleri,

sonikasyon ve ekstrüzyon yöntemleri ile katalaz yüklemesi gerçekleştirilerek eksozom temelli taşıyıcı sistemi geliştirilmiş ve in vitro/in vivo tedavi edici etkinlikleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda katalaz yüklü eksozomların beyindeki nöronlarda ve mikrogial hücrelerde verimli bir şekilde biriktiği ve güçlü bir nöroprotektif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında araştırmacılar eksozom temelli bir formülasyonun gelecekte nörodejeneratif bozuklukların tedavisi için değerli bir araç olabileceğini rapor etmiştir [15]. Başka bir çalışma da ise; Parkinson hastalığı oluşturulmuş rat modellerine intravenöz yolla, kandan izole edilen eksozomlara dopamin yüklemesi yapılarak geliştirilen formülasyonun serbest dopamine kıyasla tedavi edici etkinliğin daha yüksek olduğu ve geliştirilen taşıyıcı sistemin herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların Parkinson hastalığı başta olmak üzere diğer merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak değerlendirilmesinin umut vaat eden bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir [16].

Görüldüğü üzere, bugüne kadar Parkinson hastalığının tedavisinde mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı terapötik çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Yapılan tek çalışmada periferik kandan izole edilen eksozomlara dopamin yüklenmesiyle oluşturulan taşıyıcı sistemin terapötik etkinliği incelenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Nörodejeneratif hastalıklar arasında görülme sıklığı oldukça fazla olan Parkinson hastalığı için geliştirilen tedavi yöntemleri destekleyici tedavi olmanın ötesine geçememiş olup, sadece hastanın günlük yaşam kalitesini artırma amacı taşımaktadır. Özellikle yaş ve genetik yatkınlığın önemli faktörler olduğu bilinen Parkinson hastalığında mortalite oranı düşük olmakla birlikte bu hastalığa yakalanıp 20 yıl kadar yaşam mücadelesi veren hastalara klinikte rastlamak mümkündür. Tanısı 200 yıl önce koyulmuş Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere yeni nesil tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine büyük bir ihtiyaç duyulmaktadır. Bu proje kapsamında Parkinson hastalığına karşı

eksozomların ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı yeni, etkin ve güvenilir bir tedavi yaklaşımının geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu projede gerçekleştirilmesi planlanan işlemler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur;

Wharton Jeli kök hücrelerinden eksozom izolasyonu ve karakterizasyonunun yapılması,

Karakterizasyonu tamamlanmış eksozomlara dopamin yüklenmesi ve Nanopartikül karakterizasyonunun yapılması,

İlaç yükleme verimliliği ve *in vitro* salım kinetiği çalışmaları yapılması,

- Elde edilen Dopamin yüklü eksozomların ve *in vitro* çalışmalar ile sitotoksik etki araştırılması,
- 3 Boyutlu kültür ortamının oluşturma üzere Aljinat-Jelatin tabanlı BaseinkTM hazırlayarak karakterizasyon işlemlerinin yapılması,
- Dopaminerjik nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) 2 Boyutlu ve 3 Boyutlu kültür ortamının oluşturulması,
- Oluşturulan kültür ortamında, nörotoksin olarak bilinen 6-Hidroksidopamin (6-OHDA) ile PH modelinin oluşturulması,
- PH modeli üzerinden elde edilen dopamin yüklü eksozomların terapötik etkinliğinin araştırılması,
- Tüm sonuçlar değerlendirip istatistik analizi yapılarak projenin hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Eksozomların kan beyin bariyerini (KBB) geçebilecek boyutta olmasıyla merkezi sinir sistemi hastalıkları için alternatif bir tedavi yöntemini oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın hipotezi:

- Beyindeki substantia nigra bölgesinde yer alan dopaminerjik nöronların hasara uğraması sonucunda dopamin eksikliğiyle meydana gelen Parkinson hastalığının

kesin bir tedavisinin olmaması ve kullanılan ilaçların hastalığı iyileştirmek yerine hastanın yaşam kalitesini artırma amacı taşıması,

- Daha önce yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerden elden edilen eksozomların pek çok hastalığa karşı ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılması ve tek başına ilaç uygulamasına göre daha yüksek düzeyde terapötik etkinlik göstermeleri,

- Whaston jelly mezenkimal kök hücrelerinden elde edilen eksozomların daha önce Parkinson hastalığında ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmamış olması,

- Merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kan-beyin bariyerini aşabilecek ve ilgili bölgede uzun süreli salım yaparak ilaç birikimini sağlayabilecek taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulması ve böyle bir ajanın terapötik etkinliği araştırılmamış olmasıdır.

Bu bilgiler ışığında proje kapsamında, Parkinson hastalığına karşı eksozom temelli terapötik yaklaşımların araştırılması amaçlanmıştır. Mevcut projede Wharton jelly kök hücrelerden izole edilecek olan eksozomlara dopamin yüklemesi yapılacaktır. Elden edilen formülasyon hem 2B hem de 3B kültür ortamında terapötik etkinliği araştırılmıştır.

2.1 Nörodejeneratif Hastalıklar

Sinir sistemi yüksek organizmaların içsel ve dışsal çevresini algılamasını sağlayan, bilgi elde edebilen ve elde edilen bilgiyi işleyen, vücut içerisinde hücreler ağı sayesinde sinyallerin farklı bölgelere iletimini sağlayan, organların, kasların aktivitelerini düzenleyen en önemli sistemlerden birisidir. Sinir sistemi; merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Bu sistem için özelleşmiş ve nöron olarak adlandırılan hücreler, son derece spesifik bir ara bağlantı yoluyla uyarıların ve bilgilerin alınmasında rol oynayan uyarılabilir hücrelerdir. Buna göre nöronlar, hücre içi ve hücreler arası bilgi aktarabilme yeteneğine sahiptir.

Nörodejeneratif hastalıklar ise; merkezi ve periferik sinir sisteminden farklı etmenlerden dolayı ilerleyici kaybı ile giden ve bu kayba bağlı olarak sinir sistemi fonksiyonel yitimine neden olan hastalık grubudur [17]. Nörodejeneratif hastalık etiyolojisi hala belirsizdir, ancak çevresel etkiler ve genetik faktörler hastalığın ortaya çıkmasına katkı sağladığı bilinmektedir [18]. Yapılan çalışmalarda, çevresel faktörlere maruz kalma ile ortaya çıkan gen-çevre etkileşimi, nörodejeneratif hastalıkların başlangıcında ve ilerlemesinde çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir [19]. Bu hastalıkları genel olarak 2 sınıfa ayırmak mümkündür. Bunlar;

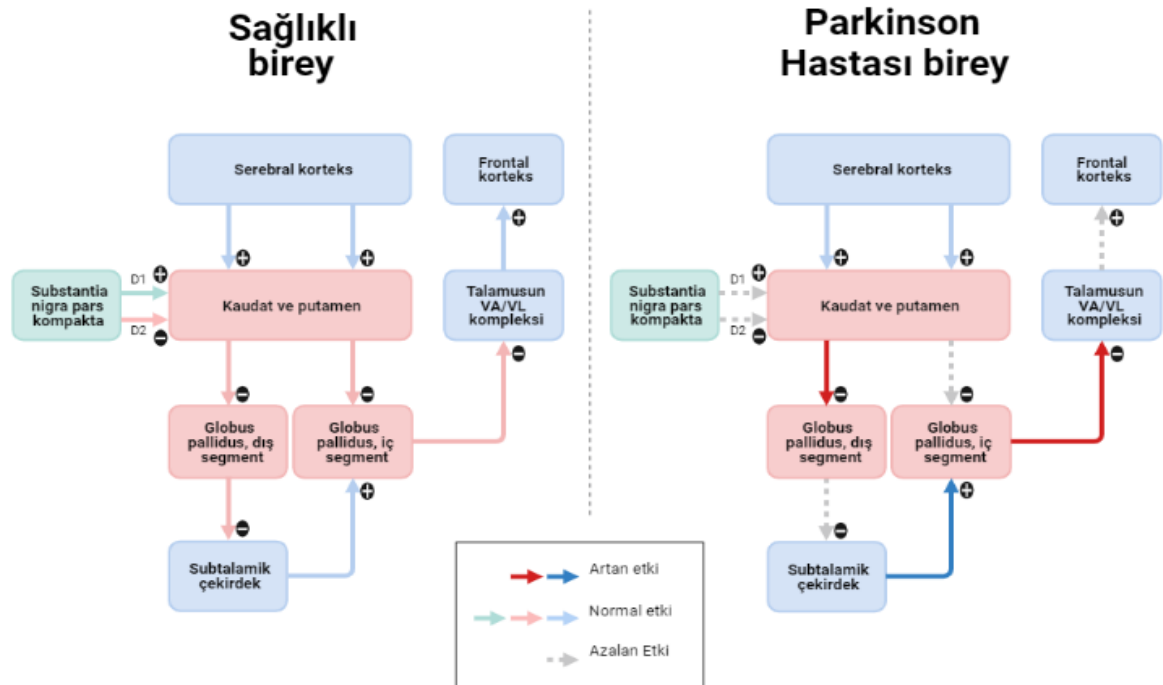
1. Nöronal disfonksiyon gösteren anatomik bölge tarafından belirlenen klinik semptomlar,
2. Çeşitli biyokimyasal modifikasyonlar gösteren, nöronlarda veya glial hücrelerde hücre içi veya hücre dışından biriken proteinlerdir [20].

Özellikle merkezi sinir sistemi ve spinal kanalda oluşan nöronal hasarın rejenerasyonunun sınırlı olması, hasara neden olan etkenlerin sistemden uzaklaştırılamaması ve geliştirilebilecek tedavilerin de kan beyin bariyerini aşamaması nörodejeneratif hastalıkların tedavisini zorlaştırmaktadır. Pek çok

nöronal hasara dayalı hastalığın tedavisi halen mümkün olamamaktadır [21]. En sık görülen nörodejeneratif hastalıkların arasında; ileri yaşta bulgu veren Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) yer alırken, erken yaşta bulgu veren amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington hastalığı (HH) yer almaktadır [21].

2.1.1 Parkinson Hastalığı

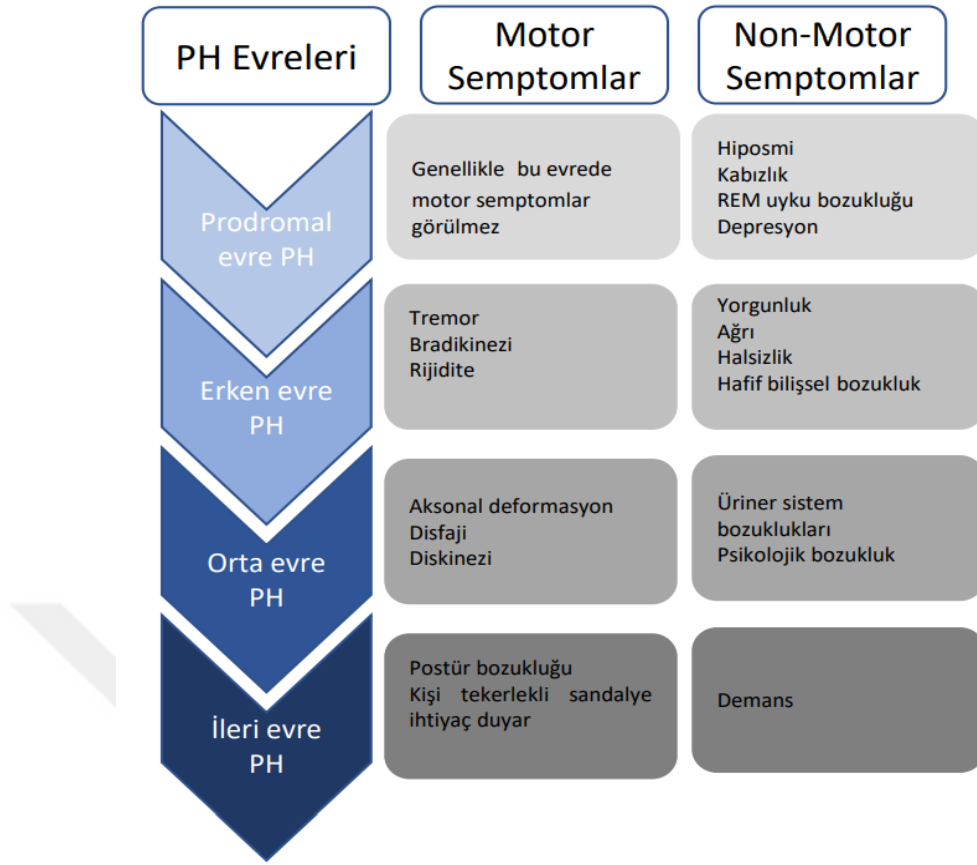
PH, ilk defa 1817 yılından James Parkinson karmaşık, ilerleyici, nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanmıştır [3,4]. Hastalığın bilinen patolojisi; mezensefalonda bulunan substantia nigra pars compacta'daki (SN) dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna bağlı dopamin eksikliğiyle gelişen ve motor nöronların fonksiyon kaybıyla karakterize olan nörodejeneratif hastalıktır [5]. Dopaminerjik nöronların kaybedilmesinin yanı sıra, sağ kalan dopaminerjik nöronlarda Lewy cisimciği denilen intranöranal inklüzyonların birikimlerini de söz konusudur. Lewy cisimleri (LC) ve Lewy nöritleri (LN) olarak bilinen bu intranöranal inklüzyonlar Lewy patolojisi (LP) olarak da adlandırılır.



Şekil 2.1 Parkinson ve sağlıklı birey beyin fonksiyonlarının karşılaştırılması (Biorender.com'da çizildi)

Lewy cisimciğinin birikimiyle (α)-sinüklein bileşenin yanı sıra ubikitin ve yuvarlak eozinofilik inklüzyonlar da ortaya çıkmaktadır. Lewy cisimciği sadece Parkinson için değil aynı zamanda demans ve çoklu sistem atrofisinin olduğu nörodejeneratif hastalıklarda da görülmektedir. Lewy cisimciğinin nöronal disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir [23]. Hastalığın kliniği yansıyan motor semptomların belirgin hale gelmesi, SN'daki dopaminerjik nöronlarının %50 ila %70'inin kaybı ile gerçekleştiği düşünülmektedir [5, 24].

PH'ı iki yüzyıldan daha uzun bir süre önce tanımlanmış olmasına rağmen, hastalığın patolojisini ve etiyolojisini anlamaya ait çalışmalar halen devam etmekte olup şu anda Parkinson için kompleks sistemik bir hastalık olduğu kabul edilmektedir [25]. PH'nın en bilinen klinik semptomları; bradikinezi, postüral instabilite, rijidite ve özellikle istirahat halindeki tremordur [26]. Motor dışı semptomlar ise genellikle hastalığın prodromal fazında görülmektedir. Bazı hastalarda Parkinson'un prodromal fazı 20 yıldan daha uzun sürebilmektedir. Bu fazda motor bozuklukların dışında, uyku davranış bozukluğu (RBD), kabızlık, depresyon, anksiyete ve özellikle hipozmi dahil olmak üzere çok sayıda semptom görülmektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda PH'nın sadece motor bozukluk olmadığı kanısına varılmıştır. Parkinson hastalığında substansiya nigra'nın tek hasarlı bölge veya ilk etkilenen bölge olmadığı, presemptomatik fazdaki hastalarda Serebral korteks ve limbik sistemde de bozulmaların meydana geldiği görülmüştür [27]. Tüm bu veriler ışığında, Parkinson hastalığı için hem merkezi sinir sistemi hem de periferik sinir sistemi üzerinde etki gösteren kompleks bir hastalık tanımlaması yapılabilir.



Şekil 2.2 PH evreleri ve klinik bulguları

PH'nın etiyojisi halen tam anlamıyla aydınlatılamamış olmakla birlikte ilerleyen yaş, çevresel ve genetik faktörler ile ilişkilendirilmektedir. Hastalığın çevresel faktörleri karmaşık olsa da, kimyasala maruziyeti [28] sigara kullanımı [29, 30], hafif ile orta derecedeki kafa travmaları [31], azalan östrojen ve oksidatif stres [32], dahil olmak üzere çeşitli çevresel faktörler arasında potansiyel ilişkiler bulunmuştur. PH'nın çoğunlukla sporadik gelişim göstermesine rağmen [33], kalıtsal yayılımları da hastalık riskine, başlangıcına ve ilerlemesine katkıda sağladığı görülmüştür [34]. GBA, SNCA, LRRK2 ve MAPT genlerinin PH gelişiminden önemli ölçüde görev aldığı görülmüştür [35]. PH'larının yaklaşık %10'unun mendelian kalıtsal formu taşıdığı bilinmektedir. SNCA geni, LRRK2, VPS35 ve LRP10'un yanlış anlamalı mutasyonları veya duplikasyonları ile otozomal dominant PH neden olurken; PRKN, PINK1 ve DJ1'i genlerinde otozomal resesif olarak idiyopatik PH'na neden olduğu bulunmuştur [34].

Günümüzde Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalık PH'dır. Dünya çapında 6,5 milyondan fazla insanı etkileyen PH'ına

yakalanan kişi sayısı [36], 2030 yılında %50 oranında artarak yıllık 10 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Bu ciddi rakam da halk sağlığı için önemli bir yük oluşturmaktadır [26]. Parkinson Vakfı'nın verilerine göre 2020 yılında sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 930.000 kişiye Parkinson hastalığı tanısı konulmuş olup bu sayının 2030 yılında yaklaşık 1,2 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir [37]. PH prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. Yapılan çalışmalar da 45-54 yaş arası bireylerde PH %1 iken 85 yaş üzeri bireylerde bu oran %4'e kadar yükselmektedir. Mortalite oranı ise hastalık teşhisinin konulduğu ilk 10 yıl içerisinde az olurken, sonrasında oranın daha arttığı görülmüştür [38]. Küresel nüfus yaşlandıkça, PH prevalansının dramatik bir şekilde artması ve önümüzdeki 20 yılda iki katına çıkacağı öngörülmektedir [39].

PH'nın tedavisi hala mümkün değildir. Bu hastalığın mortalitesi düşük olmakla birlikte, PH'ı ile 20 yıl veya daha uzun süre yaşayan hastaların olduğu bilinmektedir. Motor bozukluğun ve hastalığın ileri evrelerinde ortaya çıkan demansın hastaların yaşam kalitesini oldukça düşürdüğü bilinmektedir. Klinikte hastanın yaşam kalitesini arttırmaya yönelik birtakım tedaviler mevcuttur. Ancak bu tedaviler hastalığın ilerlemesini engelleyen tedaviler değildir. Parkinson hastaları için klinikte kullanılan destekleyici tedavilerin başında karbidopa / levodopa, monoamin oksidaz-B inhibitörleri (örn., Rasagilin, selegilin), dopamin agonistlerinin kullanıldığı ilaç tedavisi gelmektedir. İlaç tedavisinin dışında rehabilitatif terapi yaklaşımları kullanılmaktadır [40]. Son yıllarda ilaç tedavilerine ek olarak cihaz destekli tedavilerde geliştirilmiştir. Bu tedavi için uygunluğuna ilişkin temel şartları sağlaması gerekmektedir. Bu şartlar;

1. Günde ≥ 5 kez oral levodopa almak, Günde ≥ 2 saat yoğun motor dalgalanmanın olması, ≥ 1 saat diskinezinin olması;
2. Hafif düzeyde demansın olması ve halüsinasyonlar görmüyor olunması;
3. Günlük yaşamsal aktiviteleri gerçekleştirememekten muzdarip olunması.

Bu koşullar da olan hastalar için Derin Beyin Stimülasyonu cerrahisi (DBS), Levodopa-Carbidopa Bağırsak Jeli infüzyonu (LCIG), Sürekli Apomorfin Subkutan İnfüzyonu (CASI) gibi cihaz destekli tedaviler uygulanabilmektedir. Ancak bu tedavi yönteminde hastalar arasında, duygusal olarak stabil, fiziksel olarak

sağlıklı, bilişsel olarak sağlam ve daha genç (tercihen <70 yaş) olan, iyi levodopa yanıtı gösterenler için daha ideal olduğu belirtilmiştir [41]. Yeni nesil sayılabilecek olan bu terapötik seçenekler, oral muadillerine göre daha fazla motor gelişim sağladığı görülmüştür [42]. Ancak klinikte uygulanan bu yöntemler başta ameliyat esnasında ve sonrasında gelişebilecek enfeksiyonlar olmak üzere birçok yan etkiler ve komplikasyonlara neden olmaktadır. Yine de tüm bu tedaviler destekleyici tedavi olmanın ötesine geçememiştir. Destekleyici bu tedaviler sadece hastalığın semptomlarını kontrol eder ancak nörodejenerasyonu durduramaz veya tersine çeviremez. Dolayısıyla PH'ı için iyileştirici bir tedavi yaklaşımı halen daha bulunmamaktadır. Hastalığın patofizyolojisini ortaya çıkarmak ve PH'nın etkisini azaltmak için yeni terapötik stratejiler ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2 Ekstraselüler Veziküller

Ekstraselüler veziküller (EV'ler) ilk olarak 1967 yılından Wolf tarafından “trombosit tozu” olarak adlandırılmıştır [43]. Ancak daha sonra yapılan çalışmalar da bunun trombosit tozundan çok daha fazla olduğu görülmüştür. Zaman içerisinde farklı isimler verilse de günümüzde “Ekstraselüler Vezikül” yada “Hücre Dışı Veziküller” olarak adlandırılmaktadırlar. EV'ler lipid çift tabakasından oluşan transmembran proteinleri, sitozolik proteinleri ve RNA içeriğine sahiptir ve hücreden salgılan biyoaktif kesecikler olarak tanımlanmaktadır [44]. Salımmekanizmalarına ve boyutlarına göre üç ana EV tipi tanımlanmıştır. Bunlar;

- Eksozomlar,
- Mikro veziküller
- Apoptotik cisimlerdir.

Eksozom ve mikro veziküller boyut olarak birbirlerine yakın olsalarda salım yolları tamamen farklıdır. Eksozomlar, multiveziküler endozomların (MVE'ler) plazma membran füzyonu ve ardından intralüminal veziküllerin (ILV'ler) salınmasıyla üretilirken, mikroveziküller ise plazma zarının dışa doğru vezikülasyonu ile salgılanırlar [45]. EV üretimi için çeşitli yollar mevcut olsa da, kesin mekanizma hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Hücreler, EV'lerin salgılanmasıyla komşu hücrelerle veya uzaktaki hücrelerle iletişim kurabilmektedir. Tüm EV'ler alıcı

hücrelere hedeflenebilmesini sağlayan yüzey molekülleri bulunur. EV hedef hücreye reseptör-ligand aracılığıyla bağlandıktan sonra hücreler arası sinyalleşme indüklenir ya da endositoz veya fagositoz yoluyla hücre içine girebilir. Böylece hedef hücrenin fizyolojik durumun değiştirebilir [46].

2.3 Eksozomlar

Eksozomlar, hücreler tarafından salgılanan, boyutları 40 ile 200 nm arasında değişen, EV'lerin en küçük alt grubunu oluşturan hücreler arası kargo ve haberleşme de aktif görev alan biyoaktif kesecikleridir. Endozomun farklılaşması sonucu oluşan eksozomlar hücre membranından köken alırlar [47]. İlk kez 1987 yılından Rose Johnstone tarafından “eksozom” olarak adlandırılmıştır. Keşfinin ilk yıllarında, eksozomların hücresel atıkları temsil ettiği ve bir hücre atığı olduğu düşünülmüştür. [48]. Ancak son çalışmalara ve verilere göre, hücresel homeostaziyi sürdürmek için atık ürünleri ortadan kaldırmanın alternatif bir yolu olarak eksozomun kullanıldığı fikrini desteklemektedir [49]. En önemli görevinin ise; bu nanoboyuttaki bileşenelerin hücreler arası iletişimde rol oynadığı ve çok sayıda fizyolojik ve patolojik fonksiyonla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir [50]. Daha sonra yapılan çalışmalar göstermiştir ki eksozomlar, hücreden hücreye iletişimin bir aracı olarak işlev gördüğü ve aktif moleküllerin transferini kolaylaştırmak için komşu hücreler ile etkileşime girdiği tespit edilmiş ve ileri sürülen fikir kanıtlanmıştır [46]. Hatta sinir sistem hücreleri olan gliaların eksozom aracılığıyla protein ve mikro RNA'ları nöronun aksonuna transfer ettiği görülmüştür [51]. Sinir iletiminde karakteristik özelliğe sahip olan miyelin kılıfı oluşturan lipidler de oligodendrositlerden yine eksozomlar aracılığıyla salındığı bulunmuştur [52]. Ayrıca sinir çalışmalarında eksozomların beyindeki sinaptik plastisite, nöronal stres yanıtı, hücre-hücre iletişimi ve nöroenez gibi süreçlerde rol aldığı gösterilmiştir [53,54].

Tüm bilgiler ışığında eksozomların;

- ✓ Hücreler arası iletişim ve kargo görevinde,
- ✓ Genetik bilginin aktarımı,
- ✓ Hastalıkların patolojik süreçlerinin aydınlanması ve hastalık tanı modellerinin geliştirilmesi,

- ✓ Yeni nesil aşı modellerinin geliştirilmesinde,
- ✓ mRNA, miRNA, nükleik asit, protein, lipid taşınımı ve ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilmesinde,
- ✓ Hastalıkların tedavilerin kullanılabilmesi,
- ✓ İmmün yanıtı düzenleyebildiği görülmüştür [55].

Eksozomlar ile ilgi çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan bu çalışmalar arttıkça da eksozomların tüm fonksiyonlarının daha da aydınlanacağını düşünmekteyiz.

2.3.1 Eksozom Biyogenezi

Günümüzde eksozomların biyogenezi; içeriği, kargo molekülleri ve sınıflandırılmış proteinler açısından oldukça karmaşık olsa da çeşitli sinyal yolları aracılığıyla düzenlenen çok aşamalı bir biyolojik süreç olarak kabul edilmektedir. Eksozomun biyogenezi için kesin mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik çalışmalar halen daha devam etmektedir. Ancak farklı mekanizmalar tanımlanmıştır. Tanımlanan mekanizmalar ise; protein sınıflandırması için geniş çapta açıklanan iki yola ayrılmaktadır. Bunlar;

- Endozomal sıralama kompleksi taşınımına (ESCRT) bağımlı yolak
- ESCRT'den bağımsız yolaktır.

Eksozomların biyogenezi bu 2 yolak tanımlanmıştır ancak bu yolakların birbirinden tamamen ayrı olduğu söylenememektedir. Bu yolaklar sinerjik olarak çalışabilir veya farklı eksozom alt popülasyonları farklı mekanizmalara bağlı olabilir [56]. Ayrıca, hücre tipi veya hücrel homeostaz, eksozomların salgılanmasını kontrol eden mekanizmaları etkileyebilmesi söz konusudur.

Eksozom biyogenezi esas olarak; endozomal sistemden köken almaktadır. Bu süreç, hücre zarının içe doğru tomurcuklanması ve ardından endozom zarının ikinci kez içe doğru tomurcuklanmasıyla erken endozomun oluşmasıyla başlamaktadır. İkinci içe doğru tomurcuklanma ile, geç endozom da ILV'ler meydana gelir. ILV içeren geç endozomlar sınırlı multiveziküler cisimler (MVB'ler) olarak tanımlanır [57,58]. MVB'ler bu basamaktan sonra ya degradasyon için lizozom ile kaynaşır ya da eksozom oluşumu için endositik yolu izlemektedir [59]. Endositik süreç sırasında, plazma zarı yüzey proteinleri,

endositik veziküllerin iç zarına yerleşmektedir [60]. Plazma zarı yüzey proteinleri ile endositik veziküller endoplazmik retikülüm zarına sıralanır ve daha sonra golgi kompleksinde ILV'de işlenir. Sürecin son aşaması olarak, ekzositotik yol aracılığıyla hücre dışı boşluğa ILV'ler alınarak, MVB'ler plazma zarı ile birleşir ve eksozom olarak salınırlar.

Kısaca eksozom biyogenezinin basamakları;

- Plazma zarından endositik veziküllerin oluşumu,
- Endozomal membranların içe doğru tomurcuklanmasıyla MVB oluşumu,
- MVB'nin plazma zarı ile füzyonu ve eksozomların salınmasından oluşmaktadır.

2.3.1.1 Eksozom Biyogenez ESCRT Bağımlı Yolak

EV oluşumu, hücre zarlarının sitoplazmadan tomurcuklanmasını meydana geldiği bilinmektedir. Eksozomların hücre dışına salınımında ESCRT'nin keşfinin hücresel bir mekanizma olarak açıklanmaktadır [61, 62]. ESCRT'ye bağlı MVB oluşumu, hem lizozomal bozulma hem de eksozom biyogenezin de önemli ölçüde rol oynadığı görülmüştür [63]. ESCRT bileşenleri, ILV'lerin tomurcuklanmasını ve endozom lümenine salınmasını destekler, dolayısıyla MVB'lerin biyogenezine katkı sağlamaktadırlar [64]. ESCRT'ye bağlı mekanizma, eksozomların biyogenezi için en iyi karakterize edilmiş mekanizmalardan biridir. ESCRT; dört protein kompleksi, yani ESCRT-0, -I, -II ve -III şeklinde düzenlenmiş VPS4, VTA1 ve ALIX gibi proteinlerle birlikte yaklaşık 30 proteinden oluşmaktadır. ESCRT-0 ubiquitin ile etkileşime girerek kargo kümelenmesine ve diğer ESCRT komplekslerinin (ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III) endozomal membrana alınmasını kolaylaştırır [61]. ESCRT-I ve ESCRT-II, endozomal membranın tomurcuklanmasından sorumludur. Membran invajinasyonu ve intralüminal veziküllerin oluşumu ise, ESCRT-III aracılığıyla polimerik filament oluşumunu ve vezikül fisyonunu kolaylaştırılır [65].

Biyogenez için ESCRT'ye bağlı mekanizma iyi tanımlanmış olmasına rağmen, kargo moleküllerinin MVB'lerden ayrılmasıyla olan ilişkisi halen daha aydınlatılmamış olup araştırmalar devam etmektedir. Özellikle ESCRT komplekslerinin eksozom biyogenezine dahil olduğu ve mekanizmanın tüm

süreçlerini aydınlatmak adına yapılan protein analiz çalışmaları devam etmektedir. Hepatosit büyüme faktörün ile düzenlenen tirozin kinaz substratı (HRS) mono-ubiquitin kargo proteinlerinin tanınmasında rol oynarken, sinyal dönüştürücü adaptör molekül 1 (STAM1), clathrin ve Eps15 ile bir kompleksi meydana getirir. HRS daha sonra TSG101 ile etkileşime girerek, ESCRT-I kompleksini alır ve ESCRT-III'ün ESCRT-I yardımıyla alımını sağladığı görülmüştür [66]. Hatta yapılan bir çalışmada HRS eksikliğinin eksozom salınımı olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir [67]. Bu bilgilere ek olarak, ESCRT komplekslerinin eksozom biyogenezinin ve salınımindaki, ana histo-uyumluluk kompleksi sınıf II (MHC II)'nin de bu sürece dahil olduğu görülmüştür [68].

2.3.1.2 Eksozom Biyogenez ESCRT Bağımsız Yolak

ILV'lerin MVE lümenine kesilmesi için ESCRTIII'nin her zaman gerekli olduğu düşünülmekte idi [45]. ESCRT'den yoksun hücrelerde de lumen içinde MVE'lerin oluşması, ESCRT'den bağımsız bir yolağın var olabileceğini göstermiştir [69]. Bu konuyla ilgili yapılan ilk çalışmada fare oligodendroglial hücre hattında, ESCRT bileşenleri Tsg101 ve Alix'in yıkılması ve salınan eksozomların sayısının etkilemediği görülmüştür. Bu durum da eksozom biyogenezinde ve kargo yükleme ESCRT'den bağımsız bir yolağın olduğunu tespit edilmiştir. Gerçekten de, ILV biyogenezi için ilk ESCRT'den bağımsız mekanizmanın, zarlarda spontane bir negatif eğriliğini indükleyen sal tabanlı mikro alanların oluşumuna izin verebilen sfingolipid seramidlerin aktif rol oynadığı görülmüştür. [70]. Böylece mikro bölgelerin, fosfokolin kısmı uzaklaştırılmasıyla seramidler ve sfingomyelinazlar bakımından oldukça zengin olduğu düşünülmektedir [71]. Seramidlerin, membranlarda yanal faza ayrılmasını ve mikro alanların birleşmesini indüklediği bilinmektedir. Ayrıca, seramidin hem koni şeklindeki yapısı hem de endozomal membranın spontane negatif eğriliği düşünüldüğünde tomurcuklanmaya katkı sağlayabilmesi söz konusudur [72]. Bu “geleneksel olmayan” yolağa, seramidlere ek olarak lizobisfosfatidik asit (LBPA) gibi belirli lipidlerin de içe doğru bükülerek vezikül oluşumu için endosomal bölgeleri organize ettiği tespit edilmiştir [73]. ESCRT'den bağımsız eksozom oluşum mekanizmasını kanıtlamak için yapılan proteomik analizler de bazı proteinler tanımlanmıştır. Bu bilgilere ek olarak, ESCRT'den bağımsız mekanizmanın, yalnızca MVB'lerin ve eksozomların

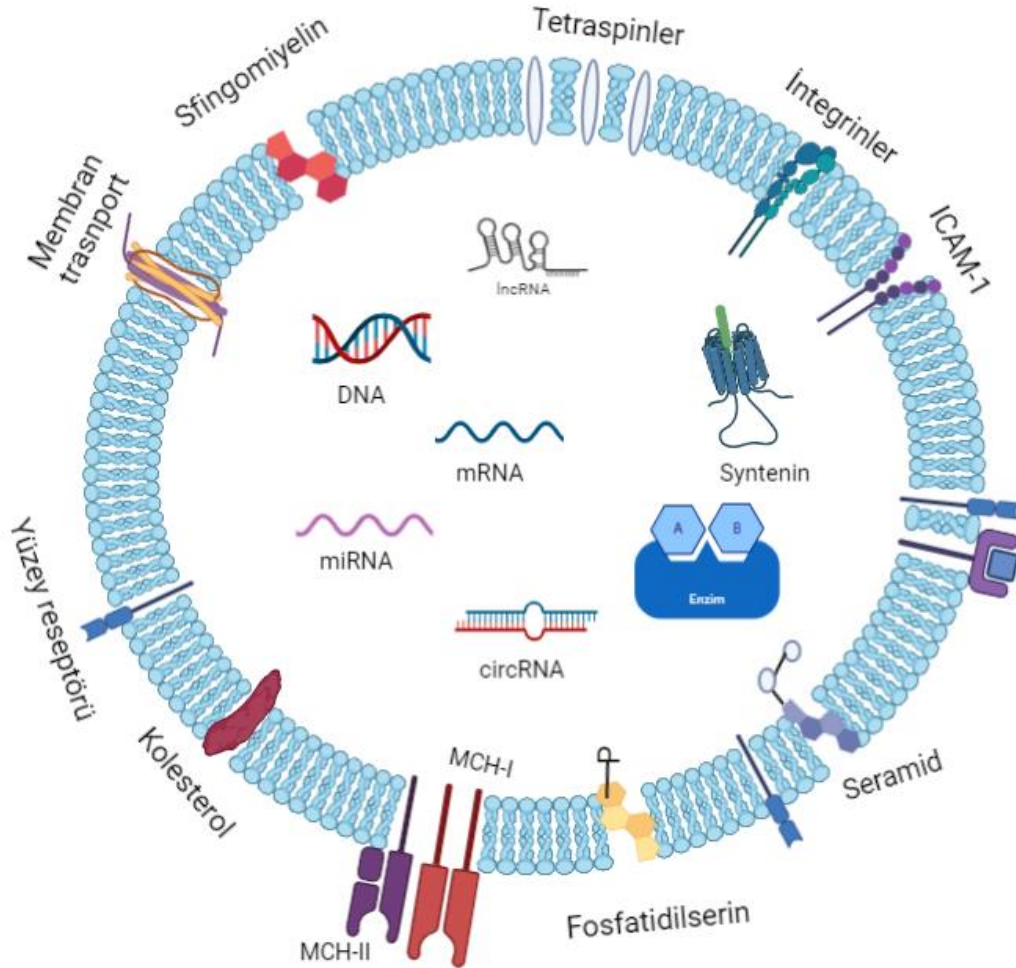
oluşumunda değil, aynı zamanda eksozom içeriğinin değiştirilmesinde de etkili olduğu da görülmüştür. Sıçan pankreas adenokarsinom modelinde, tetraspanin Tspan8'in ekspresyonu, eksozomlardaki mRNA ve transmembran protein (VCAM-1, $\alpha 4$ integrin) içeriklerinin farklılaştığı tespit edilmiştir [74]. Ancak ESCRT'den bağımsız ILV oluşumunda hangi proteinlere ihtiyaç duyulduğu ve nasıl işlev gördükleri halen daha tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir [75]. ESCRT bağımsızlı yolağın farklı hücre tiplerinde aktif rol oynayan bileşenlerin farklılık gösterebileceğini düşünmekteyiz.

2.3.3 Eksozom Bileşenleri

Eksozomlar, özel olarak sıralanmış proteinler, lipidler, nükleik asitlerden meydana gelirken, köken aldığı hücrenin özellikler bağlı kalmasıyla o hücrenin mini versiyonu olarak kabul edilmiştir. Eksozom içeriğinde yaklaşık 4400 protein, 194 lipid, 1639 mRNA ve 764 miRNA ek olarak farklı hücre tiplerinden spesifik bileşenler de tanımlanmıştır. Bu farklı bileşenlerde eksozomların hem karmaşık yapısını hem de potansiyel fonksiyonel çeşitliliğini ortaya koymaktadır [76, 77]. Tipik olarak eksozomlar hücre penetrasyonundan füzyonuna kadar pek çok olayda rol oynayan proteinlerce oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Bu proteinlerin bazıları; membran da bulunan tetraspaninler (CD9, CD63, CD81, CD82); antijen bağlanması ve sunumunda yer alan stres yanıtının bir parçası olarak ısı-şoku proteinleri (HSP70, HSP90); eksozom salınımında rol oynayan MVB oluşum proteinleri (Alix, TSG101); yanı sıra membran taşınması ve füzyonundan sorumlu proteinler (anneksinler ve Rab) oluşturmaktadır [78].

Eksozomun keşfiyle birlikte ökaryotik canlıların RNA işleme yollarına ek bir mekanizmanın daha olduğu ortaya çıkmıştır. Her ne kadar eksozomun temel aktivitesi tamamen aydınlatılmamış olsa da RNA içeriği bakımından hücresel metabolizmadaki rolü önemini göstermiştir. Eksozomun sitoplazmada mRNA'ları parçalama yeteneği, 3'-5' bozunma yolunun baskın görüldüğü ve eksozom içerisindeki mRNA'ların düzenlenmesinde işlev görebildiği görülmüştür [80, 81, 82]. Bu bilgilere ek olarak eksozomlar; hedef hücrelere dahil edilebilecek farklı RNA kalıpları da içermektedir. Yapılan RNA analizlerinde miR'ler eksozomal RNA türünün büyük bir kısmını oluşturduğu söylemek mümkündür [77].

Eksozomların biyoaktivitesi sadece proteinlerinde ve nükleik asitlerinde değil, aynı zamanda lipid bileşenleri de bulunmaktadır. Tüm eksozomların membran yapısında bulunan fosfatidilserin (PS), fosfatidik asit, kolesterol, sfingomiyelin (SM), araşidonik asit ve diğer yağ asitleri, prostaglandinler ve lökotrienler ortak moleküller olarak tanımlanmıştır [83, 84]. İçerisindeki bu moleküller sayesinde eksozomların stabilitesinin arttığı ve yapısal sertlik kazandığı görülmektedir. Eksozomların lipid içeriği, protein ve RNA'lar hastalıkların teşhisinde ve prognozunda önemli role sahip olacağını düşünülmektedir. Ayrıca bileşenleri sayesinde eksozomların in vitro koşullarda modifiye edebilmesine katkı sağlamaktadır.



Şekil 2.3 Eksozomların yapısı ve bileşimi. Eksozomların yapısı, sulu bir çekirdek ve bir fosfolipid çift katmanından oluşur. Genel: Tetraspaninler (CD9, CD63, CD81); İntegrinler ($\alpha 6 \beta 4$, $\alpha v \beta 5$); ICAM-1 (hücreler arası yapışma molekülü 1); MHC I, II (ana doku uygunluk kompleksleri I ve II); Zar taşıma/füzyon proteinleri (Rabs, Flotillins); Nükleik asitler (miRNA'lar, lncRNA'lar, circRNA'lar, mRNA'lar, DNA); Sitoplazmik proteinler (Syntenin, enzim); Yüzey alıcısı; Kolesterol; seramid; sfingomyelin; fosfatidilserin, (Biorender.com'da çizildi)

2.3.4 Hücreler Arası İletişimde Eksozomlar

Hücreden hücreye iletişim organizmanın homeostazi sağlayabilmesi adına oldukça önemlidir. Hücrelerin komşu hücrelerle bağlantı sağlayabilmesin için pek çok molekül hücresel iletişimde aktif rol oynamaktadır. Burada hem yüzey molekülleri hem de sitoplazmik bileşenler görev almaktadır [85, 86]. Hücreler, sinyal yayılımını kolaylaştırmak için hormonlar ve sitokinleri salgılayarak bu çözünür faktörler aracılığıyla uzaktaki hücrelerle iletişim kurarken, hücre yüzeyindeki protein/protein etkileşimi, ligand-reseptör transferini sağlayan adezyon molekülü dahil olmak üzere bir çok molekül de yakındaki hücreler ile iletişim kurabilmektedir [87]. Ayrıca hücre tipine göre elektriksel veya kimyasal sinyaller kullanılarak iletişim sağlanabilmektedir [88].

Son zamanlar da yapılan araştırmalar göstermiştir ki; EV'ler hücreden hücreye iletişimde aktif rol oynamaktadır. Özellikle eksozomlar hücresel iletişimde öne çıkmaktadır. Başlangıçta eksozom salınımının hücrelerdeki gereksiz proteinleri ortadan kaldırdığı bir mekanizma olduğu sanılmaktaydı [89, 90]. Ancak 1990'lı yılların sonunda yapılan çalışmalar eksozomların özellikle immün yanıt oluşumunda ve kanserde, hücreler arası iletişim aracı olarak hizmet ettiği görülmüştür [91, 92]. Eksozomlar köken aldıkları hücrelerden salınarak hedef hücrelerle etkileşime girer. Böylece hedef hücre davranışını ve fenotip özelliklerini değiştirebilmektedir [93].

Eksozomlar hücre içerisine reseptör-ligand etkileşimi, membrandan direk füzyon veya endositoz yoluyla alınabilmektedir. Burada, eksozomlar endozomların sınırlayıcı membranı ile kaynaşabilir ve içeriklerinin hedef hücrelerin sitoplazmasına genetik aktarımı ile sonuçlanabilir.

Eksozomlarda bulunan biyoaktif moleküllerin, aşağıdaki mekanizmalar yoluyla hedef hücreleri etkilediği görülmüştür;

1. yüzeye bağlı ligandlar yoluyla hedef hücrelerin doğrudan uyarılması;
2. aktive edilmiş reseptörlerin alıcı hücelere transferi;
3. fonksiyonel proteinlerin, lipidlerin ve RNA'ların verilmesi yoluyla alıcı hücrelerin epigenetik yeniden programlanması [94].

Bu yolak ile eksozomlar hem uzaktaki hem de yakındaki hücreler iletişim kurabilme yeteneğine sahiptir.

2.3.5 Eksozom İzolasyonu ve Yöntemleri

Eksozomlar ve biyolojik işlevlerinin anlaşılmasındaki hızlı ilerlemeler, eksozomların oynadığı fizyolojik rollere ve insan sağlığıyla olan belirgin ilişkileri nedeniyle yeni çalışmalara kapılar açmaktadır [95]. Eksozomların izolasyonu ve nicelleştirilmesi hem temel araştırmalarda hem de klinik uygulamalarda giderek önem kazanmaya başlamıştır. Eksozomlar hücre kültür ortamından ve vücut sıvılarından izole edebilmek mümkündür. Özellikle hastalıkların tanı ve tedavisin de kullanılacaksa; güvenili ve verimli bir şekilde izole edilmesi gerekmektedir [96]. Bugüne kadar, beş grup eksozom izolasyon tekniği geliştirilmiştir. Bunlar,

1. Ultrasantrifüj Tabanlı Teknik
2. Boyut Tabanlı Teknikler
3. Immünoafinite Yakalama Tabanlı Teknik
4. Eksozom Çöktürme Tekniği
5. Mikroakışkan Tabanlı Tekniktir.

2.3.5.1 Ultrasantrifüj Tabanlı Teknik

Heterojen bir karışımı (süspansiyon) merkezkaç kuvveti kullanılarak santrifüjlemeye tabi tutulduğunda, süspansiyondaki partiküller yoğunluklarına, boyutlarına ve şekillerine göre çökmektedir. Önce daha yoğun ve daha büyük parçacıklar çökmektedir. Santrifüjleme genellikle partiküllü malzemeleri ayırmak ve saflaştırmak için kullanılır. Ayrıca nükleik asitler ve proteinler gibi biyopolimerler dahil polimerik malzemelerin hidrodinamik özelliklerini analiz etmek içinde kullanılmaktadır [97]. Karışıma uygulanan merkez kaç kuvvetine bağlı olarak bir süspansiyondaki parçacıklar, fiziksel özelliklerine, çözücünün yoğunluğuna ve viskozitesine göre sırayla ayrılabilir.

Mevcut yöntem de ise, yüksek hızlarda ultrasantrifüjlemenin eksozomları saflaştırmak için en iyi yöntemlerden birisi olduğu görülmüştür. Bu yöntem ile oldukça saf bir eksozomal fraksiyon elde etmek mümkündür [98]. Bir numunedeki eksozomların izolasyonu için farklı merkezkaç kuvvetine ve süreye bağlı olarak bir dizi santrifüjleme döngüsünden oluşur. Kullanılan merkezkaç kuvveti tipik olarak

~100.000 ila 200.000 $\times$ g arasında değişmektedir. Eksozom izolasyonunda bu yöntem kullanılıyor ise; işlemler arasında, süpernatant aspire edilir ve kullanılan merkezkaç kuvvetine bağlı olarak, pelet, fosfat tamponlu salin (PBS) gibi uygun bir ortamda yeniden süspansiyon edilir ve artan kuvvette santrifüjleme işlemlerine tabi tutulur. Son olarak, izole edilmiş eksozomlar bir kez daha yeniden süspansiyon edilir ve sonraki işlem veya analizlere kadar -80°C'de saklanır. Bu eksozomları izole etme yöntemi, peletleme yöntemi veya basit ultrasantrifüjleme yöntemi olarak da bilinir [99].

Ultrasantrifüj ile yoğunluk gradyan santrifüjleme de yapılmaktadır. Bu teknikte, toksik olmayan yoğunluk dereceli bir sukroz veya iyodoksinol ortamıyla birlikte numunelerin ultrasantrifüjlenmesine dayanır. Bu yöntem ile elde edilen eksozomların yüksek saflık derecesinden olduğu görülmüştür [100]. Bununla birlikte, virüslerden veya mikroveziküllerden gelen eksozomlar, benzer yoğunlukları nedeniyle bu teknikle ayırt edilememektedir. Ayrıca yalnızca pahalı ultrasantrifüjleme ekipmanı değil, aynı zamanda yöntemi tecrübeli kişilerce yapılması gerekmektedir [101].

Bu yöntem araştırmalarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, tekniğin eksozomal olmayan partiküllerle birlikte izolasyonu, düşük tekrarlanabilirlik, düşük RNA verimi, eksozomların potansiyel hasarı, düşük verimi ve kontaminasyon dahil olmak üzere birçok dezavantajı vardır [102, 103, 104]. Eksozom izolasyonu için özel olarak şartlandırılmış kültür ortamını kullanan araştırmacılar çoğunlukla ultrasantrifüjleme kullanırken, plazma gibi karmaşık biyolojik sıvıları inceleyenler, izolasyon ve saflaştırılması için farklı yöntemler kombine olarak kullanmanın daha avantajlı olduğu kanısına varılmıştır. Bu yöntemler arasında, hücre parçalarını ve büyük trombosit türevli vezikülleri uzaklaştırmak için daha düşük hızlarda yoğunluk gradyanlı santrifüjleme, ardından ultrafiltrasyon ve boyut dışlama kromatografisi (Size Exclusion Chromatography SEC) yer alır [105]. Sonuç olarak, kültür ortamından eksozomları saflaştırmak için en genel kabul gören ve yaygın olarak kullanılan yöntem ultrasantrifüjleme yöntemidir. Hücreleri ve mikro vezikülleri uzaklaştırabilen bir dizi seri santrifüjleme adımı, ardından ultrasantrifüjleme

yoluyla izolasyon yapılabilir. Ancak bu yöntem zaman alıcı, emek yoğun ve pahalı ekipman gerektiren bir işlemdir.

2.3.5.2 Boyut Tabanlı Teknikler

Bu yöntem kendi içerisinde birkaç teknik barındırmaktadır. Bu teknikler arasında; ultrafiltrasyon [106], boyut dışlama kromatografisi (SEC) [107] ve akış alan-akış fraksiyonu (Flow Field-Flow Fractionation-F4) [108] yer almaktadır. Ayrıca bu yöntem baz alınarak özellikle RNA ekstraksiyonu için ticari kitlerde geliştirilmiştir [109].

Boyut tabanlı eksozom izolasyon yöntemlerinden en bilinen teknik ultrafiltrasyondur. Bu yöntem geleneksel membran filtreleme yönteminden farklı olmamakla birlikte, temellinde, süspansiyon halindeki partiküllerin veya polimerlerin ayrılmasının öncelikle boyutlarına veya moleküler ağırlıklarına bağlı ayırıştırma bulunmaktadır. Bu yüzden, molekül ağırlıklarına veya boyutlarına göre özel membran filtreler ile eksozom izole edilebilmektedir [106]. Bu yöntem özel membranlar kısa ve ultrasantrifüjlemeye kıyasla daha az kuvvette santrifüjleme işlemine tabi tutularak hızlı bir şekilde izole edebilmeyi mümkün kılmaktadır. Ultrafiltrasyon, ultrasantrifüjden daha hızlıdır ve özel ekipman gerektirmez [110, 111].

Eksozom izolasyonuna uygulanan bir başka boyuta dayalı ayırma tekniği, boyut dışlama kromatografisidir (SEC). SEC'de, makromolekülleri ve partikülleri boyutlarına göre ayırmak için gözenekli sabit bir faz kullanılır. Küçük hidrodinamik yarıçaplı bir numunedeki bileşenler gözeneklerden geçebilir, bu da geç elüsyona neden olur. Eksozomlar da dahil olmak üzere büyük hidrodinamik yarıçaplı bileşenlerin gözeneklere girmesi engellenir. Bu yöntem ile izole edilen eksozomların karakterizasyon analizinde yapısal bozulmanın olmadığı görülmüştür [112, 113].

Diğer bir teknik ise akış alan-akış fraksiyonu -F4; boyuta dayalı yöntemler için de nispeten daha yeni bir yöntem sayılmaktadır. Bir kanal yardımıyla parabolik akış sağlanarak süspansiyon karışımındaki partiküllerin boyutlarına göre izolasyonun sağlandığı bir tekniktir. İnsan nöral kök hücre kültüründen eksozomları izole etmek için F4 kullanılmış ve izolasyonun başarılı olduğu görülmüştür [108].

2.3.5.3 İmmünoafinite Yakalama Tabanlı Teknik

Eksozomları büyüklüklerine, yoğunluklarına ve diğer fiziksel özelliklerine göre izole eden stratejilere ek olarak, izolasyonu için proteinler ve antikorları arasındaki etkileşim ile immünoafinite yakalama gibi başka yöntemler de geliştirilmiştir. Özellikle eksozom yüzeyinde bulunan başta CD63, CD81, CD82, CD9, Alix, annexin, EpCAM ve Rab5 proteinleri olmak üzere bir çok protein yüksek saflıkta ve eksozomların spesifik alt popülasyonlarının izolasyonuna katkıda bulunabilmektedir [114]. Bu yöntemle göre, antikorlar manyetik boncuklar, kromatografi matrisleri, plakalar veya mikroakışkan cihazlar üzerine sabitlenebilir [115]. Ancak en yaygın kullanılan mikroakışkan cihazlardır. 1.0 mL kadar küçük bir hücre kültürü ortamı hacmiyle immünoafinite yakalama yöntemini kullanılarak yapılan bir çalışmada, izolasyon verimi ultrasantrifüj ile karşılaştırılmış ve sonuçların her iki yöntemde de benzer olduğu görülmüştür. Her yöntemde olduğu gibi bu yöntemde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Yüksek saflık ve kolay prosedüre rağmen, nötr olmayan pH ve fizyolojik olmayan tuz konsantrasyonları eksozom biyolojik aktivitesini etkileyebilmesi söz konusudur. Ayrıca reaktiflerin yüksek fiyatı, özellikle aşırı yüksek saflık veya belirli bir eksozom alt türü talepleri olmadığında, birçok laboratuvarın bu yöntemi seçmemesinin bir başka nedenidir [116].

2.3.5.4 Eksozom Çöktürme

Sentetik polimerler ve hidrofilik polimerler rutin olarak virüsleri ve diğer küçük parçacıkları çöktürmek için kullanılmaktadır [117]. Bu özelliklere sahip polimerler kullanılarak eksozom izolasyonun başarılı olduğu görülmüştür. Özellikle polietilen glikol (PEG) gibi su içermeyen polimerler izolasyon için gerekli koşullu ve özellikleri sahip olduğu için öne çıkmaktadır [111]. Su içermeyen polimerler su moleküllerini bağlar ve daha az çözünür bileşenleri çözeltiden dışarı çıkmaya zorlayarak izolasyona hizmet eder. Yapılan araştırmalar da kültür ortamına PEG (0.08 g/mL) ile gece boyu 4 °C'de inkübe edilmesi eksozom içeren çöktür, düşük hızlı santrifüjleme veya filtrasyon yoluyla izole edildiği görülmüştür [119, 120].

Bu çöktürme ve diğer yöntemlerinde dışından, birkaç eksozom izolasyonu için ticari kitler mevcuttur. Bu kitlerinin bazıları serum, plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı ve kültür ortamı dahil olmak üzere birçok kaynaktan eksozom izolasyonunu mümkün kılmaktadır. Ancak tüm izolasyonu yöntemlerinde de olduğu gibi çöktürme işleminin önce, numunelerin hücrelerden ve hücre kalıntılardan önceden temizlenmesi gerekir.

2.3.5.5 Mikroakışkan Tabanlı Teknik

Her geçen gün gelişen mikrofabrikasyon teknolojisinde, eksozomların hem fiziksel hem de biyokimyasal özelliklerinden mikro ölçeklerde yardımıyla, hızlı ve verimli bir şekilde izole etmek için mikroakışkan tabanlı cihazların üretimi geliştirilmesinin yolunu açmıştır. Bu yöntem henüz oldukça yenidir. İzolasyon için yapılan birkaç çalışma mevcuttur. Ancak bu teknik üzerine yapılacak çalışmalar ihtiyaç duyulmaktadır. Bu zaman kadar yapılan çalışmalarda ise; akustik nanofiltre ile bileşenleri boyutlarına ve yoğunluklarına göre [121], geliştirilen gözenekli silikon nanotelin ise hücre kalıntılarını uzaklaştırarak izolasyon edebildiği görülmüştür [122]. Aynı zamanda spesifik eksozom izolasyonu sağlayabilen immünoafinite yakalamayı sağlayan bir mikroakışkan çip geliştirilmiş ve izolasyonun başarılı olduğu görülmüştür [123].

Tablo 1.1 Eksozom izolasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Yöntem	Yöntemin Amacı	İzolasyon Saflığı	Avantajı	Dezavantajı
Ultrasantrifüj Tabanlı Teknik	Partikül bileşenlerinin ve çözünen maddelerin yoğunluk, boyut ve şekle dayalı ayrılma amaçlar	Yüksek	Büyük numune kapasitesi ve büyük miktarlarda eksozom verimi	Hücre kültürü araştırmalarında daha uygundur. Pahalı ekipman, uzun süreli ve yoğun emekli, ayrıca proteinleri ve/veya protein-RNA kümelerini çökeltir
Boyut Tabanlı Tekniği	Moleküler ağırlıkları bilinen veya boyut dışlama sınırlarına sahip karışımlardan filtre membranı kullanarak izolasyonu amaçlar	Orta	Ultrasantrifüj kıyasla daha hızlı izolasyonu sağlayabilir,	Membrana bağlı olumsuzlukların gelişmesi (filtre tıkanması)
İmmünoafinite Yakalama Tabanlı Tekniği	Eksozomların zara bağlı antijenleri (reseptörleri) ile hareketsizleştirilmiş antikorlar (ligandlar) arasındaki spesifik etkileşime dayalı eksozom izolasyonu amaçlar	Yüksek	Spesifik olarak eksozom izolasyonunu imkanı kılar	Yüksek maliyete ve verimin nispeten daha az olmasıdır
Eksozom Çöktürme Tekniği	Su içermeyen polimerlerin yardımıyla (Örn: PEG) eksozomların çözünürlüğünü veya dağılılabiliğini değiştirerek izolasyonu amaçlar	Düşük	Yüksek verimli, özel ekipmana gerek yok ve çalışma süresini nispeten kısadır	Düşük numune hacimlerinde çalışma imkanı sunar
Mikroakışkan Tabanlı Tekniği	Süspansiyon İmmünoafinite, boyut ve yoğunluk gibi eksozomların çeşitli özelliklerine dayanan mikro ölçekli izolasyon.	Yüksek	Yapılan çalışmalar yüksek miktarda eksozom izolasyonu yapılabildiğini göstermiştir	Henüz klinik uygulaması kesinleşmemiş bir yöntem olup kalite kontrol çalışmalarının yapılması gerekmektedir

2.3.6 Eksozom Karakterizasyonu

Farklı izolasyon teknikleri kullanılarak farklı kaynaklardan eksozom izole etmek mümkündür. Ancak izolasyon için tercih edilen yöntem her ne olursa olsun, yöntem başarısını ölçülmesi gerekmektedir. İzolasyondan sonra elde edilen eksozomların boyut, yoğunluk ve yüzey belirteç özelliklerine göre karakterizasyon işlemi yapılabilmektedir. Eksozomların karakterizasyon yöntemleri;

1. Dinamik ışık saçılımı (DLS)
2. Nanoparçacık izleme analizi (NTA)
3. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM)
4. Flow sitometri
5. Dirençli Darbe Algılama- (Resistive Pulse Sensing-RPS)
6. Yüzey plazmon rezonansıdır.

2.3.6.1 Dinamik ışık saçılımı (DLS)

Dinamik ışık saçılım tekniği, parçacığın Brownian hareketinin neden olduğu sabit bir açıda (173°) saçılan ışık yoğunluğunun dinamik dalgalanmalarını ölçerek parçacık hareketinin hız dağılımını analiz etme prensibine dayanır. Ayrıca Stokes-Einstein ilişkisine dayalı olarak partikül çapları hesaplabilmektedir. Bu yöntemle kısa süre içinde boyut analizi yapabilmeyi sağlamaktadır [124]. Boyutunun ölçümü yanından DLS ile zeta potansiyel ölçümü de yapılabilmektedir. Zeta potansiyeli eksozom bütünlüğünü ve dağılım stabilitesini belirlemek kullanılan faktörlerden birisidir [125].

2.3.6.2 Nanoparçacık izleme analizi (NTA)

DLS'e benzer çalışma prensibine benzer özellikteki NTA, Brownian hareketi kaynaklı hareket eden nano ölçekli parçacıklardan saçılan ışığın gerçek zamanlı görüntüsü aracılığıyla sıvı süspansiyonda 50-1000 nm aralığındaki parçacıkların boyutlarını ve konsantrasyonunun ölçümünü yapabilmektedir. Stokes-Einstein ilişkisine dayalı olarak çaplarını hesaplayabilmektedir. Kısaca NTA, mikroskobun görüş alanındaki parçacıklardan saçılan ışığı görselleştirir. Bu ışık, hareket eden küçük parlak noktalar olarak görünür. Tek tek parçacıkların hareketleri ile kısa bir

video ile takip edilebilmektedir [126]. Günümüzde eksozom çalışmalarında karakterizasyon işleminde çok kullanılan analiz yöntemidir [127]. Ancak izolasyon sonrasında analiz de mutlaka seyretme işlemi yapılmalıdır. Bu yüzden kontaminasyon riski fazladır [128].

2.3.6.3 Transmisyon elektron mikroskobu (TEM)

Bu yöntem ile eksozomların görüntülenme hedeflenir. Görüntüleme amacı; ilk olarak, boyut ve morfoloji açısından istenir. İkinci olarak ise; numunenin saflığını ölçmek için görüntüleme ihtiyacı duyulur [129]. Bu görüntüleme teknikleri ile lipoprotein partikülleri, büyük protein kompleksleri ve diğer istenilmeyen partiküllerin olup olmadığı değerlendirilir. Özellikle eksozomlar nanoboyutlarda olduğundan, yüksek çözünürlüklü mikroskopi kullanılarak görüntülenebilmektedir. Bu yüzden transmisyon elektron mikroskobu (TEM) en popüler yöntemlerden birisidir [130, 131]. TEM analizi için eksozomların bir ön işleme tabi tutulması gerekir. Bu da büyük miktardaki numunelerin taranması zorlaştırır.

2.3.6.4 Flow sitometri

Bu yöntemde eksozomların hem yüzeyinde bulunan yüzey belirteçlerini hem de boyut analizini yapılabilmektedir. Flow sitometri prensibine göre; akış halindeki numuneler içerisindeki eksozomlar lazer ışığıyla hücre saçılma ve floresan sinyalleri üretir. Bu sinyaller ise özel dedektörlerce algılanarak analiz etmektedir [132, 133, 134].

2.3.6.5 Dirençli Darbe Algılama- (Resistive Pulse Sensing-RPS)

Diğer karakterizasyon yöntemlerinde de olduğu gibi RPS’de süspansiyon içinde partiküllerin boyut ve konsantrasyon yoğunluğunu analiz etmektedir. Bu methodta, cihaz içerisindeki 1 μ m’nin altında olan nanoporlar aracılığıyla partikül hareketlerine göre hesaplanmaktadır [135,136]. Ancak bu da TEM’deki gibi büyük numune örneklerinin değil de daha küçük miktardaki örneklerinin analizlerinin yapılabilmesi mümkün kılabilir.

2.3.6.6 Yüzey Plazmon Rezonansına Dayalı Nanosensörler

Hassas bir yöntem olan yüzer plazmon rezonansına dayalı nanosensörler; süspansiyon içindeki moleküllerin metal yüzey üzerine yaptığı absorpsiyon ile oluşan kırılma indisine bağlı olarak kütle ve konsantrasyonunu izleme avantajı sağlayan bir yöntemdir. Henüz klinik uygulamalara geçmemiş bu yöntem, proteinler, lipidler ve nükleotidler dahil olmak üzere eksozomların toplam kütesini ifade etmektedir. Ancak bu yöntemde bazı yöntemlerdeki gibi küçük hacimdeki numunelerin analizlerini yapabilmektedir [137].

2.3.7 Eksozomların Tanı ve Tedavi Amaçlı kullanımı

Eksozomların keşfinin ardından uzun süre, bu yapıların asıl görevlerinin hücrelerin olgunlaşma sürecinde hücre atığı yani “çöp” olduğu varsayılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar bu yapıların altından karmaşık bir mekanizmanın olduğunu göstermiştir. Eksozom bileşenleri; çeşitli proteinler, lipidler ve genetik materyalleri (örneğin, miRNA, mRNA, DNA moleküllerinin yanı sıra uzun kodlamayan RNA'lar) içerdiği görülmesiyle asıl işlev mekanizması aydınlatılmaya başlanmıştır. Bu bileşenleri sayesinde eksozomların, hücre iletişimini önemli bir parçası olduğu görülürken aynı zamanda da epigenetik düzenleme de önemli bir role sahip olduğu kabul edilmiştir [138]. Canlı hücrelerdeki eksozomların şartları ne olursa olsun, köken aldıkları hücreler tarafından diğer hücrelere iletilecek bilgiler ince bir şekilde düzenlendiği görülmüştür [139]. Bu yüzden eksozomlar köken aldıkları hücrelerin fonksiyonel durumları hakkında detyalı bilgi verebilme kabiliyetine sahiptir.

Biyoteknolojik çalışmaların gelişmesiyle birlikte eksozomların özellikleri sayesinde hem tanı da hem de tedavi amacıyla kullanılabilecek ideal bir araç olduğu düşünülmeye başlanmıştır. Özellikle, eksozoma dayalı tanı, invaziv olmayan tanılama için temeli oluşturmaktadır. Bunun dışında eksozomlar; ilaç dağıtımı [140], hücresiz aşı geliştirme [141] ve rejeneratif tıp [142] başta olmak üzere pek çok biyomedikal alanların araştırmalarına yönelik ilgi artmıştır. Bu ilginde her geçen artacağı düşünülmektedir. Ancak eksozomların, klinik uygulamalar için karşılaştığı en büyük engellerin izolasyon zorluğu, izolasyon saflığı ve kontaminasyon olduğu bilinmektedir. Daha basit ve yüksek saflıkta bir izolasyon

yönteminin geliştirilmesi klinik uygulamalara yönelik çalışmalara ivme kazandıracaktır [143]

Özellikle dolaşımdaki tanısal biyobelirteçlerin tanımlanması erken teşhis büyük avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir. Sadece tanıya yönelik değil aynı zamanda hastalıkların patolojik başlangıçlarının aydınlatılmasına, hastalıkların tekrarlanmasını veya mevcut tedavinin etkilerinin gözlenmeyebilmek imkanı sağlayacaktır. Dolaşımda bulunan proteinler ve nükleik asitler kararsız olduğundan özellikle bazı hastalıkların biyobelirteçi olma konusunda yetersizdir. Bu sebeple belirteç niteliği taşıyabilecek daha kararlı moleküller üzerinden araştırılmaların yapılması gerekir. Ancak yine de çoğu hastalığın geç evresinden bu belirteçler ortaya çıkabilirken bazı hastalıklarda ise bu belirteçler ortaya dahi çıkmayabilir. Eksozomların biyobelirteç olarak kullanımı ise, bu sorunların üstesinden gelme konusunda umut vaad etmektedir.

Son yıllarda; kan, idrar [144], beyin omirilik sıvısı (BOS) [145] anne sütü [146] tükürük [147] amniyotik sıvı [148] ve meni [149] başta olmak üzere hemen hemen tüm vücut sıvılarında eksozom varlığı tespit edilere ve izolasyonu yapılabilmıştır. İçerikleri, köken aldıkları hücrenin durumunu yansıtmalarıyla hücrelerin “parmak izi” veya “imzası” olarak tanımlanabilmektedir [6]. Biyobelirteçler üzerinden eksozomların en çok araştırıldığı hastalık ise kanserdir. Wang ve ekbinin 2014 yılında yaptığı bir araştırmaya göre; hepatosellüler kanser hastalarının eksozomal miRNA seviyeleri araştırılmış olup, burada miRNA-22'nin ekspresyon seviyesi anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur [150]. Ayrıca prostat kanseri hastalarından izole edilen idrar eksozomlarında, prostat kanseri geni-3 ile prostat spesifik antijeni gibi biyobelirteçler içerdiği rapor edilmiştir [151]. Benzer şekilde, beyin metastatik kanserinde eksozomal miRNA araştırılmış ve miRNA-210'un yukarı regüle olduğu, miR-19a ve miR-29c'nin aşağı regülasyonu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [152].

Özellikle sinir sisteminin eksozomal miRNA'sında hastalığın başlangıcı, aşamaları yansıtmaları konusunda oldukça önemli role sahiptir. Dolaşım da eksozomal miRNA ise kanda bol miktarda bulunup stabiliteye sahiptir [153]. 2017 yılında yapılan bir çalışma da; serumda izole edilen eksozomların, qPCR ve ROC eğri analizi

kullanılarak miR-195, miR-19b ve miR-24 ekspresyon seviyeleri saptanmasıyla bu verilerin Parkinson hastalığının tanısında noninvazif biyobeliteç olarak yardımcı olabileceğin rapor edilmiştir [154]. Ayrıca Lewy body cisimciğinin birikimin indikleyen eksozomal miRNA ve gen boyutlarındaki ekspresyon seviyeleri arasında ilişkilerin bulunduğu saptanmıştır [155, 156]. Parkinson hastalarının serumlarından türetilen eksozomların proteomik analizi, bu hastalığında genetik ve sporadik formlarına sahip hastaların ve sağlıklı deneklerin gruplandırılmış örnekleri üzerinde gerçekleştirilen, eksozom biyogenez sentenin 1'in düzenleyicisi dahil olmak üzere, Parkinson hastalarının farklı 23 eksozomla ilişkili protein tanımlamıştır [157].

Eksozomların sadece tanı amaçlı değil aynı zamanda iyileştirici etkisi nedeniyle diyabetik yaralararda etkin bir terapötik ajan olduğu görülmüştür [158]. Dahası bugüne kadar yapılan araştırmalar, eksozomlarının miyokardiyal I/R hasarına karşı koruduğu [159], iskemi oluşumunu özellikle ekstremitelerde ciddi oranda azalttığı [160], hepatik rejenarasyona katkı sağladığı [161], retina hasarlarını iyileştirici etkisine sahip olduğu [162], görülürken son zamanlarda sıklıkla araştırılan kırık ve kemik rejenarasyonuna da katkı sağladığı bulunmuştur [163, 164].

Bu bilgiler ışığında eksozomların tedavi amaçlı kullanımına yönelik çalışmalar hızla sürdüğünü söylemek mümkündür. Tedaviye ve tanı yönelik önemli bulgular sergilemelerine rağmen halen daha klinik uygulamalarının yapılamıyor olmasının önündeki engelleri bir kaç yıl içinde kaldırabileceğini düşünmekteyiz.

2.3.8 Eksozom Tabanlı İlaç Dağıtım Sistemleri

Son yıllarda ilaç moleküllerinin istenilen bölgeye güvenli ve bozunmadan etkili bir şekilde iletilme amacıyla ilaç tasarımı ve geliştirilmesine yönelik çalışmalar gün geçtikçe daha da artmaktadır. Özellikle sentetik ilaç bileşenlerden daha çok biyolojik ilaçların geliştirilmesi odak noktası olmuştur. Bu yüzden eksozomlar mimetikleri doğanın biyolojik dağıtım araçlarını taklit ettikleri, ancak biyolojik muadilleri kadar karmaşık olmadıkları göz önüne alındığında, umut verici aday dağıtım araçlarıdır.

Eksozom tabanlı bir dağıtım sistemi, özgüllük, güvenlik ve kararlılık gibi belirli avantajlara sahiptir. Hedef arama özellikleri sayesinde eksozomlar, yüklerini uzun bir mesafe üzerinden belirli hedeflere ulaştırabilir. Ayrıca RNA (siRNA) veya farmasötik olarak aktif maddeleri iletmek için de kullanılabilir [165]. Eksozomların ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilmesinin pek çok avantajı olduğu söylemek mümkündür. Özellikle biyolojik bir nanokesecik olduğundan hücre zarıyla kaynaşabilirken fagositozdan kaçabilme yeteneğine sahiptir. Bu sebeple de eksozomların düşük immün yanıt oluşturmaları [166]. Ayrıca DNA, RNA, miRNA, siRNA, ve ilaçlar gibi çeşitli bileşenleri aktarma konusunda etkili bir nanotaşıyıcı görevi üstlenebilir [167].

Diğer yandan, eksozomların yüzey özelliği sayesinde, ilaç taşıyıcı sistem olarak hedef hücreler ile verimli bir şekilde etkileşime girebilecekleri ve yüklenen ilacı aktif bir şekilde iletebildikleri yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Eksozomların yüzeyinde bulunan çeşitli yapışkan proteinlerin (tetraspaninler ve integrinler) ekspresyonuna bağlı olarak bu ekstraselüler veziküllerin alıcı hücre membranlarıyla kolayca etkileşebildikleri ve bu hücrelerle füzyon yapabildikleri gösterilmiştir [168]. Eksozomlar hidrofilik ilaçları çekirdekte kapsüllemesini ve hidrofobik molekülleri lipit çift tabakası ile taşıyıcı sistem olarak geliştirilebilir. İlaç yükleme için bilinen 2 yöntem bulunmaktadır. Bunlar;

- 1- Eksozom izolasyonundan önce yükleme yöntemi
- 2- Eksozom izolasyonundan sonra yükleme yöntemidir.

2.3.8.1 Eksozom İzolasyonundan Önce Yükleme Yöntemi

İlaç yada terapötik ajanlar, eksozomun üretilmeden önce dahil edilmesi prensibine dayanan yöntemdir. Eksozomlara hücre içinde biyogenez süreci devam ederken yüklenmek istenen molekülü kapsülenmesini sağlayarak ilaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilmesi sağlar. miRNA , siRNA ve mRNA gibi terapötik gen , hücre transfeksiyonu yoluyla eksozomlara dahil edilmektedir. Polietilenimin(PEI)gibi katyonik polimerler [169] transfeksiyon yoluyla, peptitler ve proteinler gibi biyolojik yükleri de yükleme yapılabilceğini göstermiştir [170].

Böyle biyolojik yükler olmaksızın moleküllerin yüklenmesinden genetik manipülasyonlar veya modifikasyonlar olmayan hücreler direk olarak ilaç

molekölüne maruz bırakılarak yükleme işlemi de yapılbildiği görülmüştür. Ancak bu ilaç kapsüllenme yönteminin kesin mekanizması aydınlatılamamıştır. Bu konuyla yapılan çalışmalarının birinde; farklı hücre tiplerine herhangi bir genetik modifikasyon olmaksızın antikanser ilacı olan paklitaksele (PTX) maruz bırakıldığında, daha sonra izole edilen eksozomların anti-proliferatif etkiye sahip olduğu görülmüştür [171].

Ancak bu yükleme yönteminde ilaç yükleme kapasitesi, ilaç yükleme verimi ve salım kinetiği gibi faktörlerin hesaplanması daha zordur. Bu yöntemde bu basamaklarından aydınlatılması ve hesaplanması gerektiğini düşünmekteyiz.

2.3.8.2 Eksozom İzolasyonundan Sonra Yükleme Yöntemi

Eksozomların izole edildikten sonra ilaç yada terapötik ajan yüklemesinin yapıldığı yöntemdir. Eksozomlar, bir bilipid zara ve sulu bir çekirdeğe sahip olmaları bakımından lipozomlara benzediğinden, potansiyel olarak hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçlarla yüklenebilirler. Bu yöntem birkaç method içermektedir.

Bunlar;

1. İnkübasyon
2. Sonikasyon
3. Elektroporasyon
4. Dondurma- çözündürme döngüleri
5. Ekstrüzyonlar

- **İnkübasyon**

Bu yöntemde izole edilen eksozomlar direk olarak ilaç molekölü ile inkübasyona bırakılır. Yüklemesini kolaylaştırmak için herhangi bir ek mekanik veya elektriksel uygulama kullanmamaktadır. İnkübasyon ile yükleme yöntemin de hidrofobik ilaç moleküllerinin yükleme etkinliği açısından daha verimli olduğu görülmüştür [172]. Ancak bu yükleme yönteminden verimlilik düşüktür. İnkübasyon ile beyin endotel hücre hattı (bEND.3) izole edilen eksozomlara antikanser ilacı olan doksorubisin veya paklitaksel başarıyla yüklenmiştir. Elden edilen ilaç yüklü eksozomların antikanser ilaçlarına karşın daha yüksek etkiye sahip olduğu

kanıtlanmıştır [173]. Yine makrafaj hücre hattından (RAW 264,7) izole edilen eksozomlara katalaz ile inkübasyona bırakılmıştır ve yüklemenin başarılı olduğu ifade edilmiştir. Yükleme verimliliğini ilaın moleküler boyutu ve yükleme sırasındaki fizyolojik koşullarında etkileği görölmüştür [15].

İnkübasyon yönteminde herhangi bir mekanik veya elektriksel kuvvet ek olarak uygulanmasa bile verimliliği arttırmak için bazı membran geçirgenleştiriciler eklenebilmektedir. Bununla ilgili olarak en çok kullanılan membran geçirgenleştirici ise saponindir. Saponin eksozomun yüzeyinde bulunan kolesterol ile kompleksler oluşturarak, gözenekler oluşturabilme kapasitesine sahiptir. Bu sebeple zar geçirgenliğinde önemli ölçüde bir artışa yol açar [174]. 2015 yılında yapılan bir çalışmada; hidrofobik bir molekülün saponin ve saponinsiz olarak inkübasyon ile yükleme kapasitesine bakılmış ve saponin eklenmiş grubun diğer gruba kıyasla yükleme verimliliğinin yaklaşık 11 kat arttığı kanıtlanmıştır [175].

- **Sonikasyon**

Eksozom membranındaki lipit yapısından dolayı ilaç yükleme verimliliğın çok yüksek olmadığını bilinmektedir. Bu yapı ilaç yada terapötik ajan moleküllerinin hidrofobik çift katman boyunca dağılmasını ve eksozom içine girmesini zorlaştırır. Eksozom içersine daha fazla molekül yüklenebilmesi adına kullanılan yöntemlerden birisi de sonikasyondur. Bu yöntemin prensibinde; izoel edilmiş eksozomlar, ilaçlar veya terapötik ajan karıştırılır ve ardından bir homojenleştirici probu kullanılarak sonikasyon işlemine tabi tutulur. Bu prob mekanik kesme kuvveti ile eksozomların zar bütünlüğünü hafif de olsa deforme eder ve bu zar deformasyonu ile yüklenmek istenen molekül eksozom içersine girer. Bu işlem eksozom membran mikroviskozitesinin önemli ölçüde azaldığını için zar yapısını tehlikeye attığı görölmüştür. Ancak sonikasyon işlemin sonrasında eksozomları 37 °C'de inkübe edildiğinde bir saat içinde za bütünlüğünü restore edildiği bulunmuştur [176]. Sonikason inkübasyon yöntemi ile karşılaştırıldığında yükleme verimliliğın yaklaşık 1,5 kat arttığı görölmüştür [177].

- **Elektroporasyon**

Öncelikle moleküler biyoloji ve genetic mühendisliği alarından kullanılan, hücre dışı genlerin canlı hücreye aktarılmasını sağlayan bu yöntem; elektrik darbe

alanları oluşturarak hücre zarlarını dielektrik durumunu değiştirir. Bu da hücre zarının nispeten bozulmasını ve gözeneklerin oluşmasına neden olur [178]. Eksozomlarda hücre membran özelliklerine benzer membran yapısına sahip olduğundan bu yöntem de kullanılarak molekül yüklemesi yapılabileceği görülmüştür. Elektroporasyonun oluşturduğu elektriksel akım, eksozomların fosfolipid çift tabakasını bozar ve böylece sonikasyon yönteminde de olduğu gibi gözenekler oluşmasını neden olur. Bu gözenekler sayesinde molekül eksozom içerisine yayılabilmektedir. Eksozom membran bütünlüğünü daha sonra tekrar kazandığı görülmüştür. Bu yöntem daha büyük moleküller için örneğin siRNA veya miRNA'ların eksozoma yüklenmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Çünkü bu büyük moleküller kendiliğinden eksozom içerisine girebilme imkanı bulunmamaktadır [179]. Bununla birlikte, elektroporasyon yönteminin dezavantajı ise, eksozom kararsızlığına yol açtığı için yükleme verimliliğinin düşmesine neden olabilir. Ancak bu durum içinde elektrik voltajı, elektrot malzemesi ve elektroporasyon tamponları gibi elektroporasyon parametreleri, ilaç yüklemesini iyileştirmek için modifiye edilebilerek çözümlenebilir [180].

- **Dondurma-çözdürme döngüleri**

Bu yöntem kısaca ilaç yada terapötik ajanla eksozomla birlikte inkübasyona bırakılır. Daha sonra ise bu karışım -80 °C'de veya sıvı nitrojende hızla dondurulur ve tekrar oda sıcaklığında çözündürülür. Böyle dondurma-çözülme en az 3 döngü olacak şekilde devam eder [181]. Bu yöntemin prensibi ise, sınırlı donma ve çözdürme döngülerinden sonra eksozomların lipid çift tabakasında hafif bir bozulma ile molekülleri eksozom içine yayılmasını amaçlanır [15]. Ancak bu yöntem sonikasyona göre daha düşük yükleme verimliliğine sahiptir.

- **Ekstrüzyonlar**

Ekstrüzyon yönteminde ise, izole edilen eksozomların kontrollü sıcaklık ve basınç altında 100-400 nm arasındaki gözenek boyutlarına sahip filtreler geçirilmesi prensibine dayanır [182]. Ekstrüzyon sırasında, eksozom membranından bozulmalar görülür ve bu bozulan membrandan ilaç yada terapötik molekül eksozom içerisine yayılır. Bu yöntemde kullanılan sert mekanik kuvvetin zar protein yapıları ve zar özelliklerini değiştirip değiştirmediği hala belirsizdir. Ancak

yapılan bir çalışmada meme kanseri hücre hattından izole edilen eksozomların bu yöntem kullanılarak porfirin yüklemiş ve elde edilen yeni taşıyıcı sistemin zeta potansiyelinde değişiklik olmazken, yüklü eksozomların sitotoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir [175].

2.3.9 Mezenkimal Kök Hücrelerden (MKH) Elde Edilen Eksozomların Özellikleri

Kök hücre, bir hücre türüne özelleşmemiş, boyut ve fonksiyonları azalmamış, kendi popülasyonlarını koruyan, bölünerek kendini yenileyebilme ve indüklendiğinden farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir [182]. Mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomlar, kemik iliği (BMKH'ler), yağ dokusu (ADSC'ler), Wharton jeli, Olfaktör gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir [184,185].

Son zamanda kök hücreler gerek klinik gerekse temel araştırmalar açısından oldukça önem kazanmıştır. Özellikle MKH tabanlı uygulamalar, çeşitli hayvan hastalık modellerinde ve kemik kırığı [186], travmatik beyin hasarı [187], felç [188] ve miyokard enfarktüsü [189, 190] gibi hastalıklarda olumlu terapötik etkileri olduğu açıkça görülmüştür. Bu hücrelerden izole edilen eksozomların ise rejeneratif tıp alanında güvenilir bir terapötik ajan olduğu kanıtlanmıştır [191]. MKH kökenli eksozomların, bağışıklık, karaciğer, kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik hastalıklar olmak üzere pek çok hastalıklarda terapötik etkin olduğu bulunmuştur [192, 193]. Yapılan araştırmalara göre; MKH kökenli eksozomların özellikle yaralanmalar sonrasında doku onarımından terapötik ajan olduğuna yönelik kanıtlar her geçen gün artmaktadır [194]. MKH-eksozomlarının, endotel hücrelerinde çeşitli sinyal yollarını aktive edebilen mRNA (mRNA) ve miRNA'lar dahil olmak üzere çeşitli anjiyogenez ile ilgili proteinler ve RNA'larda zenginleştirilmiş olup ve bu eksozomlar trofik faktörün ekspresyonunu indükleyebildiği görülmüştür [195]. Ayrıca bu eksozomlar miRNA-133b'yi astrositlere ve nöronlara aktardığını ve inme sonrası nöral büyümeyi ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği kanıtlanmıştır [196,197].

2.4 Biyomalzemeler

Doğal veya sentetik, genellikle birden fazla bileşenin bir araya gelmesiyle oluşan, tıbbi amaçlı biyolojik sistemlerle etkileşime girme kabiliyetine sahip özel olarak tasarlanmış malzemelere biyomalzemeler denir. Biyolojik sistemle etkileşime

geçen bu biyomalzemeler ya terapötik etki yada tanısal amaçlı kullanılmaktadır [198].

1980'li yıllarda doku mühendisliğine yönelik çalışmaların başlamasıyla birlikte biyomedikal uygulamalar artmış ve biyomalzemelerin rejenerasyon özellikleriyle hasarlı ve hastalıklı vücut kısımlarının değiştirebileceği yada yerini alabileceği fikriyle bu alanda yapılan çalışmaların ivme kazanmasına neden olmuştur [199]. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki, bu materyaller, doku yenilenmesinin doğal sürecindeki gibi hücre aktivitelerini ve fonksiyonlarını yönlendirebilen yapısal, mekanik ve bileşimsel sinyaller sunabilme kabiliyetine sahiptir [200,201]. Son yıllarda da bu alanı olan ilginin altından yatan en büyük sebepte budur. Çünkü, hastalıkları tedavi etmek, vücut fonksiyonlarının restorasyonuna yardımcı olmak ve sağlıklı dokular oluşturabilmek için geliştirilen ve geliştirilme araştırmaları devam eden implantlar, biyomedikal cihazlar ve doku iskeleleri bu alanın temel taşı oluşturmaktadır [202].

Biyomalzemeleri kendi içerisinden 4 sınıfa ayırmak mümkündür. Bunlar;

1. Metaller,
2. Seramikler,
3. Polimerler,
4. Kompozitlerdir.

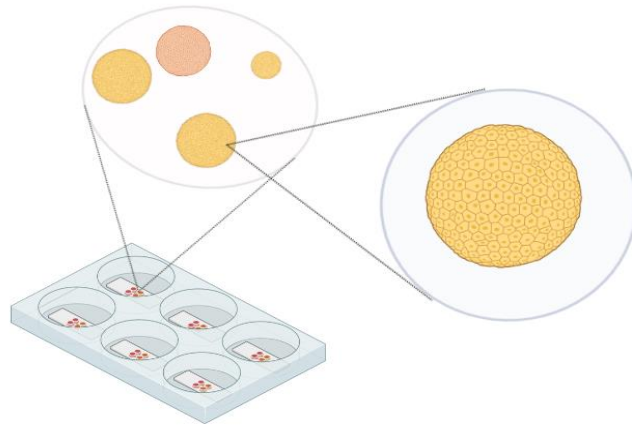
2.4.1 Biyomalzemelerin 3Boyutlu (3B) Hücre Kültüründe Uygulamaları

Canlı organizmadaki aynı hücreler biraraya gelerek dokuları, dokular bir araya gelerek organları, organlarda bir araya gelerek sistemleri oluşturan, son derece karmaşık biyolojik sistemi oluştururlar [203]. Bu karmaşık sistemi laboratuvar koşullarında anlayama yönelik çalışmalar devam etmektedir.

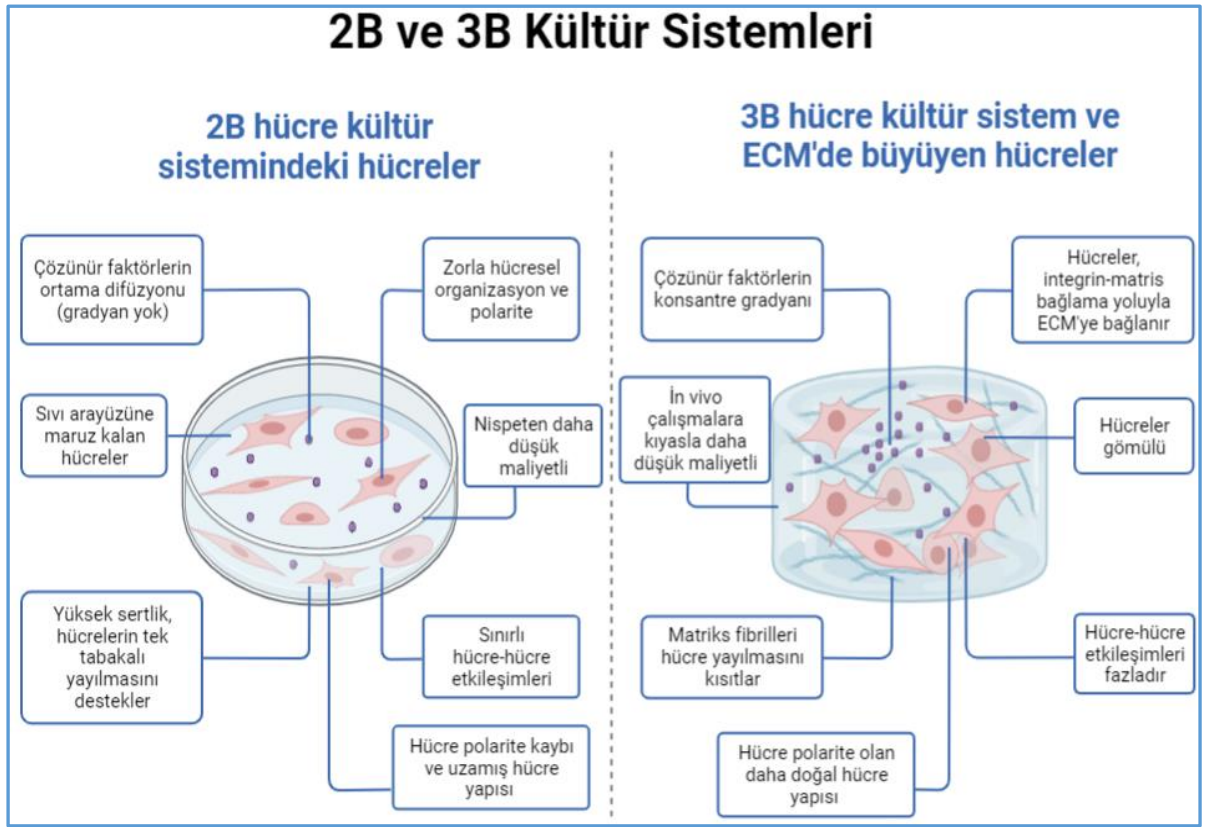
Uzun süredir, polistiren veya camdan hazırlanmış kültür kapları içerisinde bu karmaşık sistem taklit ederek iki boyutlu (2B) hücre kültürü gerçekleştirilmektedir [204]. Bu 2B kültür sistemi bir çok araştırmayı sürdürebilmek adına gerekli olsa da bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Kültür kapları içerisinde, hücrenin çoğalması için fizyolojik koşullar sağlanarak devam edilen bu sistemin, tek bir hücre tipi içermesinden kaynaklı farklı hücreler arası intrasellüler iletişimin olmaması [183], doğal ortamdakilere kıyasla hücresel morfoloji, işlevler ve genel

davranışta bir fark gözlenmesi [205] en büyük dezavantajlarından birisidir. Bu bilgiler ışığında, farklı hücrelerin de kültür sistemi içerisinde yer alabilmesi, hastalık modellerinin in vivo fizyolojisine yakın özellikleri taklit edebilmesi, geliştirilen modellerde hücresel ve moleküllerin araştırılmasını yapılabilmesi ve özellikle etik kurallara uygun alternatif sistemin geliştirilmesi büyük önem arz etmiştir.

3 Boyutlu (3B) kültür sistemleri ise; hücre popülasyonları arasındaki direkt hücre-hücre etkileşimi sağlayabilen hücre dışı matrise (ECM) gömülü halde in vivo ortamdaki mikroçevre benzeri bir sistemlerdir [206]. ECM, burada hücre-hücre etkileşimlerini, hücre yapışmasını, farklılaşmasını ve büyümesini düzenleme rolünü üstlenir [207]. Böyle bir ortam içerisinde hücre hücre etkileşimi artarak hücrelerin biriyle kümelenmesine neden olur. Bu kümelenmiş hücre yapılarına ise sferoid denir [208]. 3B kültür sisteminde sferoid yapının şekil 2.4'te gösterilmiştir. Ayrıca 2B ve 3B kültür sistemlerin özellikleri şekil 2.5 'te gösterilmiştir. Bu bağlamda, 3B kültür sistemleriyle yapılacak olan klinik öncesi tüm çalışmaların daha da önem kazanacağını öngörmekteyiz.



Şekil 2.4 3B kültür sisteminde sferoid oluşumu (Biorender.com'da çizildi)



şekil 2.5 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması (Biorender.com'da çizildi)

3B hücre kültürü sistemlerindeki, hücreyel fonksiyonların geliştirilmesi için ECM ile yüksek düzeyde benzerliğe sahip biyomalzemelerin kullanılmasını gerektirir. Biyomalzemeler zellikleri sayesinde, 3B kültür ortamını oluşturabilmeyi mümkün kılmıştır. 3B kültürlere de kullanılan biyomazlemeler;

- Hidrojeller
- Hücre İskeleleleri
- Hcresizleştirilmiş Doğal Doku
- Ultra Düşük Bağlantı Yüzeyi

Bu çeşitli formlardaki kültür ortamları hücre fonksiyonlarının verimliliğini artırmak için kullanılmaktadır. Oluşturulan bu sistemde başta terapötik ajanlar ve tanılama araştırmaları olmak üzere bir çok çalışmanın sürülmesine katkı sağlamıştır.

2.4.1.1 Hidrojeller

3 boyutlu yapıyı oluşturmak üzere kullanılan biyomalzemelerden birisi de hidrojellerdir. Hidrojeller; hidrofilik özelliğe ve büyük miktarlarda su veya biyolojik sıvıları absorbe edebilen polimerik ağlara sahip olması onun kültür ortamı için en uygun adaylardan birisi yapmıştır. Ayrıca hidrojeller doğal doku ECM'sine benzer yapısı olup, yumuşak ve ıslak ortamı sayesinde O_2 , besin, atık ve çözünür diğer faktörleri taşınmasına kolaylık sağlamaktadır [209, 210]. Hücre kültürü için hidrojeller, sentetik ve doğal olmak üzere 2 sınıfa ayrılır. Sentetik hidrojeller çeşitli hücre tiplerine yapısal destek sağlayarak kültür sistemin gelişmesine yardımcı olurken, doğal hidrojeller ise, biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunur olan bu malzeme hücresel aktiviteleri destekler. Doğal hidrojeller, kolajen, aljinat, hyaluronik asit oluşur ve bir çok hücrenin canlılığını devam ettirmesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını katkı sağlamaktadır [211, 212, 213]. Sentetik hidrojeller ise; Polivinil alkol (PVA), Poli- hidroksietil metakrilat (pHEMA), Poli-etilen glikol (PEG)'den oluşmaktadır. Sentetik hidrojeller ile oluşturulan 3B kültür ortamlarının; doku onarımını, poliferasyonu ve canlılığı teşvik ettiği görülmüştür [214,215].

2.4.1.2 Hücre İskeleleleri

En eski yöntemlerden birisidir. Bu sistemde iskeleler, çoğalmayı, hücrelerin yapışmasını ve hücresel haberleşme aktivitelerini kolaylaştırdığı görülmüştür. Ancak bu etkiler, iskeleyi oluşturan biyomalzeme, açıkta kalan yüzey, gözenek boyutu, gözenek dağılımı ve birbirine bağlanabilirlik gibi fiziksel faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Bu hücre iskeleleri için birkaç sentetik polimer kullanılmıştır. Bunlar; poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit) (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polikaprolaktondur. Ancak bu yöntem fiziksel olarak kısa zaman için de kolayla hazırlanabilse de Hücrelerin homojen dağılımı konusunda zorluklar yaşanmaktadır [216,217].

2.4.1.3 Hücresizleştirilmiş Doğal Doku

Sentetik iskeleler yardımıyla doğal geometrik morfolojiye sahip, esneklik ve mekanik mukavemet sağlayan hücresizleştirilmiş bir matris ile 3B kültür ortamı yapılabilmektedir. Son zamanlarda daha da dikkat çeken bu yöntem; tüm organın

perfüzyonu (yoğun organlar/dokular için, bir basınç gradyanı uygulaması (içi boş dokular için), süper kritik sıvı kullanımı (uzun süreli depolama için uygun) gibi çeşitli yöntemler içerdiği bildirilmiştir. Dokuya özel ECM'nin biyokimyası, biyomekaniği ve 3B dokularını oluşturabilmesi en önemli avantajları arasında yer alırken; diğer 3B kültür ortam biyomalzemelerine kıyasla dokuların pürüzlülük, elastikiyet ve gerilim kuvveti gibi mekanik özelliklerinde önemli ölçüde azalma olduğu tespit edilmiştir [218,219,200].

2.4.1.4 Ultra Düşük Bağlantı Yüzeyi

Bu biyomalzeme prensibinde ise; hücre kültürü kaplarının yüzeyleri hücrelerin yüzeye yapışmasını önleyebilen, hücre bağlanma özelliklerini düşük biyomalzemeler ile kaplanır. Ultra Düşük Bağlantı Yüzey yönteminde, hücrelerin kültür kaplarının yüzeyine yapışamaz ve bu da hücrelerin ortam içine yüzmesine neden olur. Bu sebeple hücreler arası etkileşim artarak hücreler kümelenme eğilimi gösterir [221]. Bu yöntem kullanılarak hazırlanan 3B kültürler in vivo koşullara benzer bir ortam sağlayabilirken; seri üretimde zor olması en büyük dezavantajdır [222].

3.1 MATERYAL

3.1.1 Ekipman

- Steril hücre kültür odası
- Hava akımlı kabinler (Laminar flow -Thermo Scientific Hera safe, Faster BH-EN 2006)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C, FrioCell 111 25 °C)
- İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- -195°C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- Spectrostar-Nano-Spectrophotometry (BMG LABTECH)
- Optima XPN-100 Ultrasantrifüj (Beckman Coulter)
- Nanosight 300-NS300 (Malvern Panalytical)
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Agilent Technologies)
- Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), JASCO 6600-Tetra
- Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı, Zetasizer Agilent TechnologiesQ500 Sonicator (Qsonica, LLC)
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM) Cihazı, FEI QUANTA 450 FEG ESEM SEM
- Vorteks (Biobase)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- 10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler (Thermo, Pippetman)
- 1-10, 10-100, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık pipet uçları (AxyGen)
- Santrifüj tüpleri -1, 2, 15, 50 ml. (Eppendorf , IsoLAB)

- Hücre kültür flaskları -25 cm², 75 cm² (TPP, Nest)
- 6, 12 ve 96'lık well plate (Falcon, TPP microplates)
- 0.22 µm membran filter (Aısimo)
- 0.45 µm syringe filter (Aısimo)
- Enjektörlar 10 cc'lik (Ayset)

3.1.2 Kimyasallar

- Dopamine hydrochloride 10G (Sigma)
- Thylazoyl blue tetrazolium bromide (MTT) (Biomatik)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium- F12 (DMEM –F12) (Sigma)
- Penisillin-streptomisin (PAN Biotech)
- FBS-fetal bovine serum (Capricorn)
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (AppliChem)
- Tripsin-EDTA (Multicell)
- Saponin (Sigma)
- Acetonitril (Sigma)
- Dipotasyum fosfat, K₂HPO₄ (Sigma)
- Monopotasyum fosfat, KH₂PO₄ (Sigma)
- Sodyum di hidrojen fosfat mono hidrat, NaH₂PO₄.H₂O (Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat, Na₂HPO₄ (Merck)
- KCl (Sigma)
- Jelatin/Alginat Bioink Toz (HD Bioink/ Baseink)
- CaCl₂ çapraz bağlayıcı (HD Bioink)
- Anikorlar: βIII tubulin-fare (Santa cruz Biotechnology; Purifield anti-tubulin Beta Biolegend MMS-435P);
- Sekonder antikorlar: Anti-fare IgG-FTIC-tavşan (Santa cruz Biotechnology)

3.2 Deneylerde Kullanılan Besiyerleri, Tampon ve Kimyasalların Hazırlanması

3.2.1 Tamponlar

- **PBS Tamponu**

8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2 g KCl tartılıp distile su eklenerek Ph metre ile pH ölçüldü ve pH'ı 7,4'e ayarlanacak şekilde son hacim 1000 ml olacak şekilde solüsyon hacmi tamamlandı ve süzüldü. Takibinde sterilizasyon amaçlı otoklavlama yapılarak kullanım için $+4^\circ\text{C}$ saklandı.

- **MTT Solüsyonu**

MTT tuzu 5 mg/ml PBS içerisinde hazırlanıp vortekslendi, Önce 0,45 μl ' lik filtreden ve daha sonra 0,22 μl 'lik filtreden geçirilerek steril edilip -20°C 'e kaldırıldı.

- **6-OHDA Solüsyonu**

6-OHDA, 10mM ana stok konsantrasyonu olacak şekilde % 0.9 (w/w) NaCl ve %0.2 (w/v) askorbik asit içeren ultra saf su içerisinde çözüldükten sonra hazırlanan çözeltinin sterilizasyonu 0.22 μm filtreden geçirilerek sağlanmış, her seferinde ana stok taze hazırlanmıştır.

3.2.2 Besiyeri

- **Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması**

Hücrelerin dondurma solüsyonu %90 FBS ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) 10 ml olacak şekilde, 15 ml'lik falkonlarda hazırlandı ve -20°C saklandı.

- **Dulbecco'nun Modifiye Eagle Nutrient Mixture-F12 Medyumu**

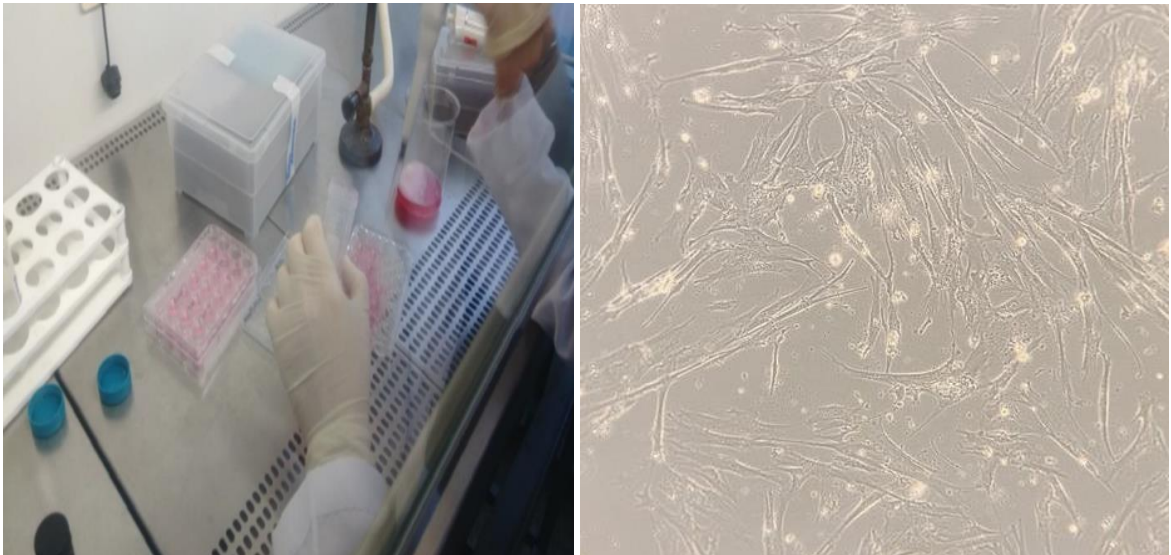
%10 FBS içeren DMEM-F12 besiyerinin hazırlanması için 50'lik falkona 45 ml besiyeri alınıp 0.5 ml penisilin-streptomisin ve 5ml FBS ile tamamlandı.

3.3 Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

In vitro çalışmalar İstinye Üniversitesi, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda yapıldı. Eksozom izolasyonu için Wharton Jeli Mezenkimal kök hücreleri (WJ-MKH) kültüre edilerek yapıldı.

3.3.1 Wharton Jeli Mezenkimal kök hücreleri (WJ-MKH) Çoğaltılması ve Kriyoprezervasyonu

Wharton Jeli Mezenkimal kök hücreleri (ATCC/ WJ-MKH) İstinye Üniversitesi'nin Doku Mühendisliği laboratuvarında -80°C bulunan hücrelerin canlandırılarak kültüre edildi. Hücreler 37°C 'de hızlıca çözündürülmüştür. Çözündürülen hücreler, içerisinde %10 Fetal Bovine serum, L-Glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum piruvat ve sodyum bikarbonat bulunan DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde 37°C 'de, %5 CO_2 içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücrelerin iki günde bir besi ortamı değiştirildi. Flask yüzeyini kaplayan WJ-MKH hücreleri tripsin kullanılarak kültür flaskının yüzeyinden ayrılıp 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 1000 rpm' de 5 dakika santrifüjlendi ve süre sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. 15 ml'lik falkon tüpünün dibinde kalan hücrelerin 1 ml yeni hazırlanmış %10 FBS içeren besiyeri ile süspanse edilerek Thoma lamı ile hücrelerin sayımı yapıldı. Yaklaşık 250 μl ' lik hücre süspanسیونundaki hücre sayıları hesaplanıp 5 ml taze besiyeri içine 100.000 hücre/ml ekimi yapılarak devamlı kültür yapıldı. Devamlı kültürü yapılan hücreler 1ml'de 1×10^6 olacak şekilde, %10'luk dimetil sülfoksit (DMSO) ile kriyoprezervasyonu gerçekleştirilerek -80°C 'e kaldırıldı [223, 224].



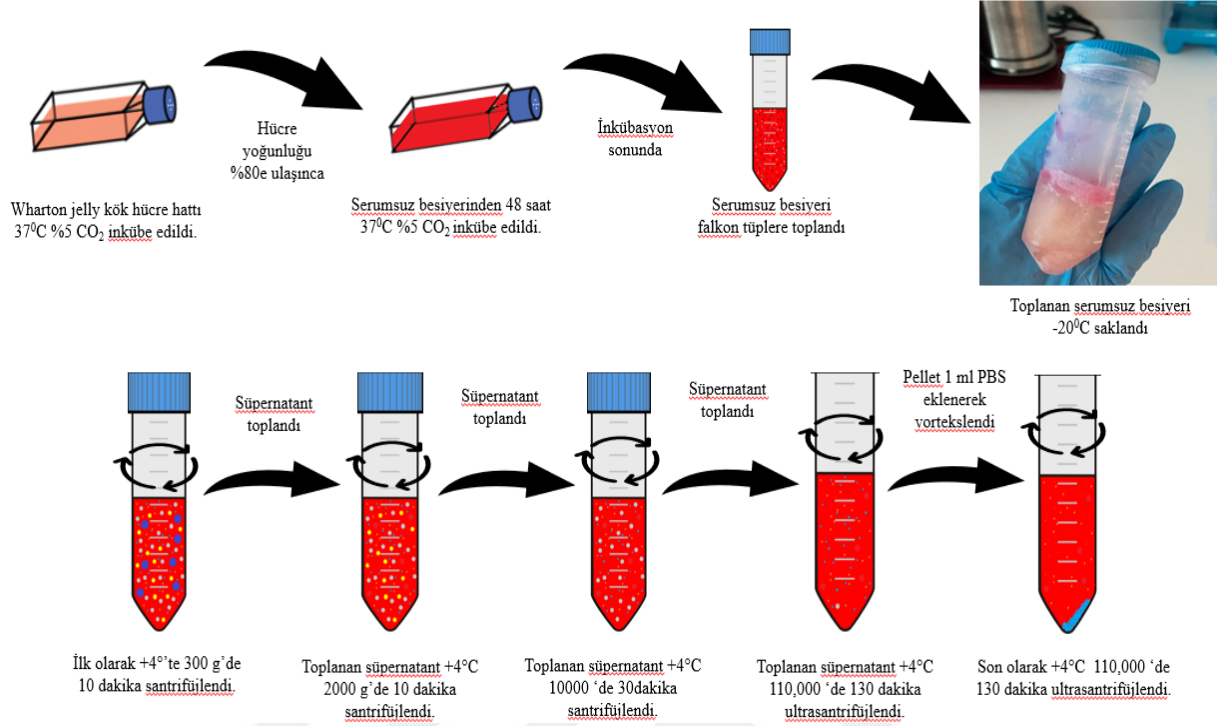
Şekil 3.1 Wharton jeli hücrelerinin mikroskop görüntüsü (10X)

3.3.2 WJ-MKH Kökenli Eksozomların İzolasyonu

Hücreler yeterli yoğunluğa ulaşınca kadar kültüre edilmeye devam edildi. Flask yüzeyi %80 yoğunluğunda hücre ile kaplanınca serumlu ve antibiyotikli besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler Serumsuz olarak hazırlanan %1 Pen/Strep DMEM-F12 (serum-free medium) ile 48 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin supernatantları falkon tüplere toplanarak besiyerleri -20°C'de saklandı. Toplanan besiyerlerinden eksozom izolasyonu için öncelikle;

- Falkon tüplere koyarak +4°C'de 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası elde edilecek süpernatant +4°C'de 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Daha sonra süpernatant tekrar toplanarak +4°C'de 10,000 g'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Santrifüj basamağının ilk kısmı tamamlanan besiyerleri soğuk zincirde Yeditepe Üniversitesi Ar-Ge laboratuvarında ultrasantrifüj aşaması yapılmıştır. Son santrifüj işleminin ardından süpernatant ultrasantrifüj tüplerine aktarılarak 110,000 g'de 130 dakika santrifüj edildi.
- Bu işlemi takiben süpernatant uzaklaştırılacak sonraki işlemlerde santrifüj sonrası elde edilen pellet kullanıldı.
- Her bir tüpteki pelletler 1 ml PBS eklenerek +4°C'de 110,000 g'de 70 dakika boyunca tekrar santrifüj edildi.
- Daha sonra ultrasantrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak üzerine 1 ml PBS eklendi. Eksozomlar ultrasantrifüj tüplerinden ayrılması için 3 dk. boyunca pipetaj yapıldı [224].

İzole edilen eksozomların daha sonra karakterizasyonu yapıldı.

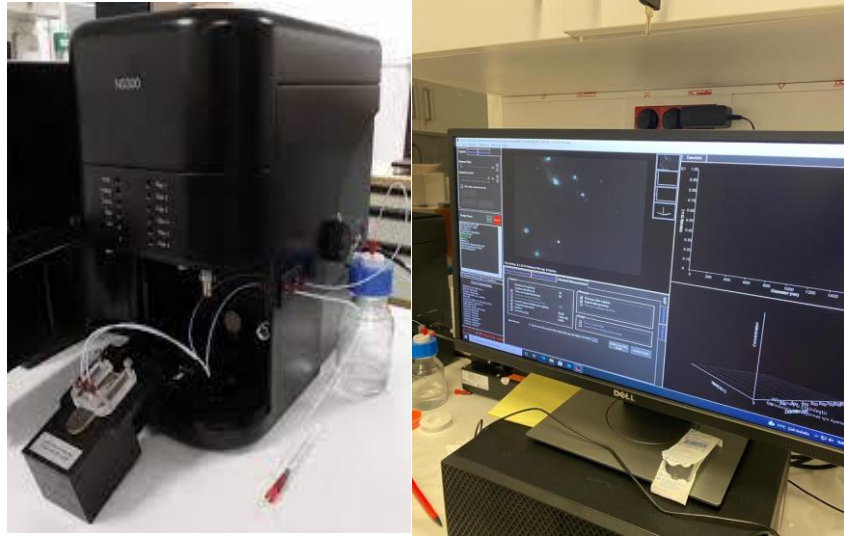


Şekil 3.2 Eksozom izolasyon prosedürü

3.3.3 Eksozomların Karakterizasyonu

3.3.3.1 Nanopartikül İzleme Analizi (NTA)

İzole edilen eksozomlar, nanopartikül izleme analizi ile konsantrasyon ve boyut ölçümü yapılmıştır. NTA Yeditepe Üniversitesi Ar-Ge laboratuvarında yapılmıştır. Ultrasantrifüj sonrasında elde edilen çözelti PBS eklenerek 1 ml tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 10 µl eksozom üzerine 990 µl PBS eklenerek 100 kat seyreltilmiştir. Seyreltilerek hazırlanan çözelti tek kullanımlık enjektör kullanılarak NTA ünitesine yüklendi [127,128].



Şekil 3.3 NTA cihazı

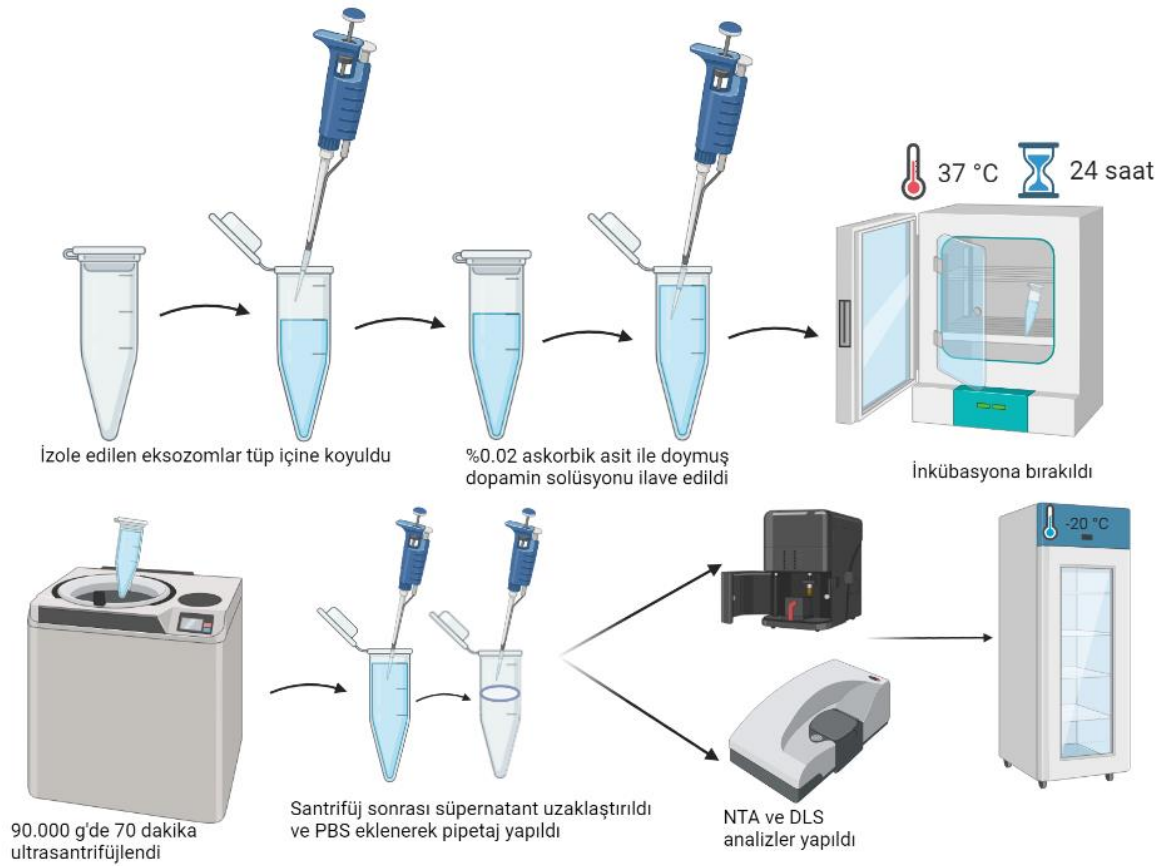
3.3.3.2 Dinamik ışık saçılımı (DLS)

İzole edilen eksozomlar NTA analize ek olarak Zeta Sizer analizi yapılmıştır. Zeta Sizer Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik ABD yapılmıştır. Bu analizde elde edilen çözeltideki eksozomların zeta potansiyeli ve boyutlarının ölçümü yapılmıştır. Bu çözeltiden 20 μ l eksozom üzerine 980 μ l PBS eklenerek seyreltilmiştir. Seyreltilen çözelti küvete eklenerek analizi yapıldı [124].

3.3.4 Eksozomlara Dopamin Yüklenmesi

Eksozomların karakterizasyonu tamamlandıktan sonra, ilaç taşıyıcı sistemi olarak dopamin yüklü eksozomlar elde edildi. Eksozomlara ilaç yüklemesi inkübasyon yöntemiyle yapıldı. Bu metotta eksozomlar PBS ile seyreltildi. Partikül sayısı hesaplanarak toplam eksozom miktarı 3 mL'ye tamamlandı. Eksozomlara dopamin yükleme protokolü şekil 3.4'te gösterilmiştir.

Yükleme öncesi seyreltilen eksozomlar 0,22 μ l filtreden geçirilerek sterilize edildi. 500 μ l steril eksozom solüsyonu alınarak eppendorf tüpe aktarıldı. Dopamin solüsyonunu (0,5 mg/mL) distile su ile hazırlandı. Hazırlanan dopamin solüsyonu 0,22 μ l filtreden geçirilerek sterilize edildi. Eksozomlar 500 μ l dopamin çözeltisine eklendi. Hazırlanan toplam çözeltinin %0,002'si kadar saponin çözeltisi eklendi [16]. 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda serbest dopamin ve saponin ortamdan uzaklaştırmak için 90.000 g'de 70 dakika ultrasantrifüj edildi. İzole edilen eksozomların karakterizasyon işlemlerinden sonra -20 °C'de saklandı.



Şekil 3.4 Eksozom ilaç yükleme prosedürü (Biorender.com'da çizildi)

3.3.5 Dopamin Yüklü Eksozomların Karakterizasyonu

3.3.5.1 Nanopartikül İzleme Analizi (NTA)

İzole edilen eksozomlar, nanopartikül izleme analizi ile konsantrasyon ve boyut ölçümü yapılmıştır. NTA Yeditepe Üniversitesi Ar-Ge laboratuvarında yapılmıştır. Ultrasantrifüj sonrasında elde edilen çözelti PBS eklenerek 1 ml tamamlanmıştır.

Bu çözeltiden 10 μ l eksozom üzerine 990 μ l PBS eklenerek 100 kat seyreltildi. Seyreltilerek hazırlanan çözelti tek kullanımlık enjektör kullanılarak NTA ünitesine yüklendi [127,128].

3.3.5.2 Dinamik ışık saçılımı (DLS)

İzole edilen eksozomlar NTA analize ek olarak Zeta Sizer analizi yapılmıştır. Zeta Sizer Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümü Doç. Dr. Serap DERMAN (Derman's lab) yapılmıştır. Bu analizde elde edilen çözeltideki eksozomların zeta potansiyeli ve boyutlarının ölçümü yapılmıştır. Bu çözeltiden 20 μ l eksozom üzerine 980 μ l PBS eklenerek seyreltildi. Seyreltilen çözelti küvete eklenerek analizi yapıldı [124].

3.3.5.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

NTA ve DLS analizleri tamamlanan dopamin yüklü eksozom çözeltisinden, çözeltisi içerisinde dopamin varlığı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle ölçüldü. Elde edilen formülasyonun içeriğinde dopamin varlığının tespiti için özel bir işlem ile eksozomlar patlatılmıştır. Bu protokole göre;

- Dopamin yüklü eksozom çözeltisi buharlaşması için 75°C'lik bir ısıtıcıya koyularak 15 dakika beklendi.
- Süre sonunda çözeltiye asetonitril (50:50) ekleyerek vortekslendi.
- Vortekslenen çözelti 10 dakika boyunca sonikasyon yapıldı.
- Daha sonra çözelti 10.000 g'de 10 dakika santrifüjlendi.
- Supernatant dikkatlice çekilerek 0.22 μ m filtreden geçirildi.
- Tüm analitler bir C18 kolonu ile 30 °C'de 1 mL/dk akış hızında ve mobil faz (H₂O/Asetonitril) ile analiz edildi. 230 nm'de absorbans ölçümü yapıldı [175].

3.3.5.4 İlaç yükleme kapasitesi

Eksozomlara yüklenen dopamin miktarı, UV-Vis spektroskopisi kullanılarak niceleme yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemle, dopaminin eksozom içerisine yükleme inkübasyonun sonucunda ortamdan ultrasantrifüjle uzaklaştırılan süpernant kullanıldı. Süpernatandaki dopamin konsantrasyonu, dopamin için

standart bir kalibrasyon eğrisi aracılığıyla belirlenir. Bir dopamin stok çözeltisi hazırlandı ve 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ve 5.0 mg/mL konsantrasyonların alt solüsyon çözeltileri hazırlandı. Bu solüsyonların UV-Spektrofotometride 280 nm'de absorbans ölçerek standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Daha sonra alınan süpernatantın UV-Spektrofotometride 280 nm'de absorbans ölçüldü. Sonuçlar aşağıdaki formülü kullanarak dopamin için ilaç yükleme kapasitesini hesaplandı [225].

$$\text{İlaç Yükleme Kapasitesi (\%)} = \frac{A(\text{Toplam}) - A(\text{Süpernant})}{A(\text{Toplam})} \times 100$$

3.3.5.4 *In-vitro* İlaç Salım Kinetiği

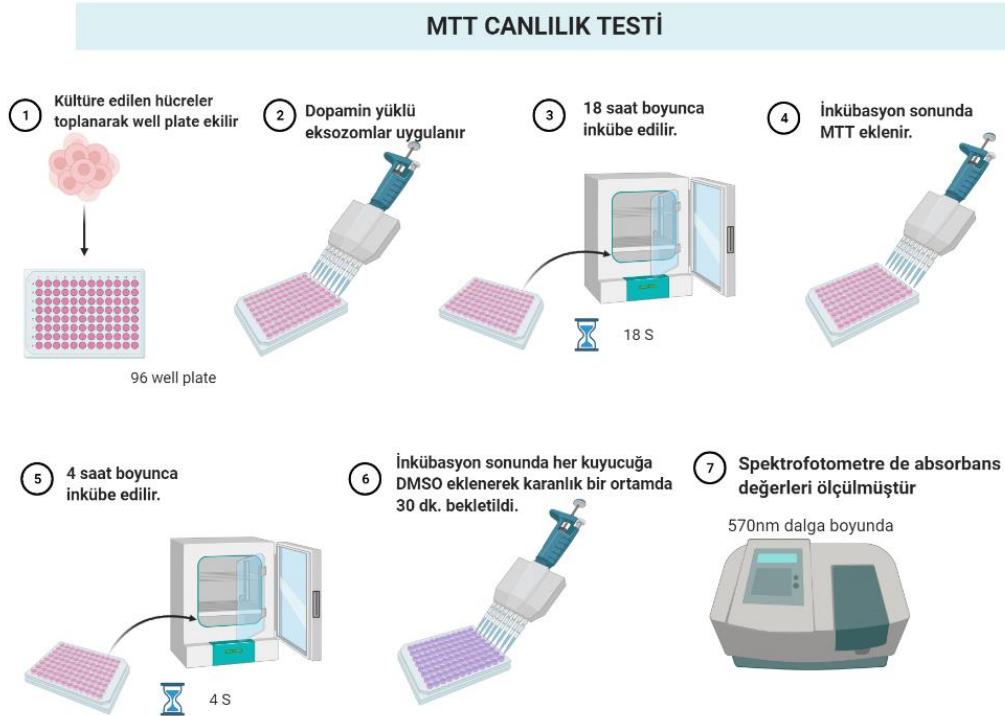
Dopamin yüklü eksozomların ilaç salma kinetiği, diyaliz membran zarı kullanılarak gerçekleştirildi. pH 7.4'teki PBS, salım ortamı olarak normal fizyolojik değerleri simüle etmek için kullanılır. In vitro ilaç salım kinetiğinin belirlenmesi için bir kalibrasyon eğrisi hazırlanır. Dopamin solüsyonu 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ve 5.0 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanır. Her konsantrasyonun UV absorbans değeri, bir UV-Vis spektrofotometre ile 280 nm'de belirlenir. Bu protokol de;

- 1 mL dopamine yüklü eksozom formülasyonu diyaliz zarına yerleştirildi. Daha sonra içinde 15 mL PBS bulunan beher içine yerleştirildi.
- Beherin ağzı parafilm ile kapatıldı ve inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon boyunca 0,5, 1, 2, 4, 6, 8. saatte bir beher içinde 1 mL ortamı numunesi alındı ve alınan ortam kadar taze PBS eklendi.
- Belirli aralıklarla alınan numuneler 280 nm'de UV – Vis spektrometresi kullanılarak absorbans değerleri ölçüldü.
- Aşağıdaki formülü kullanarak sonuçları hesaplandı [226].

$$\text{Salım (\%)} = \frac{\text{Serbest kalan dopamin miktarı}}{\text{Toplam dopamin}} \times 100$$

3.3.6 Dopamin Yüklü Eksozomlar ve Eksozomların *in vitro* Sitotoksik Etkisinin Hücre Canlılık Testi ile Belirlenmesi

Eksozom ve dopamin yüklü eksozomların Fibroblast hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisi MTT canlılık testleri ile belirlenmiştir. ATCC-Fibroblast hücreleri İstinye Üniversitesi'nin Doku Mühendisliği laboratuvarında -80°C bulunan hücrelerin canlandırılarak kültüre edildi. Hücreler 37°C 'de hızlıca çözündürüldü. Çözündürülen hücreler, içerisinde %10 Fetal Bovine serum, L-Glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum piruvat ve sodyum bikarbonat bulunan DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde 37°C 'de, %5 CO_2 içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Besiyeri iki günde bir değiştirildi. Flaks yüzeyi %80 yoğunluğa ulaştığında hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak 96 kuyucuklu plakaya ekildi. 96 kuyucuklu plakaya ekimi yapılan Fibroblast hücreleri 37°C 'de, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı [223, 224]. $100\mu\text{L}$, $250\mu\text{L}$, $500\mu\text{L}$ ve $1000\mu\text{L}$ konsantrasyonlarda izole dopamin yüklü eksozom formülasyonu uygulandı. Ayrıca yine her bir kuyucuğa $10\mu\text{L}$, $25\mu\text{L}$, $50\mu\text{L}$ ve $100\mu\text{L}$ miktarlarda eksozomlar eklenerek sitotoksik aktivitesi araştırıldı. Uygulamalardan sonra -37°C 'de %5 CO_2 içeren bir inkübatörde 18 saat inkübe edildi.



Şekil 3.5 MTT yöntemi (Biorender.com'da çizildi)

3.3.6.1 MTT Hücre Canlılık Testi

18 saatlik inkübasyon sonunda hücreler 96 kuyucuklu plaklara besiyerinin 1/10'u kadar MTT (3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ilave edilerek 4 saat süreyle CO₂'li inkübatörde inkübasyona devam edilmiştir. Uygulama süresinin sonunda kuyucuklara besiyeri kadar DMSO ilave edilmiş ve kristallerin çözünmesi için 30 dakika süreyle oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi. Süre sonunda oluşan kristallerin tamamen çözünmesi için pipetaj yapıldı ve Spectopstar Nane-ELISA reader da 570 nm'de absorban değerleri ölçüldü [222].

Eksozom ve Dopamin yüklü eksozomların Fibroblast hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisi elde edilen absorbans değerleri ile hesaplanmıştır.

3.4 3B kültür Ortamının Hazırlanması ve Parkinson Modelin Oluşturulması

3.4.1 3B Kültür Ortamının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3B hücre kültürü, gerçek dokuya fonksiyonel olarak benzerliği nedeniyle, özellikle merkezi sinir sistemi çalışmalarında ön plana çıkmaya başlamıştır. 3B kültürlerde geliştirilen hastalık modellemelerinde 2B kültüre kıyasla daha kapsamlı veriler elde edilebilmektedir [227]. Esas olarak hücrelerin kendi hücre dışı matriks bileşenlerini oluşturduğu, çok hücreli agregatlardan oluşmaktadır. Bu yöntemde hücreler, biyoyazıcı kullanılarak basılır ve 3B kültür yapısı oluşturulmaktadır [228]. Özellikle merkezi sinir sisteminde 3B kültürlerde yapılan çalışmalar ve model oluşturma oldukça azdır.

Projenin bu kısmında HD Bioink firmasının ürünü olan ve ticari olarak satılan liyofilize-Aljinat-Jelatin (3:5) tozları, 3B kültür ortamının biyomürekkeplerin temeli olarak kullanıldı. Öncelikle bu aşamada kültür ortamının temeli oluşturacak bioink hazırlandı ve WJ-MKH hücreler ile birlikte ekimi yapılarak bioinklerin karakterizasyonu tamamlandı.

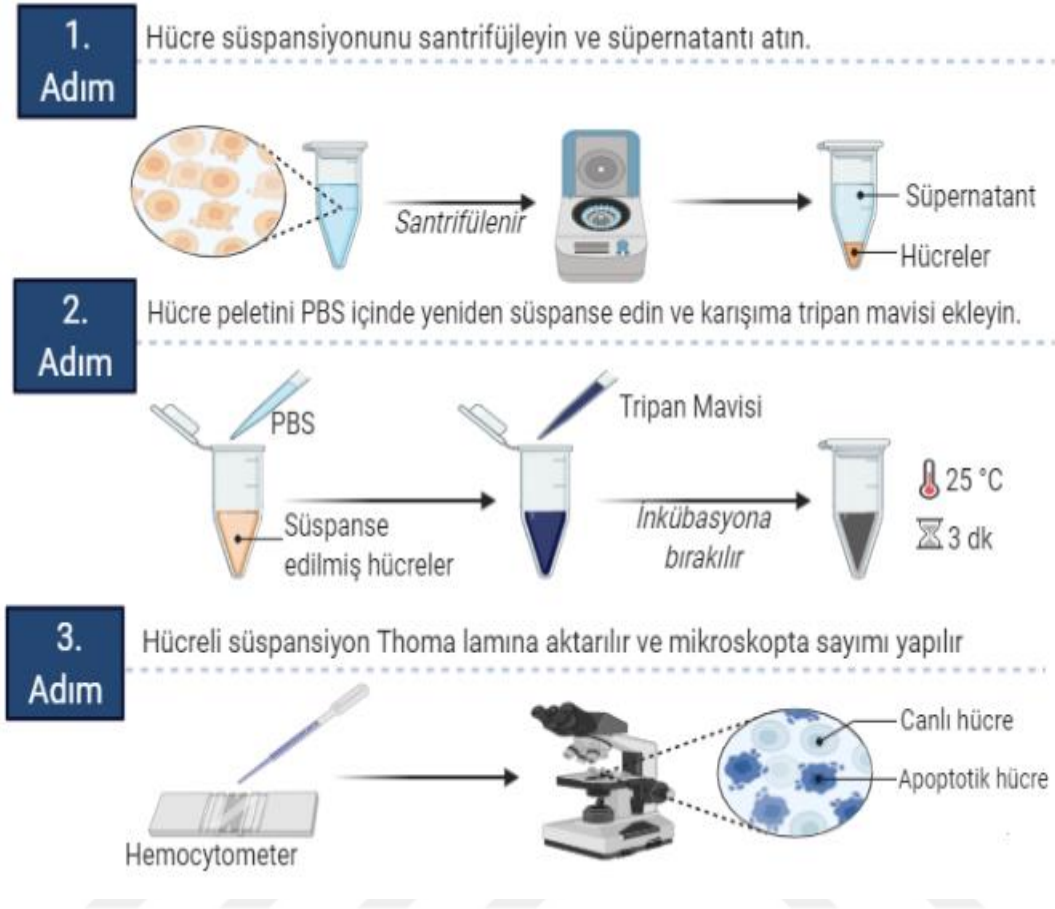
✓ **Bioink hazırlama protokolü;**

- Öncelikle 3:5 oranı sağlayabilmek adına 4.5 mg aljinat ve 1.5 mg jelatin hassas terazide tartılarak falkon tüplerine aktarıldı. Daha sonra üzerine %10 FBS içeren DMEMF-12 besiyeri ortamını ilave edildi.
- Elde edilen karışım pipetajlama ve yavaş yavaş iyice karıştırıldı. Tamamen karışan baseink temeli sterilizasyon amacıyla otoklavda 121°C'de 1,5 atm basınç altında 20 dakika otoklavlandı.
- Otoklav sonrası meydana gelen kabarcıkları gidermek için oda sıcaklığından 2 dakika boyunca 280xg'de santrifüjlendi. Elden edilen baseink hücreler hazırlanana kadar 37 °C'de saklandı.

✓ **WJ-MKH'ların eklenmesi ve 3B biyoyazıcı ile basımı**

- Daha önceki kısımlarda da bahsedildiği gibi kültüre edilen MJ-MKH'lar, besi ortamı uzaklaştırılarak PBS ile 2 kez yıkandı. Yıkama sonra hücreler flask yüzeyinden uzaklaştırmak amacıyla tripsin eklendi ve 37 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası flaska %10 FBS ile 10 mL DMEM-F12 ortamı eklenerek süspanse karışım santrifüj tüpüne aktarıldı. 101xg'de 5 dakika boyunca santrijlendi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.
- Daha sonra pellet üzerine 1 mL taze besiyeri eklendi. Canlı hücre sayımı yapmak için 48 µL ortama, 2 µL hücre süspansiyonu ve 50 µL tripan mavisi (0,4 g tripan mavisi/100 mL) ependrof tüplerine aktarıldı ve sonra pipetajlandı.
- Hazırlanan hücreli süspansiyon Thoma hücre sayma lamına aktarıldı ve ışık mikroskobunun her iki yanındaki karelere düşen ortalama hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Şekil 3.6) [2].

$$\text{Canlılık yüzdesi (\%)} = \frac{\text{sayılan canlı hücreler}}{\text{ayılan toplam hücreler}} \times 100$$



Şekil 3.6 Tripan Mavisi boyama prosedürü (Biorender.com’da çizildi)

- Thoma lamı ile sayımı tamamlanan hücreler 0,5 mL ortam içerisinde yaklaşık 1×10^7 olacak şekilde hesaplandı. 0,5 ml alınan ortam üzerine hacim 5 mL tamamlamak için 4,5 mL hazırlanan bioinkten ilave edildi. Tüm bu basamaklar kabin içerisinde steril ortam da yapılırken oluşturulan hücre+ bioink karışımı şırınga yardımıyla kartuşlara aktarıldı.
- Biyoyazıcıyı iki koaksiyel yazıcı kafası ve pnömatik tahrikli ekstrüzyon teknolojisi ile kullanıldı. Mikro adım başına X/Y/Z çözünürlüğünü 1,25 μm 'ye, ekstrüzyon genişliğini 400 μm 'ye ve ekstrüzyon yüksekliğini 200 μm 'ye ayarlandı. 20 mm x 20 mm x 5 mm ızgara, 3B biyobaskı çalışmaları için en çok kullanılan 3B modellerden biridir.
- Cihazı çalıştırmadan ilk sterilizasyonu için önce %70 etanol ile silindi ve daha sonra UV sterilizasyonu ile sterilizasyonu tamamlandı. 3B yazıcının

ortalama basıncını 7,5 psi'ye ve kartuş ve yatak sıcaklığını 37 °C'ye ayarlandı. Hızı %60 olarak ayarlandı ve standart bir 3B baskı işlemi gerçekleştirildi.

- Biyomürekkeplere yazdırdıktan sonra elde edilen materyel üzerine 0,1 N CaCl_2 solüsyonu püskürtüldü. Yaklaşık 10–20 s beklendi ve daha sonra Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren PBS ile yıkandı.
- Elde edilen Hücre+Bionik gruplarının bulunduğu her bir kuyucuğa %10 FBS ortamı ile 2 mL DMEMF-12 eklendi. Plakaları 37 °C'de %5 CO_2 ile inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, sferoid oluşumu için her gruba 1×10^6 hücre içeren 2 mL süspansiyon ortamı eklendi.
- ✓ Plakaları 37 °C'de %5 CO_2 ile 24 saat boyunca inkübasyonda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından ışık mikroskop sferoid oluşumunu gözlemlendi [229].

Üretilen 'Baseink™' Karakterizasyonu

Üretilen ve 3B biyoyazıcı aracılığıyla hidrojel desenlemesi yapılan malzemelerin karakterizasyon işleminde FTIR ve SEM görüntüleme teknikleri yapılmıştır. Her iki yöntem de Arel Üniversitesi POTKAM Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

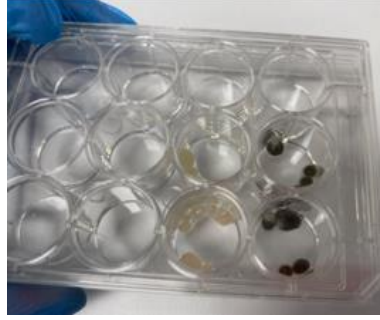
- **Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi**

Malzeme karakterizasyonunda sık tercih edilen “Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi” (FTIR), ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen matematiksel Fourier dönüşümüne dayalı kimyasal analitik bir yöntemdir. Bu yöntem ile katı, sıvı ve gaz formlarında organik bileşiklerin içerdiği fonksiyonel grupların belirlenmesi, iki farklı grubunun moleküler bağ karakterizasyonu, bağlanma yapılarının karşılaştırılmasına olanak sağlar [230].

- **Taramalı Elektron Mikroskobu- Scanning Electron Microscope (SEM) Analizi**

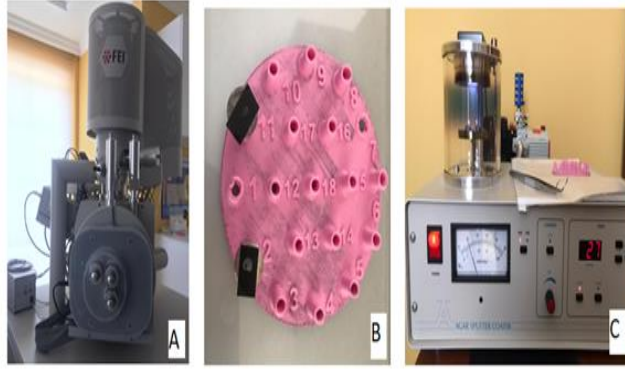
Kalan bioinklerin içerisine yaklaşık 3 milyon WJ- MKH eklenerek karıştırılmış ve yaklaşık 1 saat kadar 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pipet ucu damlatma yöntemi ile önce CaCl_2 çapraz bağlayıcı içerisine daha sonra oradan dikkatlice alınarak PBS içeren 6'lık plakalardaki kuyucuklara aktarıldı. Ayrıca

tuzlardan arındırılmak için yıkanmış, sonrasında damlacıklar dikkatli bir şekilde pens yardımıyla %5'lik paraformaldehit içeren ependorf tüplere alındı.



Şekil 3.7 Bioinklerin damlatma yöntemi ile aktarımı

Ependorflara alınan damla bioinklerden bistüri yardımı ile ince kesitler alınarak Au kaplama yapılarak FEI QUANTA 450 FEG ESEM marka SEM cihazında hem yüzeyden hem de hidrojel desenlemenin iç kısmından görüntüler alındı. SEM analizi ile elde ettiğimiz bioinklerimizin yüzeysel morfolojisini, iç yapısını, hücre dağılımları ve bioink-hücre etkileşimleri farklı μm boyutlarda incelendi. [231].



Şekil 3.8 SEM görüntüleme ve hazırlık aşaması. A. SEM cihazı B. Bioink kesitleri kaplama öncesi hazırlık. C. Kaplama cihazı

3.4.2 Dopaminerjik Nöroblastoma Hücre Hattının (SH-SY5Y) Kültüre Edilmesi ve 3B Kültür Ortamının Hazırlanması

Çalışmanın bu basamağında; 3B kültür ortamı için Nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) kullanılmıştır. SH-SY5Y hücre hattı Gebze Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden Prof. Dr. Işıl KURNAZ (AxanLab) tarafından verilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, dopaminerjik nöronların birçok özelliğine sahip olduğundan,

SH-SY5Y hücre hattı, son zamanlarda PH hastalığının araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır [232].

3 boyutlu kültür için öncelikle, SH-SY5Y hücre hattı kültüre edildi. SH-SY5Y hücreleri %10 Fetal Bovine serum, L-Glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum piruvat ve sodyum bikarbonat bulunan DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Besiyeri iki günde bir değiştirildi. Hücreler yeterli yoğunluğu ulaşıncaya kadar kültüre edilmeye devam edilmiştir. Kültüre edilen SH-SY5Y hücre hattı, besiyerini uzaklaştırılarak 5 mL PBS ile 2 kez yıkandı. Yıkama sonra flaska 5 mL %0.25 tripsin ve 2.21 mM EDTA 4Na eklenerek 37 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası flaska %10 FBS ile 10 mL DMEM-F12 ortamı eklenerek süspanse karışım santrifüj tüpüne aktarıldı. 101xg'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Geri kalan pellet üzerine 1 mL taze besiyeri eklendi [223, 224].

Aljinat-Jelatin (3:5) tozları, yukarıda bahsedildiği gibi 3B kültür ortamının biyomürekkeplerin temeli olarak kullanıldı ve hazırlandı. Hücre içeren bioink gruplarının her birinin üzerine %10 FBS ortamı ile 2 mL DMEM F-12 medyum ortamı eklendi. Plakaları 37 °C'de %5 CO₂ ile inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, sferoid oluşumu için her gruba 1 x 10⁶ hücre içeren 2 mL süspanسیون ortamı eklendi. Plakaları 37 °C'de %5 CO₂ ile 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından ışık mikroskobu ile sferoid oluşumunu gözlemlendi.

3.4.3 2B ve 3B Kültür Ortamında *In vitro* Parkinson Modelinin Oluşturulması Dopamin Yüklü Eksozomlar ve Eksozomların Terapötik Etkinliğinin Araştırılması

Alzheimer'dan sonra çok görülen nörodejeneratif hastalıklardan birisi olan PH'nın gerek mekanizmasını gerekse yeni tedavi yollarını araştırılmasına yönelik çalışmalar halen daha devam etmektedir. In vitro koşullarda hastalık modellerinin geliştirilmesi ve bu alanda yapılan çalışmalar in vivo koşullara göre daha düşük maliyetli olması, daha hızlı sonuç alabilme imkanı olması, etik onaya ihtiyaç duyulmaz gibi pek çok avantajlı bulunmaktadır [233]. Günümüzde in vitro koşullar 2B ve 3B kültür ortamlarında hastalık modellerini geliştirilerek çalışmalar

yapılmaktadır. 2B ve 3B kültür ortamlarının bir takım avantaj ve dezavantajları bilinmektedir. Ancak 3B kültür ortamı daha canlı dokuyu en yakın özelliği sergilediğinden hastalık model geliştirilmesinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır [234].

In vitro koşullarda PH hastalık modelini geliştirmek üzere birkaç farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler 2'ye ayrılabilir. İlki toksik modelleme ikinci ise genetik modellemedir [235]. Toksik modelleme de kısa süre de lezyon oluşturabilme özelliğine sahip 6-OHDA sıklıkla tercih edilen bir nörotoksindir [236].

Çalışmanın bu basamağında; PH modeli SH-SY5Y hücre hattıyla 2B ve 3B kültür ortamından 6-OHDA kullanılarak yapılmıştır.

3.4.3.1 2B Kültür Ortamında Parkinson Modelinin Oluşturulması Dopamin Yüklü Eksozomlar ve Eksozomların Terapötik Etkinliğinin Araştırılması

2B kültür ortamında PH modelinin oluşturulması, İstinye Üniversitesi, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda yapıldı. SH-SY5Y nöronal hücre hattı Hücrelerin çoğaltılması, in vitro koşullarda hücre kültürü tekniklerine uygun şekilde, 37 °C' de, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda kültüre edilmiştir. Flaks yüzeyi %80 yoğunluğa ulaştığında hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak 6 kuyucuklu plakaya ekildi. 6 kuyucuklu plakaya ekimi yapılan SH-SY5Y hücreleri 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µM hazırlanan 6-OHDA solüsyonu eklendi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 24 saatin ardından eksozom ve dopamin yüklü eksozomları MTT test ile belirlenen 500 µg/mL konsantrasyonundaki dozu, uygulanmış ve 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri başlatılmıştır [223, 224]. . Ancak SH-SY5Y hücre hattı 6-OHDA karşı zamana bağlı olarak direnç kazandığından, 72 saatlik uygulama grubuna, 6-OHDA uygulamasının 48. Saatinde ek bir 100 µM 6-OHDA daha kuyucuklara eklendi. Tüm deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır.

Deney grupları şu şekildedir;

- **Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
- **Negatif Kontrol:** 6-OHDA +DMSO uygulanmış

- **6-OHDA Grubu:** Sadece 6-OHDA uygulanmış grup
- **Exo-DA:** 6-OHDA+ Exo-DA uygulanmış grup
- **Exo:** Sadece Eksozom uygulanmış grup

3.4.3.2 3B Kültür Ortamında Parkinson Modelinin Oluşturulması ve Dopamin Yüklü Eksozomlar ve Eksozomların Terapötik Etkinliğinin Araştırılması

Bioink içerisinde hazırlanan SH-SY5Y hücre hattı sferoid yapısı oluşuncaya kadar inkübe edilmiştir. Her iki günde 1 besiyeri değiştirilmiştir. Sferoid yapısı oluştuğu görülen hücrelere uygulamalar yapılmaya başlanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 200 μ M hazırlanan 6-OHDA solüsyonu eklendi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı [237]. 24 saatin ardından eksozom ve dopamin yüklü eksozomları MTT test ile belirlenen 500 μ /mL konsantrasyonundaki dozu, uygulanmış ve 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri başlatıldı. Ancak SH-SY5Y hücre hattı 6-OHDA karşı zamana bağlı olarak direnç kazandığından, 72 saatlik uygulama grubuna, 6-OHDA uygulamasının 48. Saatinde ek bir 200 μ M 6-OHDA daha kuyucuklara eklendi. Tüm deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır.

Deney grupları şu şekildedir;

- **Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
- **Negatif Kontrol:** 6-OHDA + DMSO uygulanmış
- **6-OHDA Grubu:** Sadece 6-OHDA uygulanmış grup
- **Exo-DA:** 6-OHDA+ Exo-DA uygulanmış grup
- **Exo:** Sadece Eksozom uygulanmış grup

Uygulamalar sonrasında 2B ve 3B kültür ortamında Parkinson modeli terapötik etkinliğin incelenmesi için Canlı&Ölü Testi ile incelenirken, bu testten elde edilen görüntüleri görüntü analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda terapötik etkinlik immün boyama yapılarak terapötik etki araştırıldı.

3.4.3.3 Canlı&Ölü Testi

Canlı&Ölü canlılık/sitotoksosite kiti (Live and Dead Cell Assay (ab115347) kullanılarak gerçekleştirilen yapılan uygulamalarda hem model oluşturma hemde formülasyonların etkinlikleri araştırılmıştır.

Tüm uygulamalar sonunda tüm kuyucuklardaki besiyerleri dikkatlice uzaklaştırıldı. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yakandı, ardından, 2 μ M Calsein AM ve 4 μ M EthD-1 içeren Canlı&Ölü test solüsyonun eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra da ise yine Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanarak, Floresans mikroskop mikroskopta (Zeiss, Almanya) altında mikroskopik gözlem yapıldı [238].

3.4.3.4 Görüntü Analizi

Mikroskop tekniklerinin ilerlemesi ve elde edilen görüntüleme verileri daha iyi analiz etme ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Özellikle bilgisayar tarafından nicelleştirmeye uygun bir temsile göre tanımlanmalıdır. Bir görüntüyü çoklu homojen bölgelere veya parçalara bölerek segmentasyon yolu ile yapılabilmektedir. Segmentasyon, görüntü analizi boru hattında, yoğunluk değerlerini bölge etiketleriyle değiştirerek büyük bir geçiş oluşturur. Bu yüzden bilgisayar destekli Eğitilebilir Weka Segmentasyonu-Trainable Weka Segmentation, program görüntüleme analizlerinde son zamanlarda kullanılan bir programdır [239]. Burada Canlı&Ölü testinden elde edilen görüntülerinin görüntü analizler yapıldı.

3.4.3.5 İmmün Boyama Yöntemi

Nöron hücrelerinde spesifik olarak ekprese edilen bazı mikrotübül elemanları bulunur. Beta-Tubulin (β -tubulin) olgun nöronlarda akson kısmında yer alan mikrotübüllerden birisidir [240,241]. β -tubulin aksonda implus iletiminde önemli rola sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda özellikle ailesel PH'nın β -tubulin doğrudan ilişkili olduğunu görülmüştür. PH'ında genetik kökenli etkileri ile β -tubulin yapısının bozulmasına, akson yapının zarar görmesi, implus iletiminin yavaşması veya durması zamanla da mikrotübül dinamiklerinde azalma ve kümülatif işlev bozukluklarının gelişmesi ile sonuçlandığı görülmüştür [242].

Çalışmanın bu kısmında, SH-SY5Y hücre hattı 3B kültür ortamında sferoid yapısı oluşuncaya kadar 2B kültür ortamında ise flask yüzeyini kaplayana kadar inkübe edildi. Her iki günde 1 besiyeri değiştirildi. 3 B kültür ortamı için bir kuyucuğa 200 μ M, 2B kültür ortamı için bir kuyucuğa 100 μ M 6-OHDA solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda aşağıda belirlenen deney gruplarına göre uygulamalar yapıldı. Deney grupları uygulamaları sonunda 72 saat inkübe edildi. Ancak SH-SY5Y hücre hattı 6-OHDA karşı zamana bağlı olarak direnç kazandığından, 6-OHDA uygulamasının 48. Saatinde ek bir 6-OHDA daha kuyucuklara eklendi. Tüm deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır.

Deney grupları şu şekildedir;

- **Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
- **6-OHDA:** 6-OHDA uygulanmış grup
- **Exo-DA:** 6-OHDA+ Exo-DA uygulanmış grup
- **Exo:** Eksozom uygulanmış grup

72 saatlik uygulama sonunda, PH patogenezinde etkinliği bilinen β -tubulin belirteçlerinin ifadelerinin analiz edilmesi amacıyla bu belirteçlere spesifik antikorlar kullanılarak immün boyama yapıldı.

Uygulamalar sonrasında 2B ve 3B kültür ortamlarının besi ortamı dikkatlice uzaklaştırıldı ve immün boyama için ortamlar PBS ile yavaşça yıkandı. Yıkama sonunda her bir kuyucuğa %4 paraformaldehit eklenerek 2 saat boyunca hücreler fikse edildi. Daha sonra 3 kez PBS ile yavaşça yıkandı. Her bir kuyucuğa %2 BSA ve %0.1 TritonX eklendi ve 30 dakika beklendi. Ardından 3 kez PBS ile yavaşça yıkandı. Yıkama işleminin ardından primer antikor olan β -III tubulin (fare) antikor seyreltici reaktif çözeltisi ile 1:200 oranında seyreltilerek her bir kuyucuğa 200 μ L antikor çözeltisi eklendi. Daha sonra gece boyunca 4 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda oda sıcaklığında PBS ile 3 kez tekrar yıkandı. Ardından 1:200 oranında seyreltilmiş anti-fare IgG-FITC-tavşan sekonder antikor eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikorda yavaşça 3 kez PBS ile yıkandı. Yıkama sonunda ise; DAPI solüsyonunu (1:1) her bir kuyucuğa

damlatılarak 15-20 dk beklendi. İmmüno Floresan görüntüleme gerçekleştirildi [229].

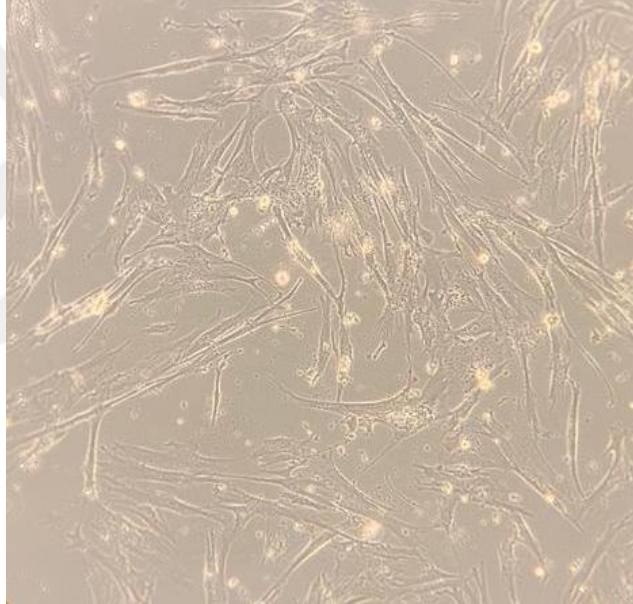
3.5 İstatistikî Analiz

Denemelerden elde edilecek verilerin ortalama değeri $\pm$ SD olarak verilecektir. Kontroller ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar ile sonuçların istatistikî önemi, SPSS 22 istatistik paket programında One Way ANOVA varyans analizi yapılarak değerlendirildi ($p<0,05$).



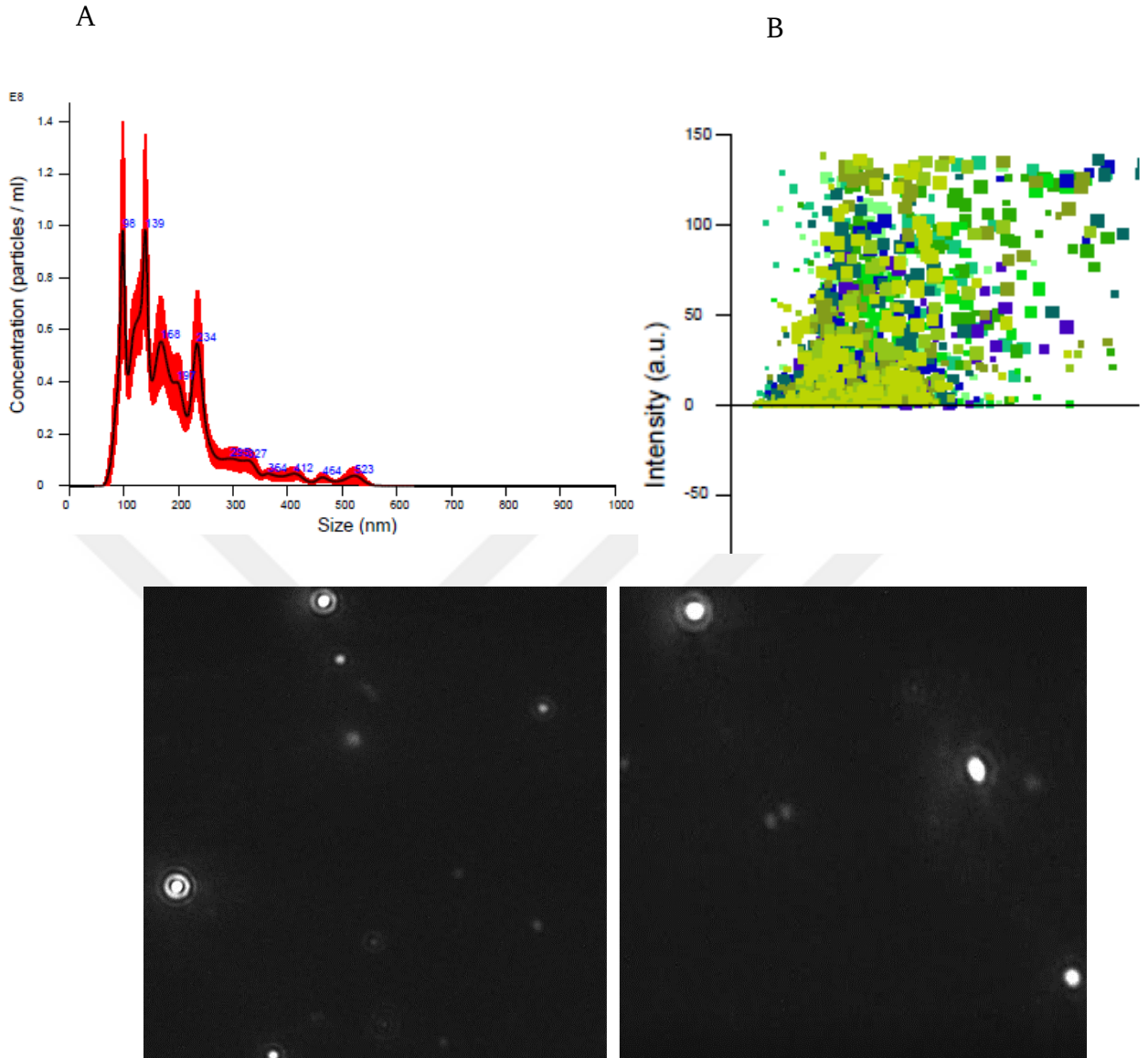
4.1 WJ-MKH'leri Kökenli Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu

WJ-MKH'leri kültüre edilmiştir (Şekil 4.1) ve kültür yeterli yoğunluğa ulaştığında 48 saat serumsuz besi ortamında inkübe edildi. İnkübasyonun bitiminden sonra süpernatant -20°C'de saklandı. Toplanan süpernatantlardan eksozom izolasyonu ultrasantrifüjleme ile yapıldı.

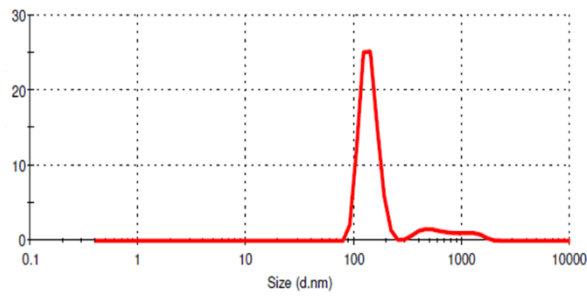


Şekil 4.1 Wharton jeli hücrelerinin mikroskop görüntüsü (10X)

Ultrasantrifüj sonunda elde edilen solüsyon 0.22 μm filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Daha sonra PBS ile dilute edilerek NTA ve DLS analizleri yapılmıştır. Her iki analizde de elde edilen nanopartiküllerin 40-200 nm arasında olduğu tespit edilmiştir. Çalışma periyodu sırasında toplanan süpernatant yaklaşık 180 mL idi. Santrifüjlemelerin sonunda bu miktardan yaklaşık 1×10^9 konsantrasyonda nanopartiküller elde edilmiştir. NTA sonuçlarına göre elde edilen çözeltinin partikül boyutunun 98 nm olduğu bulundu. NTA ve DLS analizlerinde ortaya çıkan nanoparçacık sayısı birbiriyle tutarlıydı. Ayrıca WJ-MKHs kökenli eksozomların Zeta potansiyeli -15,7 mV olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.2 WJ-MKH kökenli eksozomların NTA analizi A. Elde edilen eksozomların Boyutu B. Elde edilen eksozomların konsantrasyonu

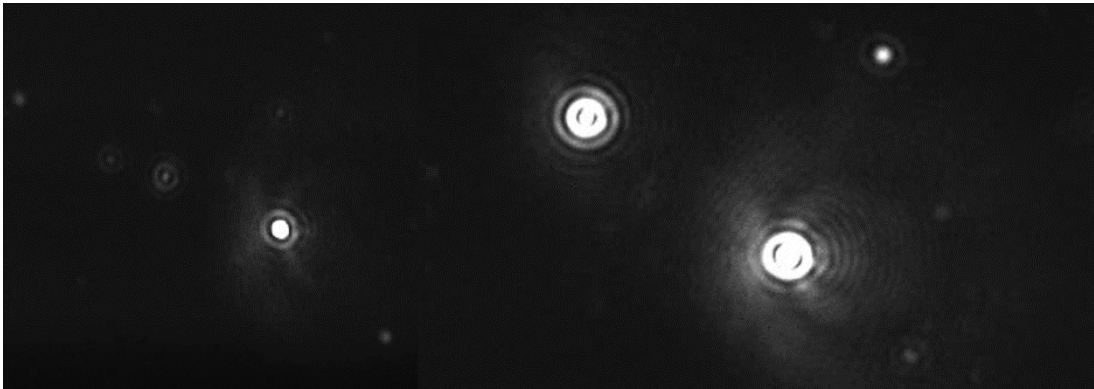
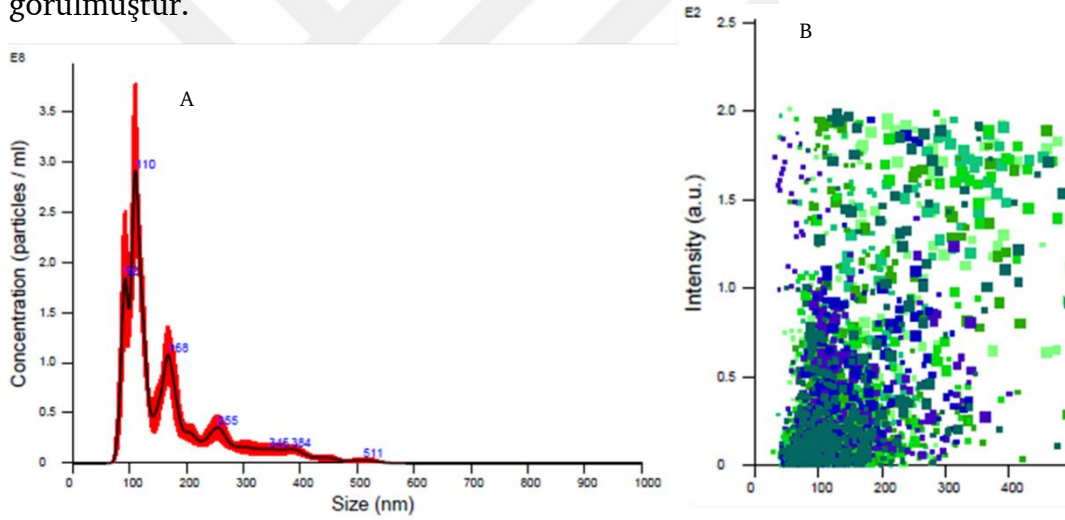


Zeta Potential: $-15.7 \text{ mV} \pm 1.1$

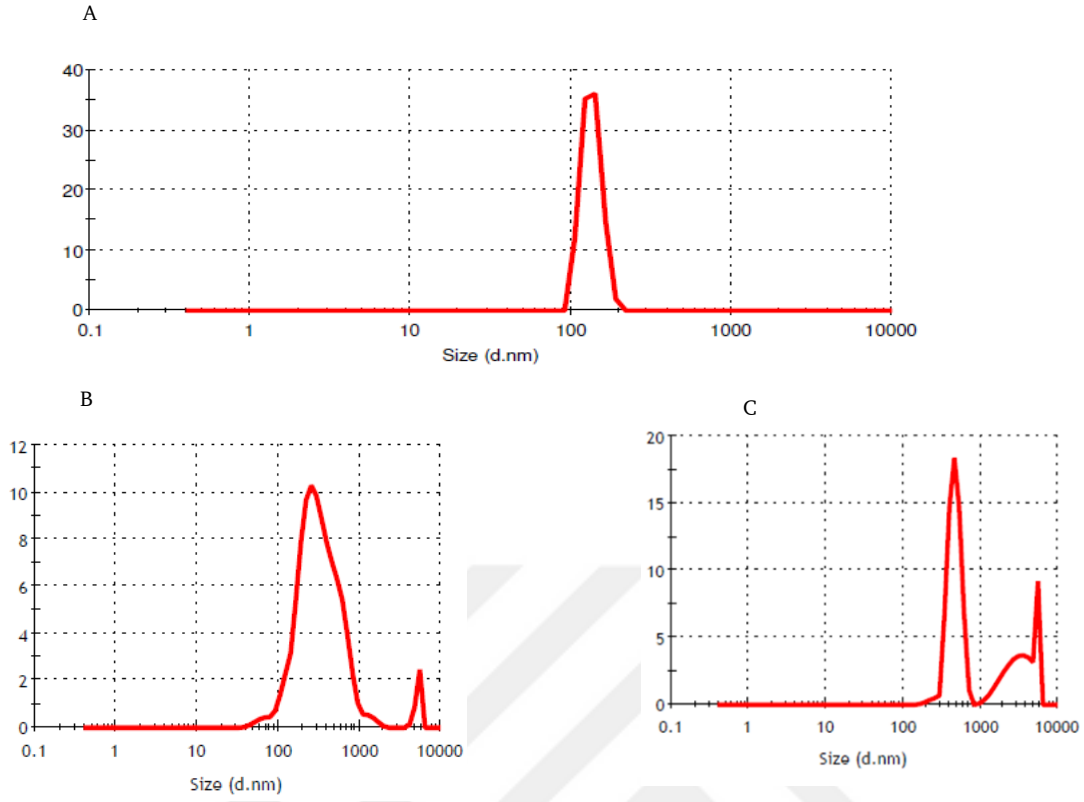
Şekil 4.3 WJ-MKH kökenli eksozomların DLS analizi

4.2 Dopamin Yüklü Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Hazırlanan dopamin çözeltisi ile toplam çözeltinin %0,002'si kadar saponin eklenmesi ile inkübasyona bırakılan eksozomlar 24 saat sonundan tekrar ultrasantrifüjlenmiştir. Ultrasantrifüj ile ortamdaki serbest dopamin uzaklaştırılmış ve daha sonra pelete PBS eklenmiştir. Ultrasantrifüj sonrasında formülasyon 0,22 μm filtreden geçirelerek steril edilmiştir. Daha sonra PBS ile dilute edilerek NTA ve Zetasizer analizleri yapılmıştır. Her iki analizde de elde edilen nanoparçacıkların 40-200 nm arasında olduğu tespit edilmiştir. Eksozom ile dopamine yüklü eksozom NTA sonuçları karşılaştırıldığında yeni çözeltideki nanoparçacıkların ilk NTA'ya göre daha büyük olduğu tespit edilmiştir. WJ-MKHs kökenli eksozomların NTA sonucundan boyutunun yaklaşık 98 nm olduğu görülürken, dopamine yüklü eksozomlarında bu boyutun 110 nm'ye çıktığı görülmüştür.



Şekil 4.4 Dopamin yüklü eksozomların NTA analizi A. Elde edilen eksozomların Boyutu B. Elde edilen eksozomların konsantrasyonu



Şekil 4.5 DLS analizi A. Dopamin yüklü eksozomlar, B. Saponin C.

Tablo 4.2 Zeta potansiyelleri

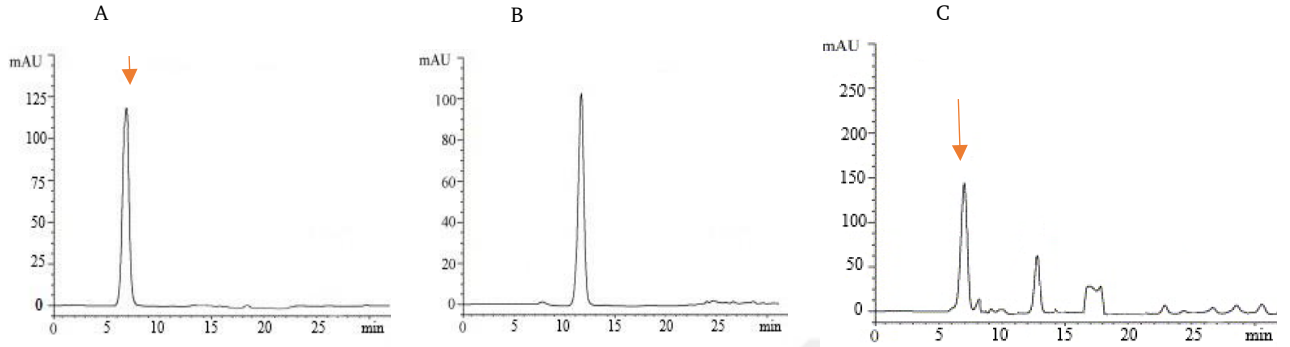
Örnek	Zeta Potansiyeli
Eksozom	-15.7 mV $\pm$ 1.1
Saponin	-12 mV $\pm$ 0.7
Dopamin	-14.4 mV $\pm$ 1.3
Dopamin- yüklü Eksozom	-17.6 mV $\pm$ 0.8

NTA ve DLS analizlerinde ortaya çıkan nanoparçacık sayısı birbiriyile tutarlıydı. Zeta potansiyeli formülasyonun kararlılık düzeyini ifade etmektedir. Burada dopamine yüklü eksozomların -17,6 mV $\pm$ 0.8 sonucunun ise nispeten kararlı bir formülasyon olduğu görülmüştür.

4.2.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

NTA ve Zetasizer analizleri elde edilen ilk solüsyona göre boyut ve stabilite açısından farklı sonuçlar gösterse de solüsyonda dopamin varlığı HPLC analizi ile belirlendi. Dopamin yüklü eksozomlar ultrasantrifüjlendi ve inkübasyonun sonunda çözelti içindeki serbest dopamini çıkarmak için süzüldü. İnkübasyon

sonunda eksozomlara dopamin yüklenmesi başarılı olursa, nihai solüsyondaki eksozomlar parçalanarak doğrudan ölçüm ile tespit edilebilir. Bunun için önce dopamin yüklü eksozom solüsyonu buharda ısıtılmış, ardından asetonitril eklenerek vorteks ve sonikasyon kullanılmıştır. Absorbans 230 nm'de ölçüldü.



Şekil 4.6 Formülasyonda dopamin varlığı HPLC analizi ile belirlendi. Tüm analizler, 30 °C'de 1 mL/dakika akış hızında H₂O:asetonitril mobil fazına sahip bir C-18 sütunu kullanılarak yapıldı. Dopaminin elüsyonunu izlemek için 230 nm'de absorbans ölçüldü. A. Dopamin, B. Saponin, C. Dopamin Yüklü Eksozom.

HPLC analizi sonucunda dopamin için ortaya çıkan pik 6.45 dakikada gözlemlendi. Çıkan sonuçlara göre formülasyonun içinde saponin varlığı da tespit edildi.

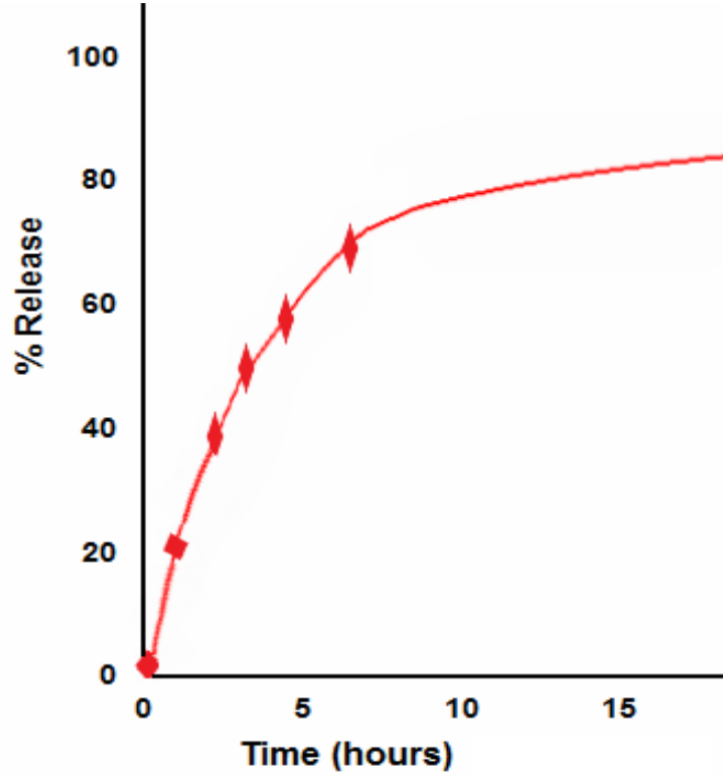
4.2.2 İlaç Yükleme Kapasitesi

İlaç yükleme kapasitesinin değerlendirilmesi için yukarıdaki protokoldeki adımlar takip edildi. Dopamin yükleme kapasitesi, UV spektrofotometri ölçümleri ve ilgili denklem kullanılarak hesaplandı. Tüm denemeler 3 kez gerçekleştirildi. Yükleme kapasitesi yüzdesi $10,89 \pm 0,33$ olarak bulundu.

4.2.3 İn Vitro İlaç Salım Kinetiği

In vitro ilaç salım da; dopamin yüklü eksozomların diyaliz membran ortama dopamin salımın kinetiği diyaliz membran yardımıyla yapılmıştır. Diyaliz membrana yerleştirilen dopamin yüklü eksozomlar, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8. saatte bir beher içinde 1 mL ortamı absorbans değerleri 280 nm'de ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarına göre kümülatif ilaç salım profili Şekil 5'te gösterilmiştir. İlaç salım kinetiği 8 saat boyunca izlenmiştir. Kapsüllenmiş dopaminin %74.8'inin ilk 8 saat

içinde eksozomlardan salındığı gözlenmiştir. Tüm denemeler 3 kez gerçekleştirildi.



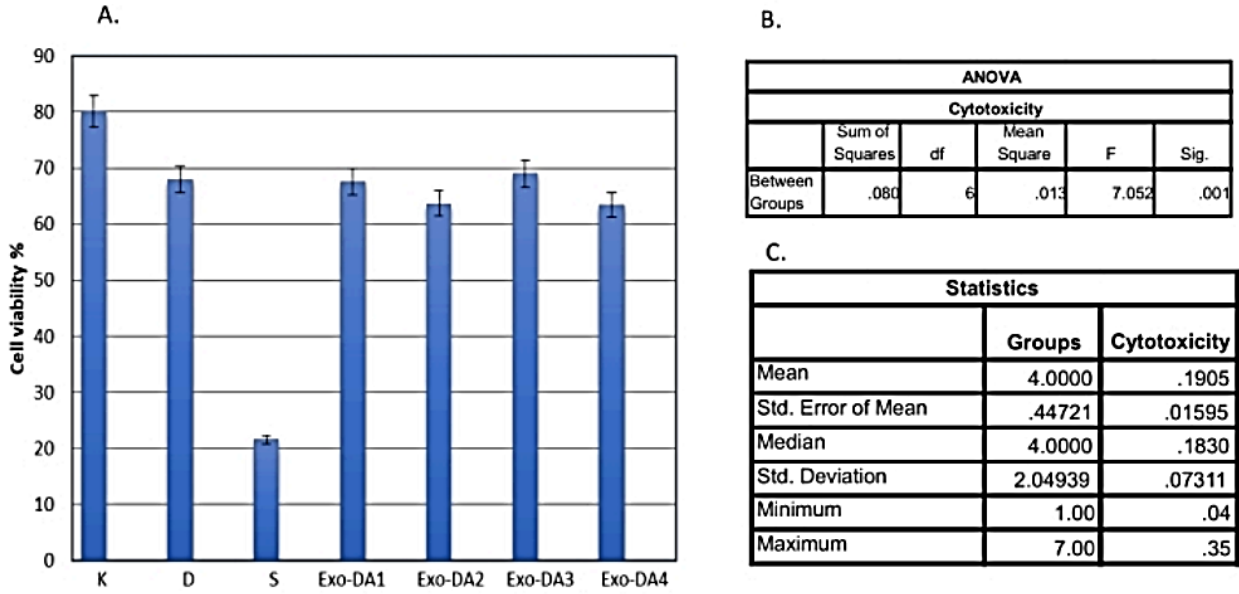
Şekil 4.7 Kümülatif Salım Kinetiği

4.3 Dopamin Yüklü Eksozomlar ve Eksozomların in vitro Sitotoksik Etkisinin Hücre Canlılık Testi ile Belirlenmesi

Dopamin yüklü ve serbest eksozomların sitotoksik aktiviteleri fibroblast hücreleri üzerinde araştırıldı. Farklı formülasyon konsantrasyonlarına (100 $\mu\text{l/mL}$, 250 $\mu\text{l/mL}$, 500 $\mu\text{l/mL}$ ve 1000 $\mu\text{l/mL}$) maruz bırakılan fibroblast hücreleri 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin canlılık oranları MTT testi ile belirlendi. Sonuçların istatistiksel önemi, SPSS 22 istatistik paket programında One Way ANOVA varyans analizi yapılarak değerlendirildi.

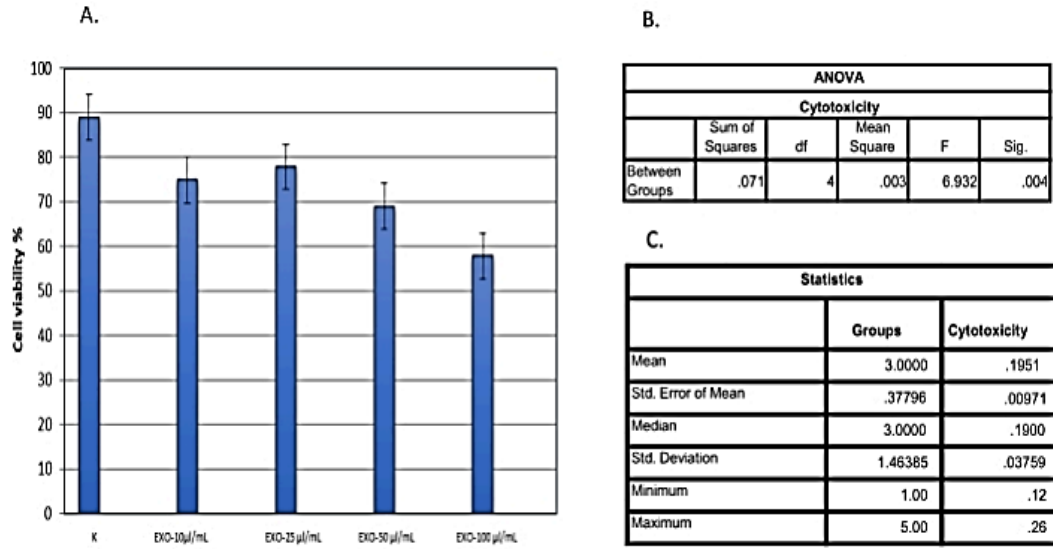
Tüm sonuçlar incelendiğinde dopamin yüklü eksozomların kayda değer bir sitotoksik etki göstermediği belirlendi. Ancak kapsüllenmiş dopamin miktarını artırmak için formülasyona eklenen saponin, fibroblastların canlılık oranlarını azalttı ($p < 0.05$). Hücreler, 500 $\mu\text{l/mL}$ konsantrasyona kadar dopamin yüklü

eksozomlarla tedavi edildiğinde canlılık oranlarında artış olduğu gözlemlendi. Formülasyonların uygulanmasından sonra fotoğrafı çekilen hücrelerde gözle görülür bir hücre ölümü olmadığı belirlendi. Hücre ölümü, saponin uygulanan kuyularda daha yaygın olarak görüntülendi.



Şekil 4.8 Elde edilen formülasyonun sitotoksikite testi; 18 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerde MTT canlılık testi sonuçlarının istatistiksel analizi dopamin, saponin ve dopamin yüklü eksozomlar. (A) Sitotoksikite sonuçları, (B,C) İstatistiksel analizler. Kısaltmalar: D = Dopamin; S = Saponin; Exo-DA1 = Dopamin yüklü eksozomlar 100 μ L/mL; Exo-DA2 = Dopamin yüklü eksozomlar 250 μ L/mL; Exo-DA 3 Dopamin yüklü eksozomlar 500 μ L/mL; Exo-DA 4 = Dopamin yüklü eksozomlar 1.000 μ L/mL; MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

Ek olarak, serbest eksozomların sitotoksik etkileri de benzer konsantrasyonlarda fibroblast hücreleri üzerinde araştırıldı. Deneyden önce eksozomlar PBS ile seyreltildi ve 1 mL'de 60 milyon parçacık hazırlandı. Daha sonra her bir kuyucuğa sırasıyla 10 μ L, 25 μ L, 50 μ L ve 100 μ L eksozom solüsyonu ilave edildi. 18 saatlik inkübasyonun ardından MTT canlılık testi ile 570 nm absorbans ölçümleri yapılarak canlılık analizler yapıldı. Tüm denemeler 5 tekrar çalışılmıştır.



Şekil 4.9 Eksozomların sitotoksosite testi, Farklı konsantrasyonlarda 18 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde MTT canlılık testi sonuçlarının istatistiksel analizi eksozomlar. (A) Sitotoksosite sonuçları, (B,C) istatistiksel analizler.

Kısaltmalar: EXO = eksozomlar; MTT = 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

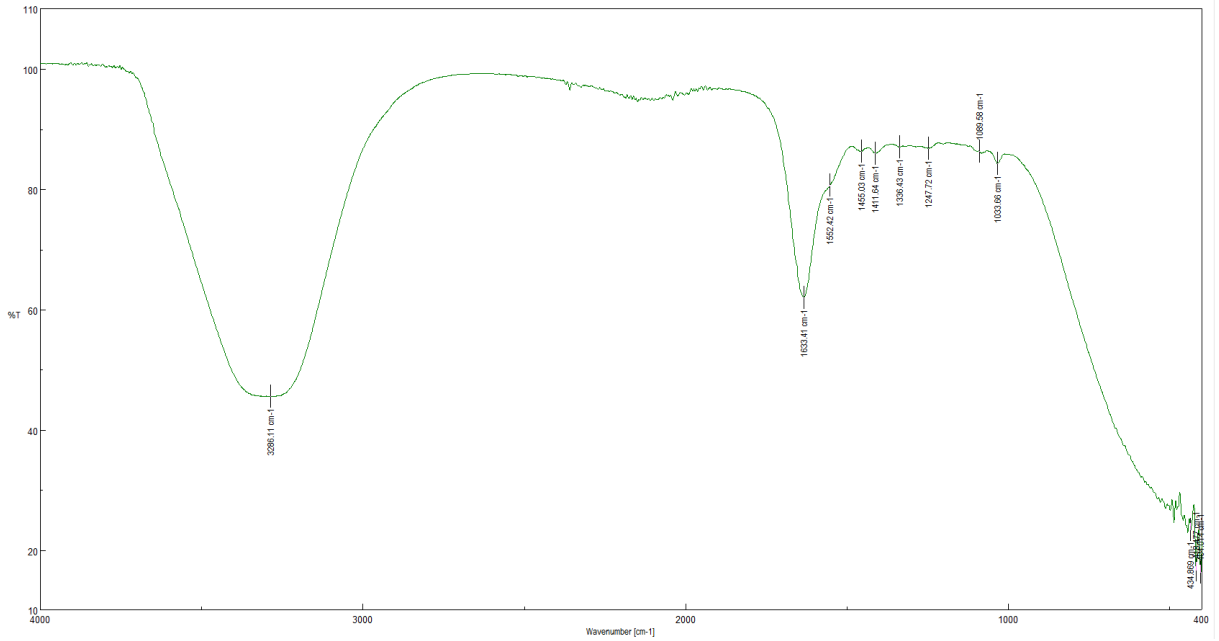
4.4 3B kültür Ortamının Hazırlanması ve Parkinson Modelin Oluşturulması

3B kültür ortamının hazırlanmasında, ticari olarak satılan liyofilize-Aljinat-Jelatin tozları, biyomürekkeplerin temeli olarak kullanıldı. Öncelikle bu aşamada kültür ortamının temeli oluşturacak bioink protokole uygun olarak şekilde steril hazırlandı. Daha sonra bionik WJ-MKH hücreler ile birlikte basılarak bioinklerin karakterizasyonu yapılması için hazırlandı. Bu karakterizasyon işlemi için FTIR ve SEM analizleri yapıldı.

3B kültür ortamın da kullanılan Baseink™ bioinki bioinki karakterizasyonu için paraformaldehite alınarak fikse edilmiştir. Daha sonra Arel Üniversitesi'nde Taramalı Elektron Mikroskobu-SEM ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi-FTIR analizleri yapılmıştır.

✓ FTIR Analizi

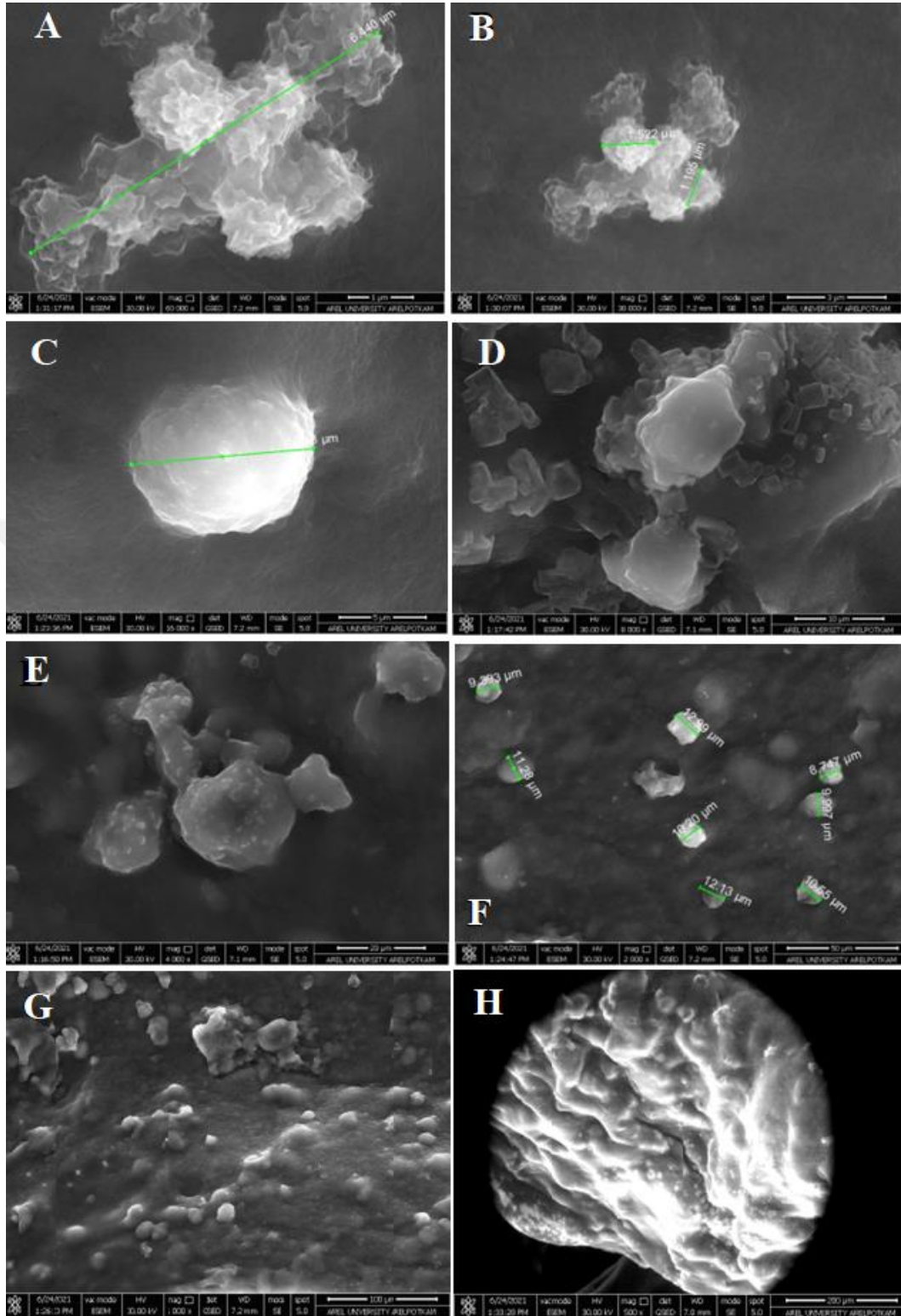
FTIR spektroskopisi, farklı fonksiyonel grupların varlığını ve kompozit biyomürekkepte bulunan kimyasal bağların yapısını araştırmak için kullanıldı. Jelatin/Aljinat tabanlı Baseink™ bioink'e, spektrum alanındaki en belirgin pikler 1633.41, 1552.42 ve 1033 cm⁻¹ civarındadır. FTIR sonuçları biyomürekkebin mikro dokuların büyümesi için amino asitler sağlayabilecek fonksiyonel gruplarını içerdiğini göstermiştir [243].



Şekil 4.10 Baseink™ bioinkinin FTIR Analizi

✓ SEM Analizi

SEM analizi sonuçlarında jelatin-aljinat tabanlı Bioink'in mezenkimal kök hücre ile oluşturulan yapısında, hücre yapışması için verimli, pürüzlü yüzey ve karmaşık yapıların oluşturulabileceği görülmüştür.

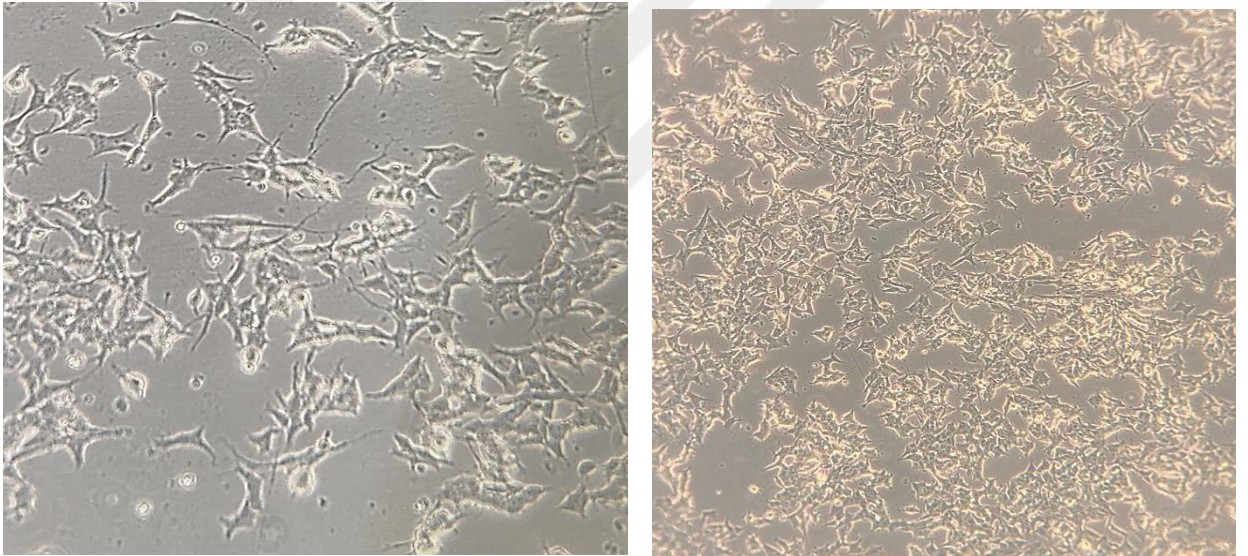


Şekil 4.11 Hazırlanan bioinkin SEM görüntüleri A: 1 μm , B: 3 μm , C: 5 μm , D: 100 μm , E: 20 μm , F: 50 μm , G: 100 μm , H: 200 μm

Bu analize göre aljinat-jelatin tabanlı bioink gerek yapısı gerekse morfolojisi açısında hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayarak sferoid yapı oluşturmak üzere hücreleri teşvik edebileceği görülmüştür. Ancak SEM görüntülerinden görünen tuz kristallerinin olması kültür sistemi kurulmadan önce biyomürekkebin iyice yıkanması gerektiği göstermiştir.

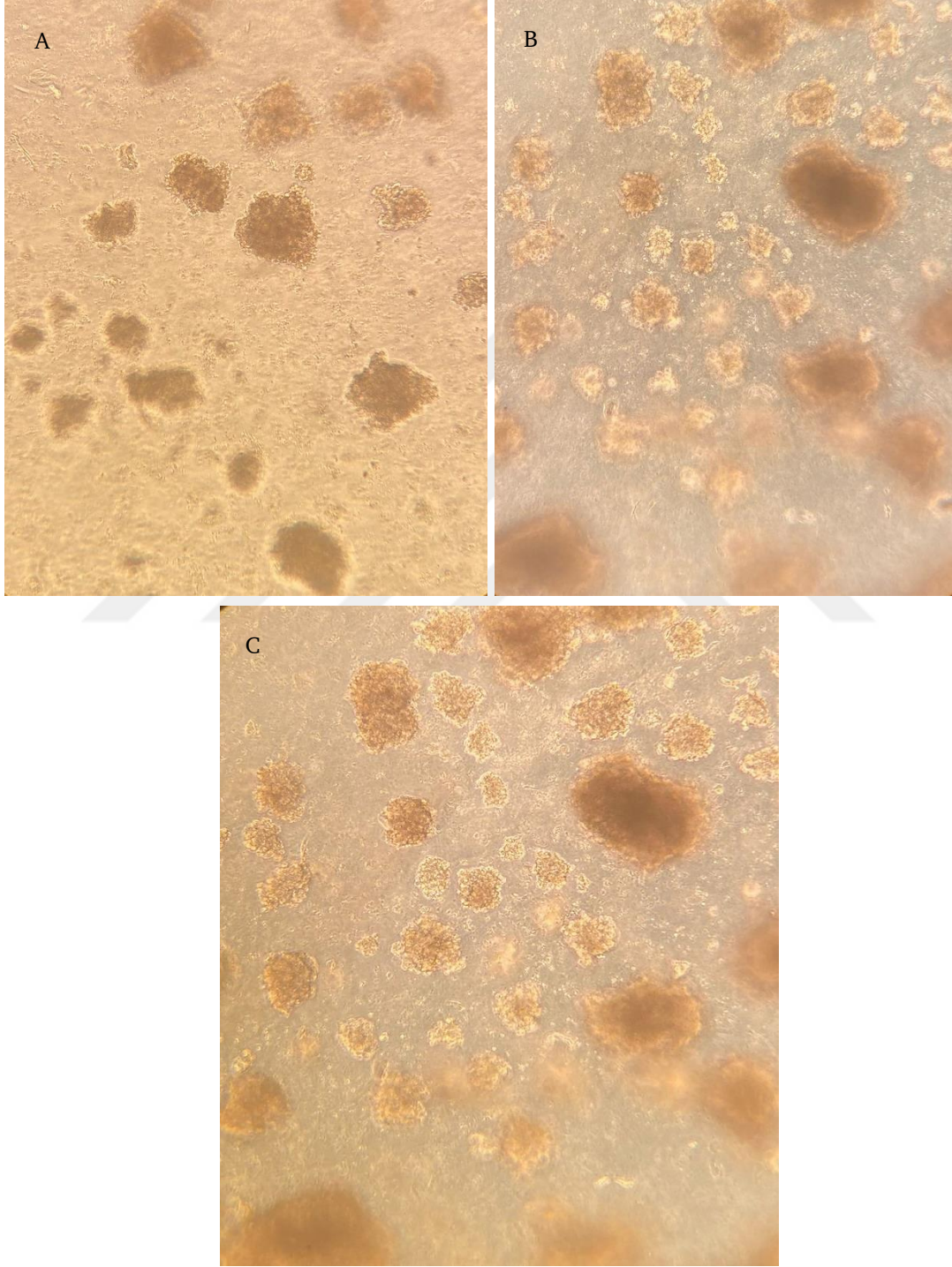
4.4.1 Dopaminerjik Nöroblastoma Hücre Hattının (SH-SY5Y) Kültüre Edilmesi ve 3B Kültür Ortamanın Oluşturulması

SH-SY5Y hücreleri %10 Fetal Bovine serum, L-Glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum piruvat ve sodyum bikarbonat bulunan DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Besiyeri iki günde bir değiştirildi ve hücreler çoğaltıldı.

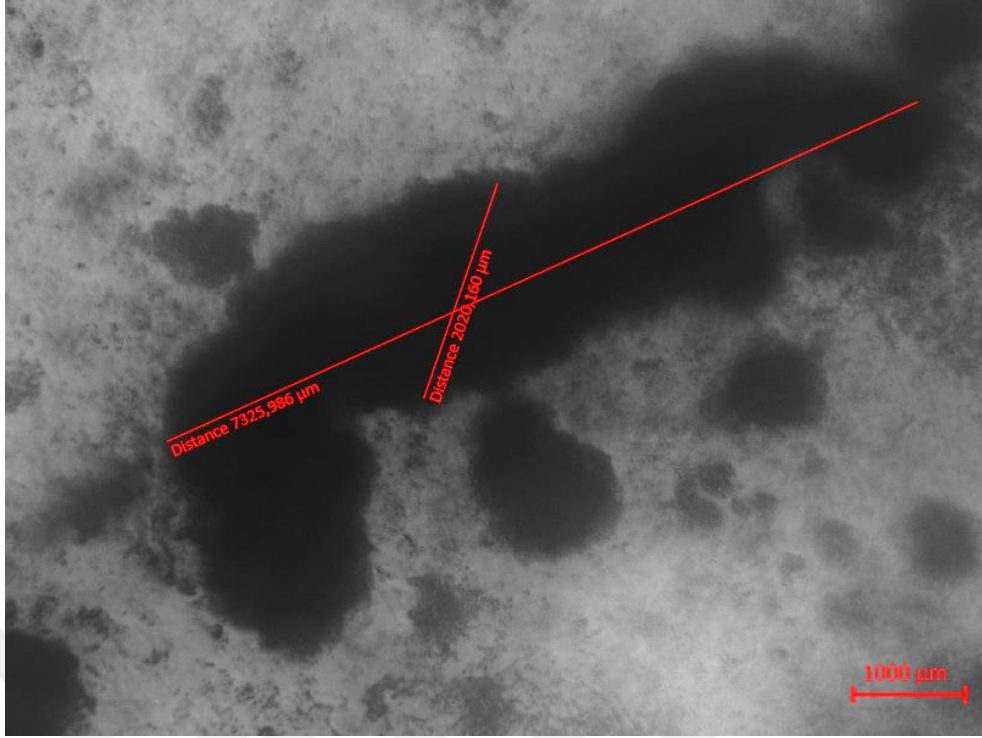


Şekil 4.12 SH-SY5Y hücre hattı (10x)

Çoğaltılan hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldı ve 3B kültür ortamını oluşturmak için biyomürekkeple birlikte 6'lı well plate ekildi. 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde sferoid yapılarının oluşması için 1 hafta inkübe edildi. İnkübasyon süresince 2 günde bir besiyeri bioniklere zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırıldı ve taze %10 FBS'li DMEM-F12 besiyeri eklendi.



Şekil 4.13 SH-SY5Y hücre hattının 3 boyutlu kültür ortamında sferoid yapıları A: 3. Gün, B: 5. Gün, C:7. Gün (X10)



Şekil 4.14 SH-SY5Y hücre hattının 3 boyutlu kültür ortamında sferoid yapıları Floresans mikroskop görüntüsü

4.4.2 2B ve 3B Kültür Ortamı Oluşturulan SH-SY5Y Hücre Hattında Parkinson Modeli Oluşturma ve Dopamin Yüklü Eksozomlar Terapötik Etkinliğinin Araştırılması

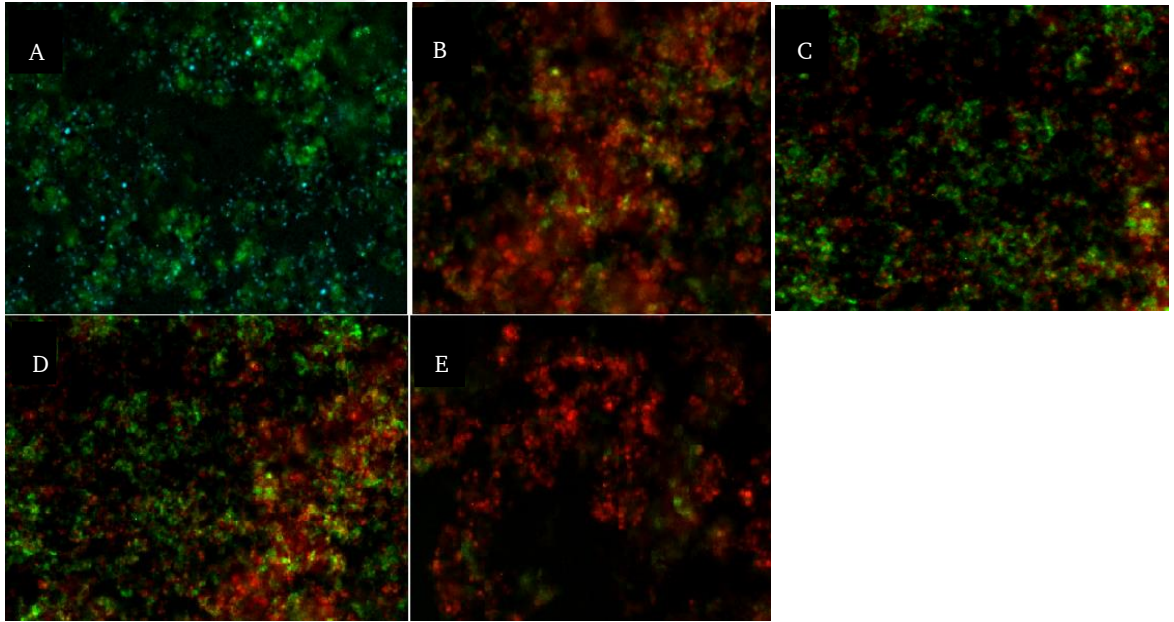
SH-SY5Y hücrelerin çoğaltılması, in vitro koşullarda hücre kültürü tekniklerine uygun şekilde, 37 °C' de, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda kültüre edilmiştir. 2B kültür ortamı oluşturabilmek için flaks yüzeyi %80 yoğunluğa ulaştığında hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak 6 kuyucuklu plakaya ekildi. 6 kuyucuklu plakaya ekimi yapılan SH-SY5Y hücreleri 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Yüzeye tutanan hücreler daha sonra Parkinson modeli oluşturmak için her bir kuyucuğa 100 µM hazırlanan 6-OHDA solüsyonu eklendi ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Aynı şekilde sferoid yapıyı oluşturan 3B kültür ortamındaki hücreler için Parkinson modeli oluşturulmuştur. 3B sistem PH modeli için 200 µM hazırlanan 6-OHDA solüsyonu eklendi ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

24 saatin sonunda her iki ortama da MTT test ile belirlenen 500 µ/mL konsantrasyonundaki formülasyon, uygulanmış ve 48 ve 72 saatlik inkübasyon

süreleri başlatılmıştır. Ancak SH-SY5Y hücre hattı 6-OHDA karşı zamana bağlı olarak direnç kazandığından 72. Saatlik uygulama kuyucuklara her birine ek bir 6-OHDA uygulaması daha yapılmıştır. İnkübasyon sonunda canlılık analizi canlı&ölü testi yapılarak terapötik etkinlik araştırılmıştır. Canlı&ölü testi Floresans mikroskop mikroskop ile görüntülenmiştir.

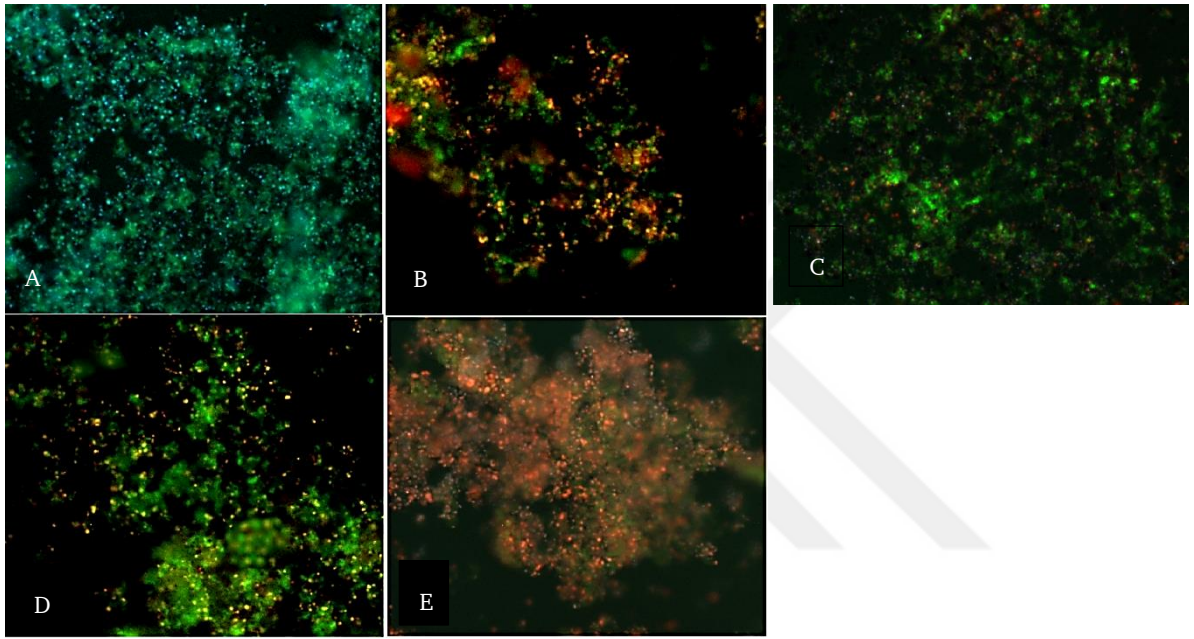
2B kültür ortamında 48 saatlik uygulamaların sonunda Canlı&Ölü testinin floresans mikroskop görüntüleri de şekil 4.15. yer almaktadır. 48. Saatlik uygulamalar da Dopamin yüklü eksozomların negatif kontrol grubuna göre hücrelerin adhesif kuvvet özelliklerini koruduğu ve canlı hücre popülasyonunda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda dopamine yüklü eksozomlar sadece eksozom uygulamasına yapılan gruplar ile kıyaslandığında, canlı hücrelerdeki artış görülmüştür.



Şekil 4.15 2B Kültür ortamında 48 saatlik uygulamaların sonrasındaki Canlı&Ölü test sonuçlarını Floresan Mikroskop mikroskop görüntüleri **A= Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamış, **B= 6-OHDA Grubu:** Sadece 6-OHDA uygulanmış, **C= Exo-DA Grubu:** Dopamin yüklü ekzomların, **D=Exo Grubu:** Sadece Eksozom uygulanmış, **E= Negatif Kontrol:** 6-OHDA+DMSO

2B kültür ortamında 72 saatlik uygulamaların sonunda Canlı&Ölü testinin Floresans mikroskop Görüntüleri de şekil 4.16. yer almaktadır. Bu uygulamalar da 48 saatlik uygulamalara benzer sonuçların olduğu görülmüştür. Ayrıca uygulanan

ek 6-OHDA solüsyonu hücre üzerinden nörotoksin etkinliğini sürdürdüğü tespit edilmiştir. Dopamin yüklü eksozomların negatif kontrol grubuna göre canlı hücre popoölasyonunun daha fazla olduğu görölmüştür. Aynı zamanda dopamine yüklü eksozomlar sadece eksozom uygulaması yapılan gruplar ile kıyaslandığında, canlı hücrelerin daha fazla olduğu görölrken, hücrelerin adhesif kuvvet özelliklerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



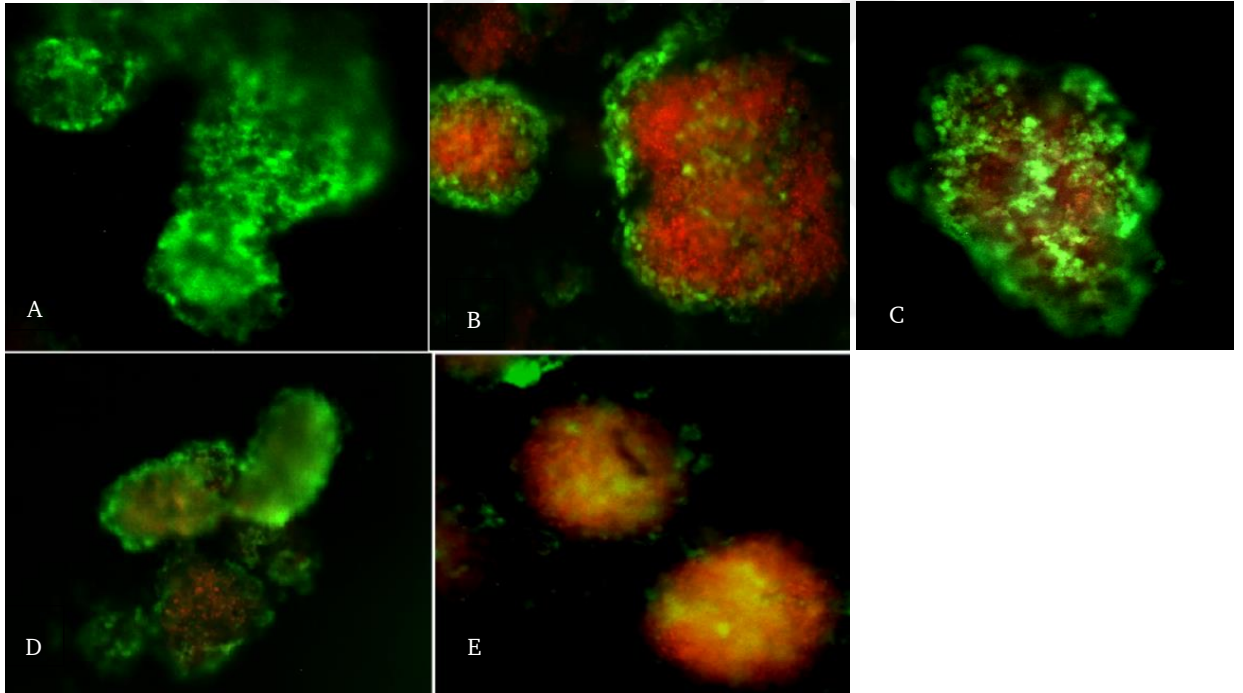
Şekil 4.16 2B Kültür ortamında 72 saatlik uygulamaların sonrasındaki Canlı&Ölü test sonuçlarını Floresan Mikroskop mikroskop görüntüleri **A= Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamış, **B= 6-OHDA Grubu:** Sadece 6-OHDA uygulanmış, **C= Exo-DA Grubu:** Dopamin yüklü ekzomların, **D=Exo Grubu:** Sadece Eksozom uygulanmış, **E= Negatif Kontrol:** 6-OHDA+DMSO

48 saatlik ve 72 saatlik uygulama süresine kıyaslandığında ise, dopamine yüklü eksozomlar 72 saatlik uygulamalar için her bir kuyucuğa eklenen 6-OHDA karşı daha fazla nöroprotektif etki gösterdiği görölmüştür.

3B kültür ortamında yapılan mikroskopik gözlemler sonucunda, SH-SY5Y hücreler ile oluşan sferoidlere uygulanan 6- OHDA'nın nörotoksik etkisi görölmüştür. 6-OHDA uygulanan grup kontrol grubu ile kıyaslandığında sferoid yapılarından adhesif kuvvet özelliklerini kaybettiği görölmüştür. Her hangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubunda yer alan canlı hücre dağılımı sferoid yapısının

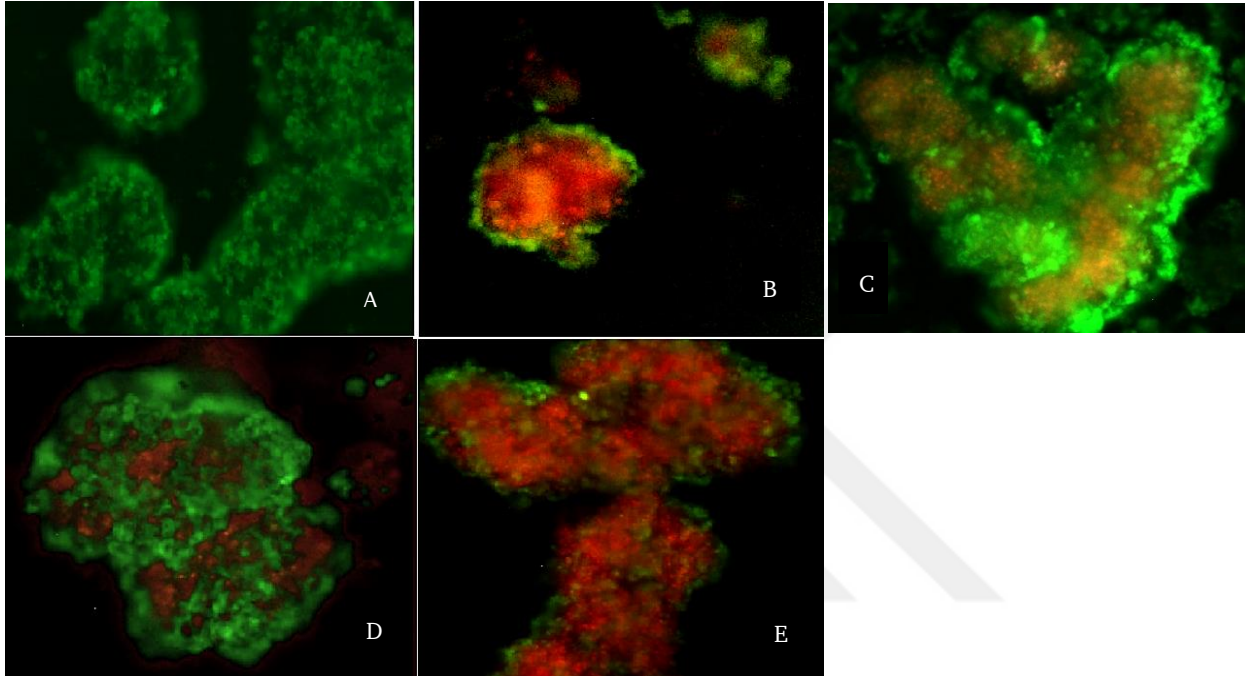
geneline dağılım göstermişken, 6-OHDA ile indüklenen kültür ortamındaki canlı hücreler sferoid yapısının çevresinde yer aldığı, ölü hücreler ise yapının merkezinde yer aldığı görülmüştür. Ayrıca zamana bağlı olarak sferoid yapının dağılmaların olduğu tespit edilmiştir.

3B kültür ortamı oluşan SH SY5Y hücre sferoidlerine 48 saatlik uygulamaların sonunda Canlı&Ölü testinin Floresans mikroskop Görüntüleri şekil 4.17. yer almaktadır. Sonuçlara göre; dopamin yüklü eksozomların negatif kontrol grubuna göre sferoid yaopıyı daha iyi koruduğu canlı hücrelerin daha yoğun olduğu görülmüştür. Ayrıca dopamin yüklü eksozomların, sadece eksozom uygulanan grup ile kıyaslandığında daha fazla nöroprotektif etki ettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.17 3B Kültür ortamında 48 saatlik uygulamaların sonrasındaki Canlı&Ölü test sonuçlarını Floresan Mikroskop mikroskop görüntüleri **A= Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamış, **B= 6-OHDA Grubu:** Sadece 6-OHDA uygulanmış, **C= Exo Grubu:** Sadece Eksozom uygulanmış **D= Exo-DA Grubu:** Dopamin yüklü ekzomların, , **E= Negatif Kontrol:** 6-OHDA+DMSO

3B kültür ortamı oluşan SH SY5Y hücre sferoidlerine 72 saatlik uygulamaların sonunda Canlı&Ölü testinin Floresans mikroskop Görüntüleri şekil 4.18'de yer almaktadır. 72 saatlik uygulamaların sonuçları ise 48 saatlik uygulamaların sonuçlarına benzer olduğu görülmüştür. Ancak 72 saatlik uygulamalar eklenen ek 6-OHDA'dan kaynaklı dopamine yüklü eksozomların nöroprotektif etkisinin daha fazla olduğunu söylemek mümkündür.



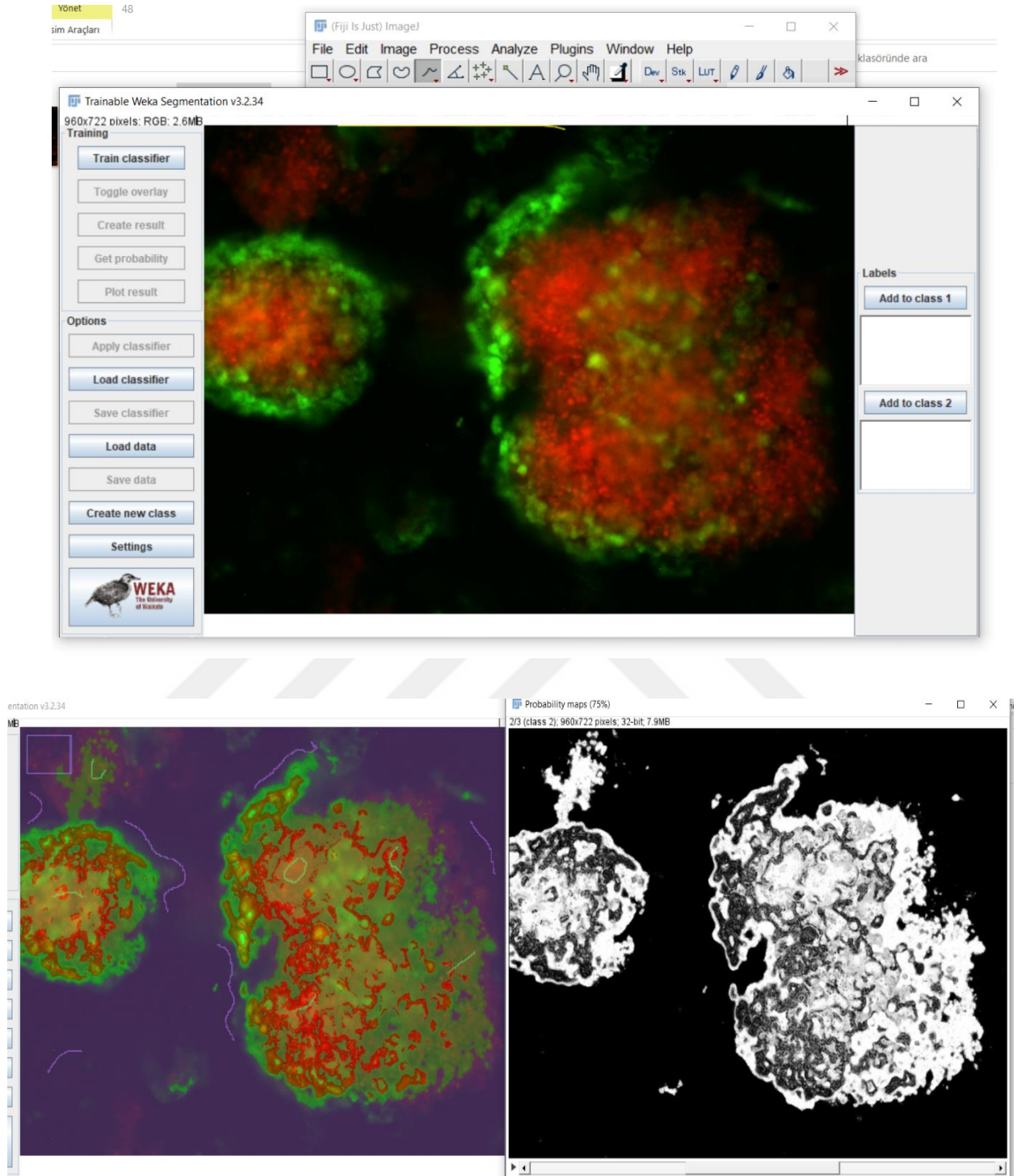
Şekil 4.18 3B Kültür ortamında 72 saatlik uygulamaların sonrasındaki Canlı&Ölü test sonuçlarını Floresan Mikroskop mikroskop görüntüleri **A= Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamış, **B= 6-OHDA Grubu:** Sadece 6-OHDA uygulanmış, **= Exo Grubu:** Sadece Eksozom uygulanmış **D= Exo-DA Grubu:** Dopamin yüklü eksozomların, **E= Negatif Kontrol:** 6-OHDA+DMSO

4.4.3 Görüntü Analizi

Tüm uygulamalar sonrasında elde edilen görüntüler Weka program aracılığıyla analizleri yapılmıştır. Her bir görüntü tek tek Fiji üzerinde eğitilebilir Weka segmentasyonu 3B ile 3 gruba ayrılarak etiketlenmiştir. Bu gruplar;

- Class 1: Canlı hücreler,
- Class 2: Ölü hücreler
- Class 3: Background) ayrılarak etiketlendi.

Bu etiketlenen grup yüzey alanın analiz edilmiştir [244].



Şekil 4.19 Eğitilebilir Weka segmentasyonu 3B programı

3B kültür ortamın 48 saatlik uygulamaların görüntü analizi şekil 4.20’de yer alırken, 72 saatlik uygulamaların görüntü analizi ise şekil 4.21’de yer almaktadır.

Analiz sonlarına göre elde edilen mikroskopik görüntüleri, Weka programı ile işlenerek canlı, l ve arka planı etiketlenerek niceliklendirildi.

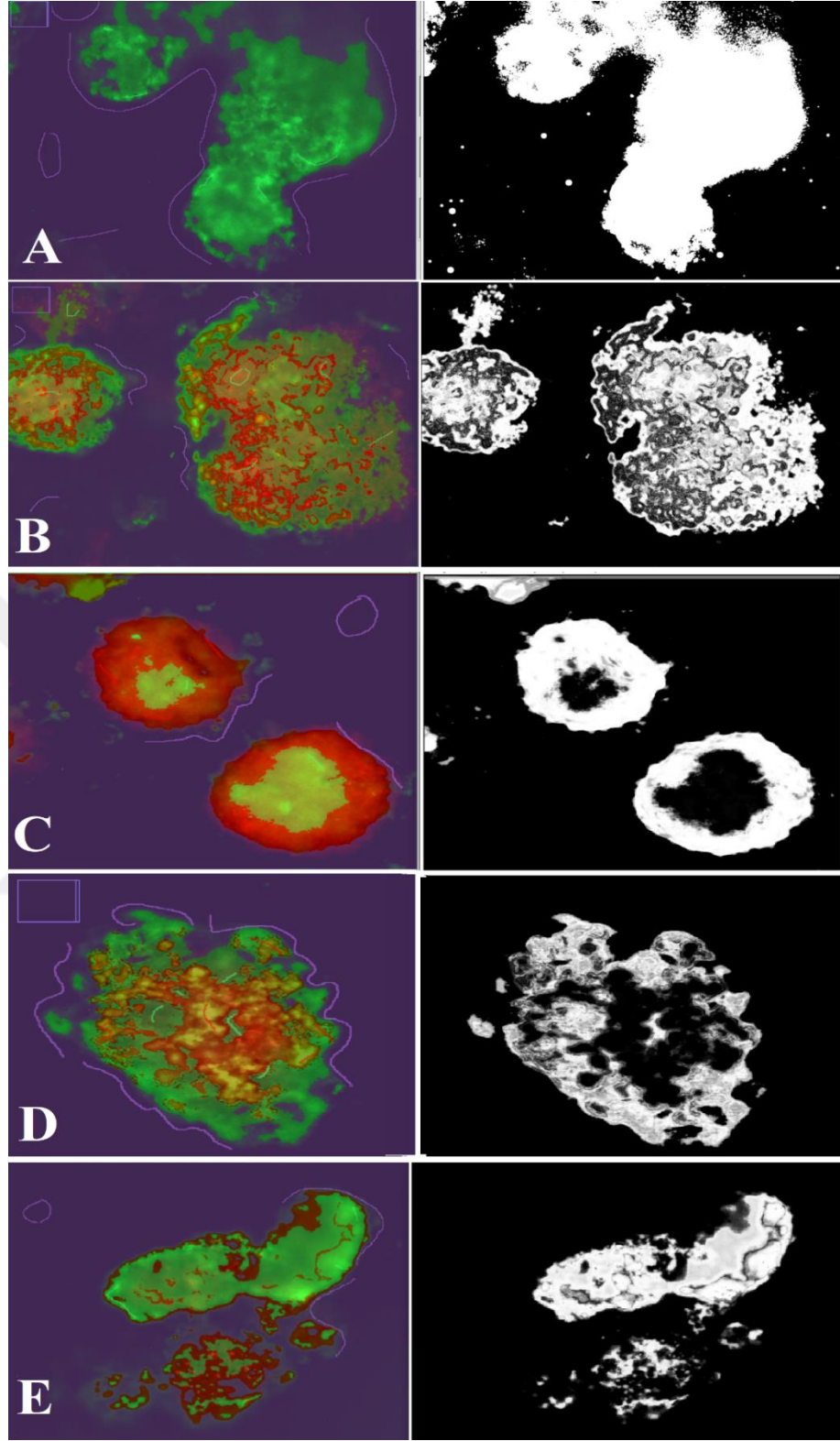
Weka programı ile görüntülerin analizlerinin verilerinde ise; Floresan Mikroskop görüntülerinde 3 kısmı etiketlenerek işaretlenmiştir. Bu iaretlemelede;

Class 1: Kırmızı ışıma yapan l hücreler

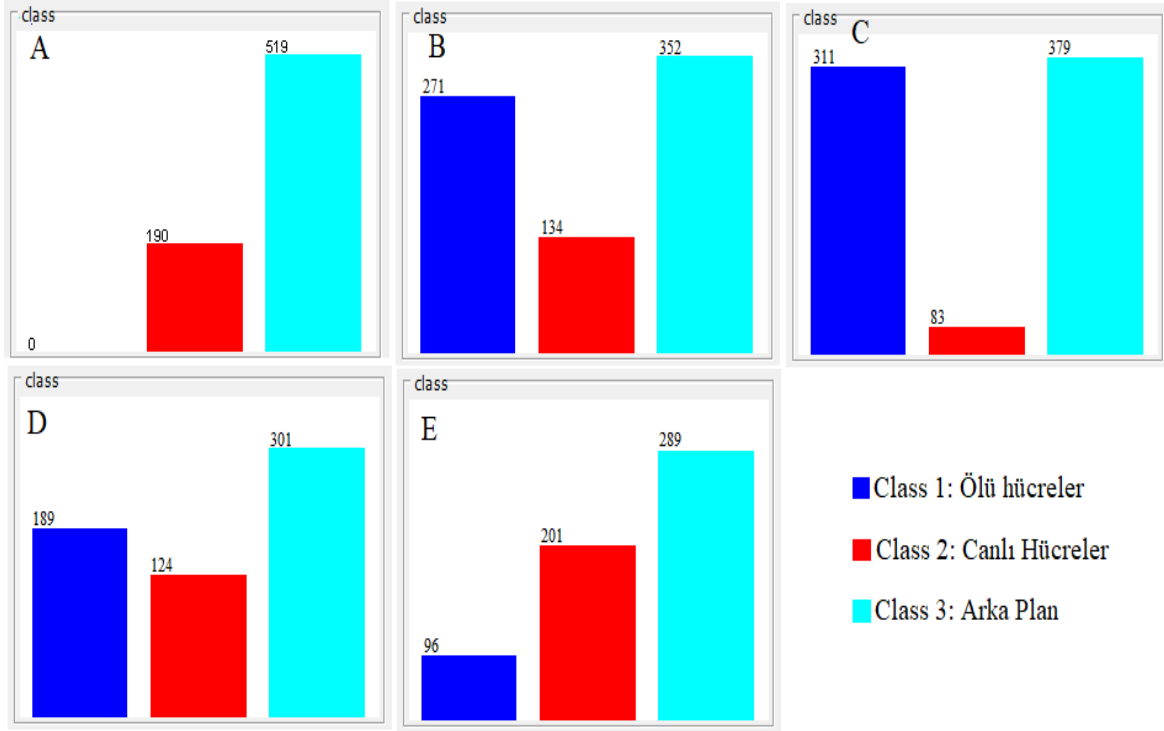
Class 2: Yeşil ışıma yapan canlı hücreler

Class 3: Arka plan- Background

48 saatlik uygulama görüntülerinin Weka dataları ise şekil 4.21’de verilmiştir. Bu verilere göre, 6-OHDA uygulanan grubun yüzey alan verilerinde ölen hücrelerin canlı hücreler kıyasala yüksek olduğu grlmştir. Dopamin yüklü eksozomların uygulandığı grupta yüksek canlılığın olduğu tespit edilmiştir.

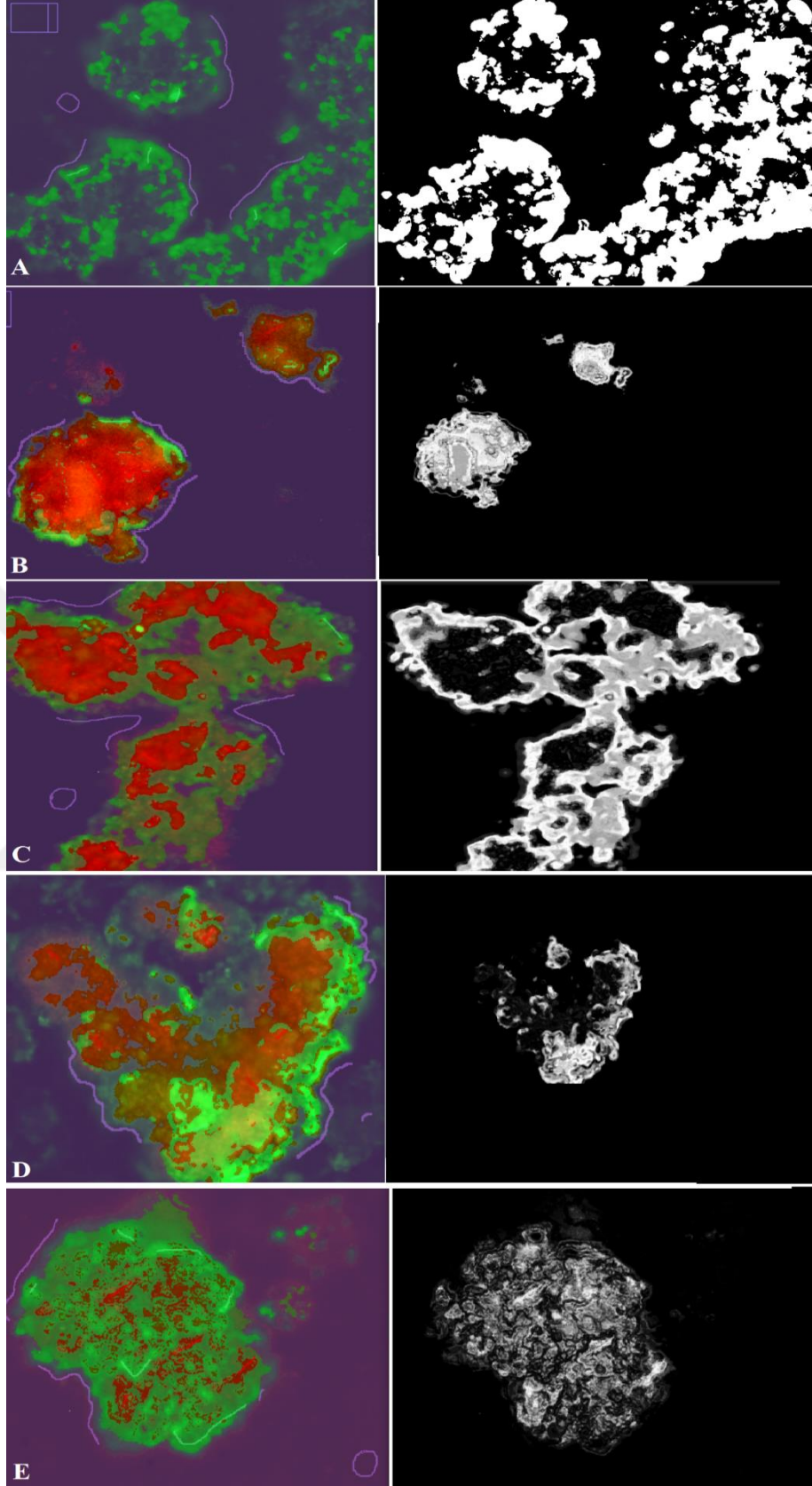


Şekil 4.20 48 saatlik uygulama sonuçlarının Weka analiz görüntüleri, **A=** Kontrol Grubu **B=** 6-OHDA Grubu, **C=** Negatif Kontrol, **D=**Exo Grubu, **E=** Exo-DA Grubu

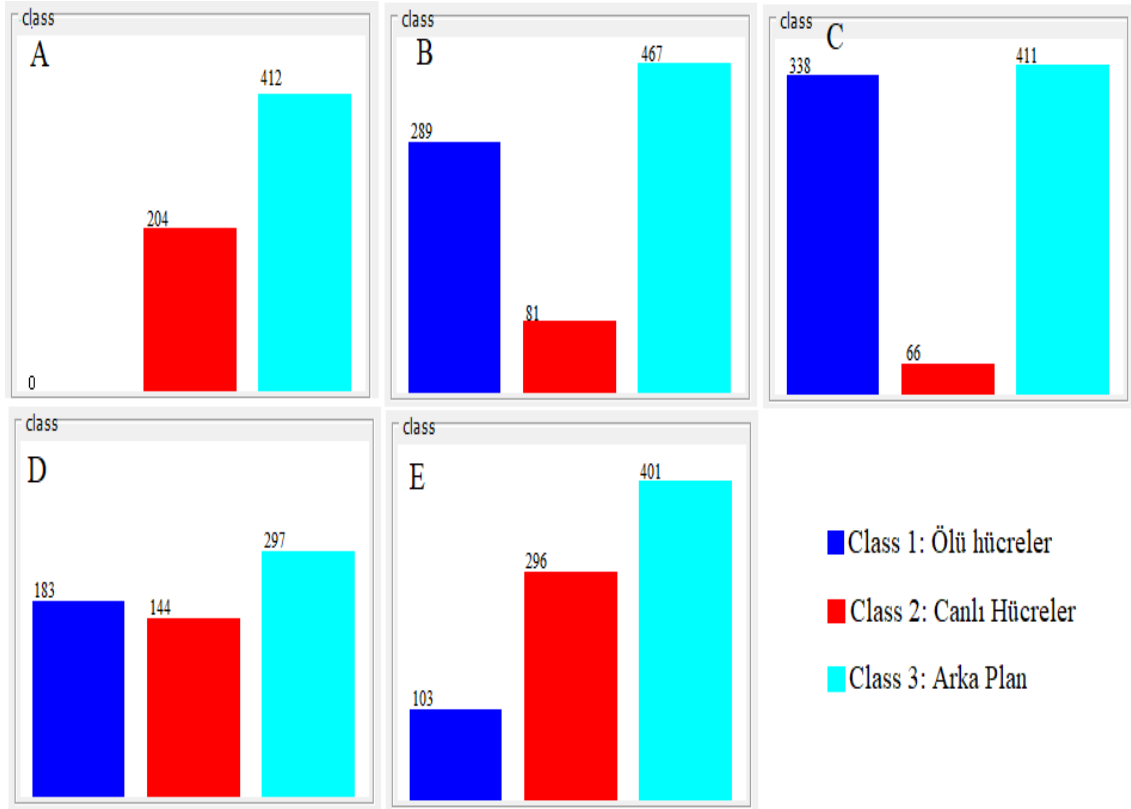


Şekil 4.21 48 saatlik uygulama sonuçlarının Weka analiz verileri, **A=** Kontrol Grubu **B=** 6-OHDA Grubu, **C=** Negatif Kontrol, **D=**Exo Grubu, **E=** Exo-DA Grubu

72 saatlik uygulama görüntülerinin Weka dataları ise Şekil 4.23'de verilmiştir. Bu verilere göre, 6-OHDA uygulanan grubun yüzey alan verilerinde ölen hücrelerin canlı hücreler kıyasla yüksek olduğu görülmüştür. Dopamin yüklü eksozomların uygulandığı grupta yüksek canlılığın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 72 saatlik inkübasyon sürecinde tüm kuyucuklara uygulanan ek 6-OHDA'da Parkinson modelinin devamlılığını sağladığı görülmüştür. 72 saat ve 48 saatlik uygulamalar kendi aralarında kıyaslandığında ise, 72 saat uygulama yapılan grupta hücre canlılığının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



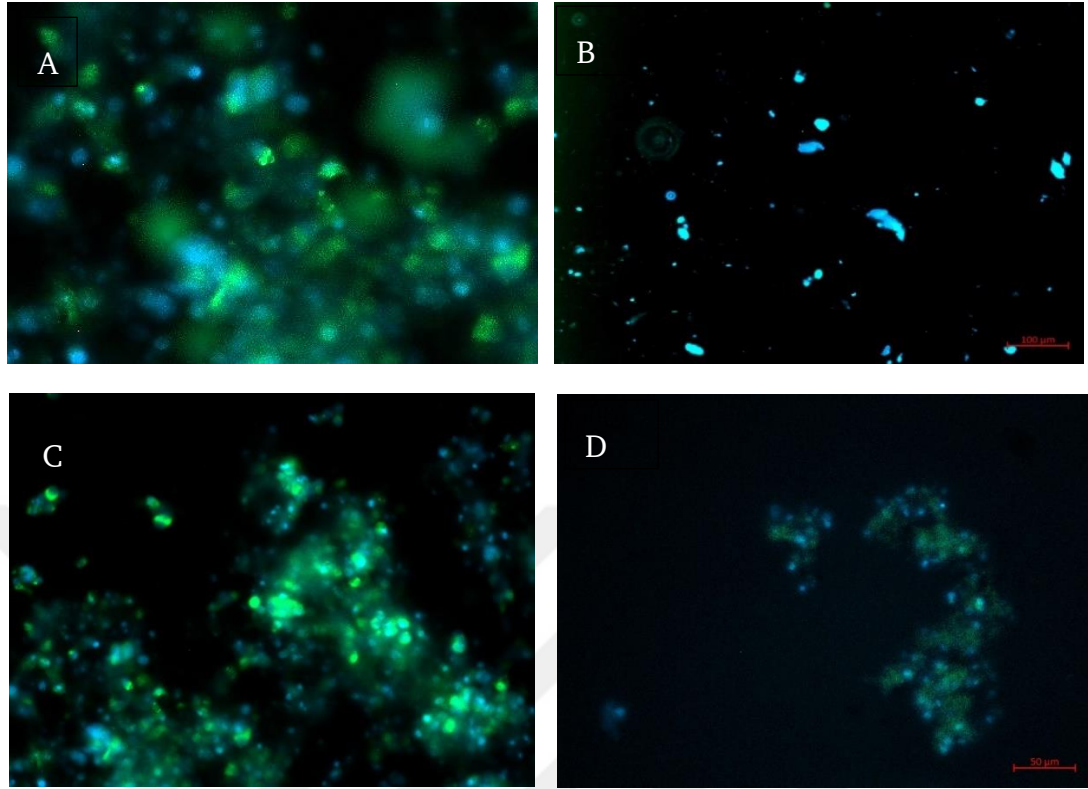
Şekil 4.22 72 saatlik uygulama sonuçlarının Weka analiz görüntüleri, **A=** Kontrol Grubu **B=** 6-OHDA Grubu, **C=** Negatif Kontrol, **D=**Exo Grubu, **E=** Exo-DA Grubu



Şekil 4.23 48 saatlik uygulama sonuçlarının Weka analiz verileri, **A=** Kontrol Grubu **B=** 6-OHDA Grubu, **C=** Negatif Kontrol, **D=**Exo Grubu, **E=** Exo-DA Grubu

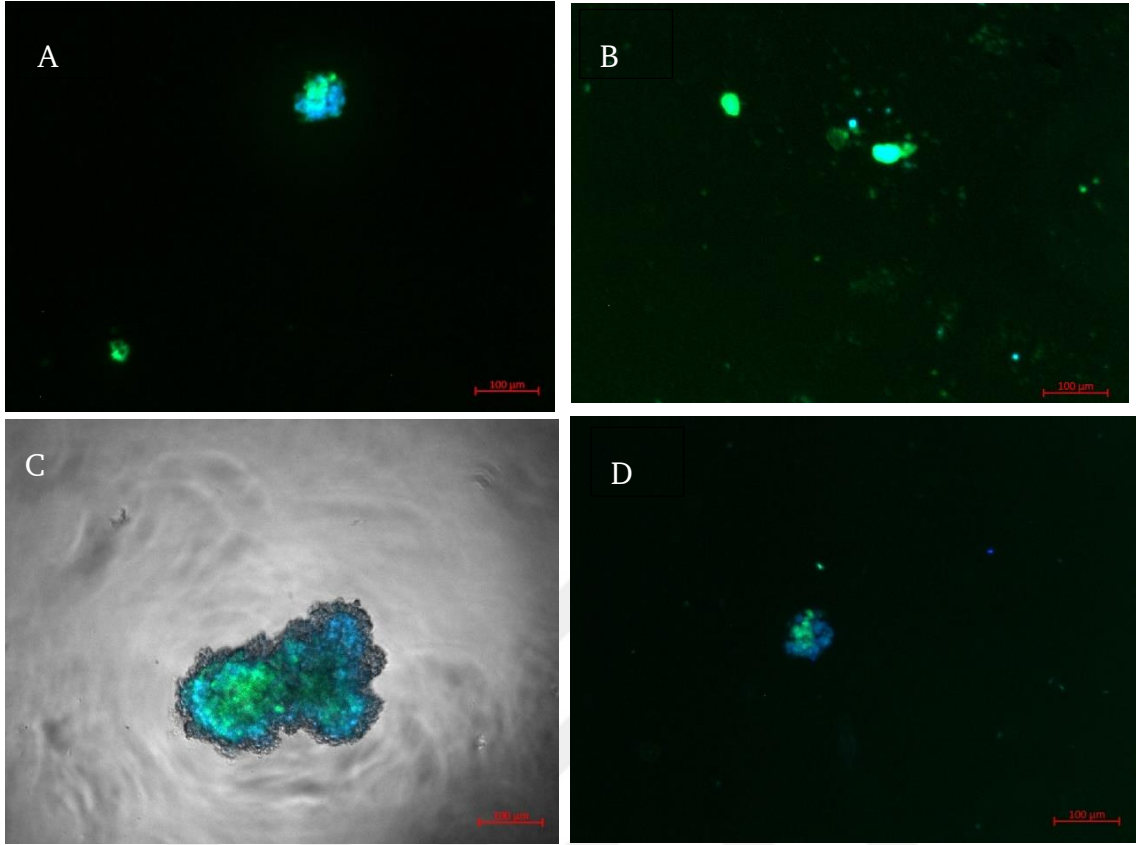
4.4.4 İmmün Boyama

2B ve 3B kültür ortamında 6-OHDA ile indüklenen hücelere uygulanan dopamine yüklü eksozomların terapötik etkinliğin immün boyama gerçekleştirilerek analiz edilmiştir. Çalışmanın bu kısmında, 72. Saatlik uygulamaların sonunda β -Tubulin ekspresyonu incelenmiş olup, floresan görüntüleri Şekil 4.24 – 4.25 karşılaştırılmıştır. 2B ve 3B kültürde yapılan immün boyamalar dopamine yüklü eksozomların negatif kontrol gruplarına kıyasla apoptotik faaliyetlerinin azaldığı görülmüştür. Dopamin yüklü eksozomların uygulandığı grup her iki ortamda sadece eksozom uygulanan grup ile kıyaslandığında ise; yapıların daha fazla korunduğu bulunmuştur.



Şekil 4.24 İmmün Boyama sonuçları, **A=** Kontrol Grubu **B=** 6-OHDA Grubu, **C=** Exo- DA Grubu, **D=** Exo Grubu

72 saatlik immün boyamalar da gözlenen sonuçlar hem 2B hem de 3B kültür ortamında yeşil boyanan kısımların β -III olduğu mavi boyananların ise DAPI boyamadan kaynaklı çekirdek boyanması olduğu görülmektedir. Dopamin yüklü eksozomların uygulandığı gruplar, sadece 6-OHDA ve 6-OHDA+DMSO uygulanan gruplara göre sağ kalımın daha fazla olduğu, SH-SY5Y hücrelerinin 6-OHDA karşı korunduğu görülmüştür. Elde edilen formülasyonun hem canlı%ölü analiz ile hem de immün boyama yapılarak nöroprotektif etkisinin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.25 İmmün Boyama sonuçları, **A=** Kontrol Grubu **B=** 6-OHDA Grubu, **C=** Exo- DA Grubu, **D=** Exo Grubu

Eksozomlar, hücreler tarafından salgılanan 40-200 nm boyutlarında küçük zar kesecikleridir. Hücreler arası iletişimi sağlama yeteneğine sahip eksozomlar, endositoz, fagositoz, mikropinositoz, lipid aracılı içselleştirme ve füzyon gibi farklı yollarla hücrelere girebilir [55]. Eksozom yüzeyinde bulunan lipidler ve kolesterol sayesinde, diğer nanotaşıyıcı sistemlere göre oldukça avantajlıdır. Çünkü yüzey özellikleri sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik molekülleri taşıma yeteneği verir. Kolesterol uçlarının hidrojen bağlanmasıyla sıkı bir paketlenme işlemi yapılabilir. [245,246, 247].

Eksozomların, kargo ve hücreler arası iletişim gibi önemli işlevlerine ek olarak, özellikle beyinde nörojenizde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir [53,54]. Ayrıca, MKH'den türetilen eksozomlar allojenik hücrelerel terapiler ile kıyaslandığında daha düşük immün ret riski içerdiği, yüksek stabilite ve doğal terapötik özelliklere sahiptir, ve ayrıca hedef arama yeteneği göstermektedir [249,250]. Son yıllarda, nanotaşıyıcı sistem olarak eksozomların kullanımı özellikle, nörodegeneratif hastalıklara karşı, nöronal rejenerasyona katkı sağlayabilmesi KBB'den etkili bir şekilde geçebilmesi nedeniyle ve alternatif terapmtik ajan olarak kullanılması dikkat çekmiştir. Bu bilgiler ışığında, tez çalışmamızda; WJ-MKH'dan izole edilen eksozomlara dopamin yüklemesi yapılarak elde edilen formülasyonun terapötik etkinliği artırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk basamağında, eksozom izolasyonu için birkaç yöntem olmasına rağmen biz burada en etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilen ultrasantrifüj ile izolasyon yöntemini kullandık. WJ-MKH'ler, düşük immünojenik potansiyelleri ile bilinen ve klinik deneylerde eksozom kaynağı olarak kullanılan donör hücreler olarak seçilmiştir [249]. Kültüre edilen WJ-MKH'lerin flaskta %80 yoğunluğa ulaştığında, serumsuz besiyeri eklenerek 48 saat inkübe edilmiş ve supernatant toplanmıştır. Toplanan bu süpernatantlar ultrasantrifüj yöntemi ile izole edilmiştir. Karakterizasyonunda kullanılan NTA ve DLS analizleri birbiriyle tutarlı

sonuçlar vererek elde edilen eksozomların 98 nm boyutlarında olduğu bulunmuştur.

İzolasyonu tamamlanan WJ-MKH kökenli eksozomların, inkübasyon yöntemi ile dopamin yüklenmesi yapılmıştır. İnkübasyon yönteminde yükleme kapasitesini arttırmak için çözelti yoğunluğunun %0,002'si kadar saponin eklendi. İnkübasyon sonunda ortamdan serbest dopamin ve saponin uzaklaştırılmak için tekrar ultrasantrifüjleme yapıldı. Bu basamağın sonuçlarına göre ise; ilk izolasyonda 98 nm olan eksozomların ilaç yüklemeyle birlikte boyutlarının 110 nm'ye çıktığı görülmüştür. Ayrıca çözelti içerisinde parçacıklar arasında daha büyük elektrostatik itme ve bunların toplanma eğilimi gösteren zeta potansiyelinin önceki çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğunu bulduk [250].

Elde edilen dopamin yüklü eksozomların, solüsyon içerisindeki dopamin varlığı HPLC analizi yapılarak tespit edilmiştir. Burda öncelikle eksozomları patlatmak için uygulanan protokolün ardından solüsyon içerisindeki dopamin tutarlı sürelerde pik oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca HPLC analizinde patlatılan eksozomlarlar birlikte saponin varlığı da tespit edilmiştir. Bu noktada da saponinin eksozomların membranında bulunan kolesterolünü seçici olarak kaldırabileceğini, eksozomal lipid çift katmanlarında gözenekler oluşturabileceğini ve bu nedenle yoğun bir şekilde dopamin kapsüllenmesini teşvik edebileceğini düşünmekteyiz.

Eksozom tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerin yüklenen ilaçların moleküler ağırlığı başta olmak üzere pek çok etmen yükleme verimliliğine etki edebilir. İlaç yükleme inkübasyon yöntemi basit, diğerk yöntemlere göre daha ucuz ve bu özellikler sayesinde sıklıkla tercih edilen yöntemlerden birisidir [249]. HPLC analizinden sonra ilaç yükleme kapasitesi ise; yükleme sonrasında ultrasantrifüj ile uzaklaştırılan süpernatanttan yapılmıştır. Burada öncelikle farklı konsantrasyonlar da dopamin çözeltisinin hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Ardından ultrasantrifüj sonrasında alınan süpernatantı ve dopamin çözeltilerinin UV-Spektrofotometri ile absorbans değerlerine göre ölçülmüştür [227]. Absorbans değerleri verilen denkleme göre hesaplandı. Sonuçlara göre; yükleme kapasitesi yaklaşık %11 olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyon yöntemi kullanılarak yapılan diğerk çalışmalarda da benzer sonuçlar

olduğu görülmüştür. İzole edilen eksozomlara paklitasel yüklendiği bir çalışmada yükleme verimliliğinin yaklaşık %7, Doksurubisinin yüklendiği diğer bir çalışmada ise yükleme verimliliğinin yaklaşık %12 olduğu görülmüştür [118, 170]. Eksozom tabanlı geliştirilecek formülasyonlarda, ilaç yükleme sonikasyon yöntemini tercih edilebilir [176].

Ayrıca dopamin yüklü eksozomları ilaç salım çalışmasında kümülatif ilaç salım profili incelendiğinde 8 saatlik inkübasyonun sonunda büyük miktarlarda dopamin salımı olduğu gözlemlendi. İn vitro salım çalışmasının ilk 5 saatinde patlayıcı salım gözlemlendi. Eksozom formülasyonlarının salım profili, ilaç özellikleri, çift katmanlı akışkanlık ve moleküler ağırlık gibi birçok parametreye bağlı olduğundan, birçok çalışmada saat başına salınan ilaç miktarlarında farklılıklar gözlemlenebilmektedir [250].

Mevcut araştırmanın bir diğer aşamasında elde edilen formülasyonun sitotoksik etkinliği araştırılmıştır. Sonuçlara göre; formülasyonların fibroblastlar üzerinde hiçbir sitotoksik etkisi gözlemlenmemiştir. Ancak uygulama yapılan gruptaki gözlenen hücre canlılığındaki az olsa düşüşün, eksozomlara dopamin yüklenme başarısını artırmak için eklenen saponinin fibroblast hücreleri üzerinde toksik etkisi sonucunda olduğu düşünülmektedir. Bu verilere göre, lipozomlar, mikroküreler, mikroemülsiyonlar ve diğer sentetik ilaç dağıtım sistemleri ile karşılaştırıldığında eksozomların endojenitesinin doğal ve benzersiz bir avantaj olduğu sonucuna varılabilir. [251]. Mevcut yöntemin dezavantajlarını azaltmak için farklı transfeksiyon reaktifleri, elektroporasyon teknikleri veya endojen dopamin üreten hücreler, tercihen genetik olarak modifiye edilmiş MKH'ler, bir eksozom kaynağı olarak kullanılabilir.

3B kültür ortamlarının oluşturulmasıyla yapılan çalışmalarda pek çok avantajlarının olduğu söylemek mümkündür. Hücre kültüründe 3B ortamı oluşturmak için pek çok biyomalzeme kullanılmaktadır. 3B kültür ortamının hem daha ucuz, hem de etik açısında bir çok problemin önüne geçtiğinden oldukça avantajlıdır [206,207].

Çalışmanın bu aşamasında ise; Jelatin/Aljinat tabanlı BaseinkTM'in belirli oranları ile hazırlanarak 3B kültürün tabanı oluşturulmuştur. Kültür ortamının

karakterizasyonu için FTIR ve TEM analizi yapılmıştır. FTIR analizine göre; Baseink™' bioinkinin Jelatin/Alginat tabanlı olması literatürde benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında en belirgin pikler 1633.41, 1552.42 ve 1033 cm⁻¹ civarında olduğu bulunmuştur [243]. TEM analizine göre ise; Bioink hücre etkileşimleri hem yüzeysel hem de iç kısımda gösterilmiştir. TEM görüntülerinden Bioink'in yüzey alanının sferoid yapı oluşturabilmesi için uygun olduğu görülmüştür.

Jelatin/Aljinat tabanlı bioink ile kültüre edilen SH-SY5Y hücrelerinin 3 günün ardından sferoidal form oluşmaya başladığı görülürken, sferoid yapısını 5 gün sonunda daha da belirgin olarak oluşturduğu gözlenmiştir [253]. Bionik ile 3B kültür ortamı geliştirildikten sonra elde edilen formülasyonun terapötik etkinliği hem 2B'ta hem de 3B kültürde araştırılmıştır.

In vitro kültür ortamında Parkinson modeli oluşturulmak üzere nörotoksin olarak bilinen 6-OHDA kullanımıştır. 6-OHDA ile indüklenen kültür ortamlarında hücre sağ kalımlarının ciddi oranda azaldığı, 3B kültür ortamında oluşan sferoidal formların bozulduğu görülmüştür [254]. 6- OHDA uygulaması 2B ve 3B kültür ortamında farklı konsantrasyon uygulanmış ve saat in ve kübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda geliştirilen formülasyonun uygulanmış ve 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. SH-SY5Y hücre hattı 6- OHDA 24-48 saatleri arasında direnç kazandığından 72 saatlik formülasyon ile inkübasyonu için ek bir 6-OHDA uygulaması daha yapılmıştır. İnkübasyon sonunda yapılan Canlı%ölü analizinde, yapılarak elde edilen Floresan Mikroskop görüntüleri eğitilebilir Weka programında işlenerek görüntü analizi yapılmıştır. Sonuçlara göre; hem 2B hem de 3B kültürlerde formülasyonun uygulandığı grup negatif kontrol grubu ile kıyasladığından gerek hücre canlılığının gerekse sferoid yapısının dopamin yüklü eksozomların uygulama yapılan gruplarda daha fazla korunduğu görülmüştür. Elde edilen görüntüler her bir grup için 3 farklı flore görüntüsü ile işlenerek Weka programıyla görüntü analiz sonuçları da Canlı&Ölü analiz sonuçlarıyla tutarlı olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasının son aşamasında ise; 2B ve 3B kültür ortamında Parkinson modeline indüklenen hücrelere, dopamin yüklü eksozomlar 72 saatlik boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda teapötik etkinliği immün boyama

yapılarak araştırılmıştır. İmmün boyamada, dopamin yüklü eksozomların uygulandığı grup, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, β -tubulin ekspresyon seviyesinde gözle görülür bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu da 6-OHDA karşı dopamin yüklü eksozomların SH-SY5Y hücrelerinin yapısal bozulmayı ve aksonal hasara karşı daha fazla koruduğu görülmüştür. Elde edilen formülasyonun nörotoksik etkinliği bilenen 6-OHDA karşı nöroprotektif etki gösterdiği ortaya çıkarmıştır.

Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere eksozom temelli nanotaşıyıcı sistemin araştırıldığı bu çalışmada yapılan tüm analizlerin sonuçların sırasıyla aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- 1- WJ-MKH kökenli eksozomlar izlenen protokole göre izole edilmiş ve karakterizasyon işlemleri yapılmıştır.
- 2- İzole edilen eksozomlara inkübasyon yöntemi ile dopamin yüklenmiş yüklenme HPLC analizi ile kanıtlanmıştır.
- 3- Geliştirilen formülasyonu yükleme verimliliğinin ise literatürlere uygun sonuçlar ile karşılaşılmıştır.
- 4- Dopamin yüklü eksozomların toksik etkisinin olmadığı bulunmuştur. Gözlenen az da olsa hücre ölümünün yükleme kapasitesine arttırmak için eklenen saponinden kaynaklı olduğu düşünmekteyiz [255].
- 5- Dopamin yüklü eksozomların SH-SY5Y hücre hattında 6-OHDA ile Parkinson modeline indüklenmiş 2B ve 3B kültür ortamında terapötik etkinlik gösterdiği hem canlı& ölü analiz hem de immün boyama ile görülmüştür.

Böylece bu tez kapsamında; literatürde ilk kez olarak WJ-MKH'lerinden izole edilen eksozomlara dopamin yüklenmesi yapılarak elde edilen formülasyonun PH'ında kullanılmak üzere nanoteknolojiye dayalı yeni yaklaşımların geliştirilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu yöntem ile geliştirilen formülasyonların diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni bir aday olabileceğini düşünmekteyiz. SH-SY5Y hücre hattı ile 2B ve 3B kültür ortamında mikroçevre oluşturularak PH modeline indüklenebileceği görülmüştür. Elde

edilen tüm bilgiler ışığında eksozom tabanlı bu ilaç taşıyıcı sistemin tezin önerilen amaç ve hipotezini doğruladığı tespit edilmiştir.

ÖNERİLER

- Eksozom temelli çalışmalarda nanopartikül yoğunluğu ve elde edilen partikül sayısı baz alınarak özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi,
- Nanotaşıyıcı sistem olarak eksozomların yüklenecek ilacın moleküler ağırlığı göz önünde bulundurularak ilaç yükleme yöntemlerinin seçilmesi ve denenmesi ,
- Dopamin yüklü eksozomların PH üzerinde terapötik etkinliği araştırılmak üzere in vivo çalışmaların yapılması,
- Eksozomların sahip oldukları özellikleri sayesinde başta nörodejeneratif hastalıklar tanı ve tedavisinde etkili bir ajan olabileceğinden bu ajanların geliştirilmesinde ve etkinliklerinin belirlenmesinde de etkin bir biçimde uygulanması önerilebilir.

- [1] GBD 2016 Neurology Collaborators, "Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study," *Lancet Neurol.*, 18(5), pp. 459–480. 2016.
- [2] R. E. Drolet, J. R. Cannon, L. Montero, J. T. Greenamyre, "Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastroin-testinal neuropathology," *Neurobiology of Disease*, 36(1), pp.96–102. 2009.
- [3] J. Parkinson, "An essay on the shaking palsy," Publisher: London; Sherwood, Neely, and Jones; 1817.
- [4] D. K. Simon, C. M. Tanner, P. Brundin, "Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology," *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), pp. 1-12. 2020.
- [5] W. Poewe, K. Seppi, C. M. Tanner, G. M. Halliday, P. Brundin, J. Volkmann, A. E. Schrag, A.E. Lang, "Parkinson disease," *Nature Reviews Disease Primers*, 3(17013), pp 1-21. 2017.
- [6] Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu, and W. H. Tang, "Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential," *Cell & Bioscience*, 9 (19), 2019.
- [7] X. Y. Cao, J. M. Lu, Z. Q. Zhao, M. C. Li, T. Lu, X. S. An, and L. J. Xue, "MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exo-some-like microvesicles," *Neuroscience Letters*, 644, pp. 94-99, 2017.
- [8] Q. Wang, J. Yu, T. Kadungure, J. Beyene, H. Zhang, and Q. Lu, "ARMMs as a versatile platform for intracellular delivery of macro-molecules," *Nature Communications*, 9 (960), 2018.
- [9] J. P. de Rivero Vaccari, F. Brand, S. Adamczak, S. W. Lee, J. Perez-Barcena, M. Y. Wang, M. R. Bullock, W. D. Dietrich, R. W. Keane, "Exosome- mediated inflammasome signaling after central nervous system injury," *Journal Neurochemistry*, 136 (S1), pp. 39–48, 2016.
- [10] D. Han, C. Wu, Q. Xiong, L. Zhou, Y. Tian, "Anti-inflammatory mechanism of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in rat model of spinal cord injury," *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71, pp. 1341–1347, 2015.
- [11] H. Vilaça-Faria, A. J. Salgado, F. G. Teixeira, "Mesenchymal stem cells-derived exosomes: a new possible therapeutic strategy for Parkinson's disease?," *Cells*, 8(2),118. doi: 10.3390/cells8020118. PMID: 30717429; PMCID: PMC6406999, 2019.
- [12] T. Katsuda, R. Tsuchiya, N. Kosaka, Y. Yoshioka, K. Takagaki, K. Oki, F. Takeshita, Y. Sakai, M. Kuroda, T. Ochiya, "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes". *Scientific Reports*, 3 (1197), 2013.
- [13] B. Mendes-Pinheiro, S. I. Anjo, B. Manadas, J. D. Da Silva, A. Marote, L. A. Behie, F. G. Teixeira, A.J. Salgado, "Bone marrow mesenchymal stem cells' secretome exerts neuroprotective effects in a parkinson's disease rat model,"

- Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7(294), doi: 10.3389/fbioe.2019.00294, 2019.
- [14] H.X. Chen, F.C. Liang, , P. Gu, B. L. Xu, H. X. Xu, W. T. Wang, J.Y. Hou, D. X. Xie, X. Chai, S.J. An, “Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson’s disease model by inducing autophagy,” *Cell Death Disease*, 11 (288), <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2473-5>, 2020.
 - [15] M.J. Haney, N. L. Klyachko, Y. Zhao, R. Gupta, E. G. Plotnikov, Z. He, T. Patel, A. Piroyona, M. Sokolsky, A. V. Kabanov E. V. Batrakova, 2015. “Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy,” *Journal of Controlled Release*, 207, pp. 18-30, 2015.
 - [16] M. Qu, Q. Lin, L. Huang, Y. Fu, L. Wang, S. He, Y. Fu, S. Yang, Z. Zhang, L. Zhang X. Sun, “Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson’s disease,” *Journal of Controlled Release*, 287, pp. 156-166, 2018.
 - [17] I. A. Shamim, “Neurodegenerative Diseases,” *Advance in Experiment Medicine and Biology*, New York: Springer, 2012.
 - [18] A. Popa-Wagner, D.I. Dumitrascu, B. Capitanescu, E. B. Petcu, R. Surugiu, W. H. Fang, D. A. Dumbrava, “Dietary habits, lifestyle factors and neurodegenerative diseases,” *Neural Regeneration Research*, 15 (3), pp. 394–400, 2020.
 - [19] L. Maitre, J. de Bont, M. Casas, O. Robinson, G. M. Aasvang, L. Agier, S. Andrusaitytė, F Ballester, X. Basagaña, E. Borràs, C. Brochot, M. Bustamante, A. Carracedo, M. de Castro, A. Dedele, D. Donaire-Gonzalez, X. Estivill, J. Evandt, S. Fossati, L. Giorgis—Allemand, et al. “Human Early Life Exposome (HELIX) study: a European population-based exposome cohort,” *BMJ Open*. 8, 2018.
 - [20] G.G Kovacs, G. G. “Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: turning towards precision medicine,” *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 189 <https://doi.org/10.3390/ijms17020189>, 2016.
 - [21] S.S Rao, L.A. Hofmann, A. Shakil, “Parkinson's disease: diagnosis and treatment”, *American Family Physician*, 15(74), 2046-2054. 2006.
 - [22] J. G. Castano, T. Iglesias, J. G. de Yebenes, “Animal Models and the pathogenesis of Parkinson’s disease,” Ed: J. Avila, L. Lucas, F. Hernandez, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, RSC Drug Delivery, pp, 111-140, 2011.
 - [23] M. Goedert, M. G. Spillantini, K, Del Tredici, H. Braak, “100 years of lewy pathology,” *Nature Reviews Neurology*, 9, pp. 13–24. doi: 10.1038/nrneurol.2012.242, 2013.
 - [24] J. M. Fearnley, A.J. Lees, “Ageing and Parkinson’s disease: substantia nigra regional selectivity,” *Brain*, 114 (5), pp. 2283–2301. 1991
 - [25] I. González-Casacuberta, L.D. Juárez-Flores, C. Morén, G. Garrabou, “Bioenergetics and autophagic imbalance in patients-derived cell models of

- Parkinson disease supports systemic dysfunction in neurodegeneration,” *Frontiers Neuroscience*, 13(894), <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00894>, 2019.
- [26] L. V. Kalia, A. E. Lang, “Parkinson Disease in 2015: evolving basic, pathological and clinical concepts in PD.”, *Nature Reviews Neurology*, 12, pp. 65–66, doi: 10.1038/nrneurol.2015.249. 2016.
- [27] D. W. Dickson, “Neuropathology of Parkinson Disease,” *Parkinsonism & Related Disorders*, 46, pp. 30–33, doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033, 2018.
- [28] C.M. Tanner, S.M. Goldman, G.W. Ross, et al. “The disease intersection of susceptibility and exposure: chemical exposures and neurodegenerative disease risk,” *Alzheimers Dement*, 10 (3), pp. 213–25, 2014.
- [29] B. Ritz, A. Ascherio, H. Checkoway, et al. “Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease,” *Archives of Neurology*, 64(7), pp. 990–997, 2007.
- [30] B. Mappin-Kasirer, H. Pan, S. Lewington, J. Kizza, R. Gray, R. Clarke, R. Peto, “Tobacco smoking and the risk of Parkinson disease A 65-year follow-up of 30,000 male British doctors,” *Neurology*, 94 (20), 2020.
- [31] L. Kenborg, K. Rugbjerg, P.C. Lee, et al. “Head injury and risk for Parkinson disease: results from a Danish case-control study,” *Neurology*, 84(11) pp. 1098–1103, 2015.
- [32] P. Gubellini, P. Kachidian, “Animal models of Parkinson's disease: An updated overview,” *Revue Neurologique*, 171, 750-756, 2015.
- [33] H. Deng, P. Wang, J. Jankovic, “The genetics of Parkinson disease,” *Ageing Research Reviews*, 42, pp. 72-85, 10.1016/j.arr.2017.12.007, 2018.
- [34] C. Blauwendraat, M.A. Nalls, A.B. Singleton, “The genetic architecture of Parkinson's disease,” *Lancet Neurology*, 4422, pp. 1-9, 10.1016/s1474-4422(19)30287-x, 2019.
- [35] K. Kalinderi, S. Bostantjopoulou, L. Fidani, “The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects,” *Acta Neurologica Scandinavica*, 134, pp. 314-326, 10.1111/ane.12563, 2016.
- [36] J. M. Y. Teves, V. Bhargava, K. R. Kirwan, M. J. Corenblum, R. Justiniano, G. T. Wondrak, A. Anandhan, A. J. Flores, D. A. Schipper, Z. Khalpey, J. E. Sligh, C. Curiel-Lewandrowski S. J. Sherman, L. Madhavan, “Parkinson's disease skin fibroblasts display signature alterations in growth, redox homeostasis, mitochondrial function, and autophagy,” *Frontiers Neuroscience*, 11(737), doi: 10.3389/fnins.2017.00737, 2017.
- [37] “Parkinson Disease,” www.parkinson.org Erişim Tarihi: 05.09.2021.
- [38] B. Pinter, A. Diem-Zangerl, G. K. Wenning, et al. “Mortality in Parkinson's disease: a 38-year follow-up study,” *Movement Disorders Journal*, 30 (2), pp. 266–9, 2015.
- [39] E.R. Dorsey, T. Sherer, M. S. Okun, B. Bloem, “The emerging evidence of the Parkinson pandemic,” *Journal of Parkinsons Disease*, 8(1), pp. 3–8, 2018.

- [40] M.J. Armstrong, M.S. Okun, "Diagnosis and treatment of Parkinson disease a review," *JAMA*, 323(6), pp. 548-560. doi:10.1001/jama.2019.22360, 2020.
- [41] A. Antonini, A.J. Stoessl, L.S. Kleinman, A.M. Skalicky, T.S. Marshall, K.R. Sail, K. Onuk, P.L.A. Odin, "Developing consensus among movement disorder specialists on clinical indicators for identification and management of advanced Parkinson's disease: a multi-country Delphi-panel approach," *Current Medical Research and Opinion*, 34, pp. 2063-2073, 10.1080/03007995.2018.1502165, 2018.
- [42] J. Timpka, B. Nitu, V. Datieva, P. Odin, A. Antonini, "Device-Aided Treatment Strategies in Advanced Parkinson's Disease," *International Review of Neurobiology*, 132, pp. 453-474, 2017.
- [43] P. Wolf, "The nature and significance of platelet products in human plasma," *British Journal of Haematology*, 13(3), pp. 269–288, 1967.
- [44] S.M. Kim, H.S. Kim, "Engineering of extracellular vesicles as drug delivery vehicles," *Stem cell investigation*, 4, 2017.
- [45] G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, pp. 213–228, 2018.
- [46] M. Tkach, C. Théry, "Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go," *Cell*, 164 (6), pp. 1226-1232, 2016.
- [47] D. Ingato, J.U. Lee, S.L. Sim, Y.L., Kwon, "Good things come in small packages: overcoming challenges to harness extracellular vesicles for therapeutic delivery", *Journal of Controlled Release*, 241, pp. 174-185, 2016.
- [48] R.M. Johnstone, M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, C. Turbide, "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)," *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), pp. 9412–9420, 1987.
- [49] N. P. Hessvik, A. Overbye, A. Brech, M.L. Torgersen, I. S. Jakobsen, K. Sandvig, A. Llorente, "PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy," *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(24), pp. 4717–4737. doi:[10.1007/s00018-016-2309-8](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2309-8), 2016.
- [50] G. Raposo, W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends," *Journal of Cell Biology*, 200(4), pp. 373–383. doi:[10.1083/jcb.201211138](https://doi.org/10.1083/jcb.201211138), 2013.
- [51] J. Skog, T. Wurdinger, S. Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Curry, R. S. Carter, A.N. Krichevsky, X. O. Breakefield, "Glioblastoma microvesicles transport rna and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers," *Nature Cell Biology*, 10, pp. 1470–1476, 2008.
- [52] C. Fröhbeis, D. Fröhlich, E. M. Kramer-Albers, "Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication," *Frontiers in Physiology*, 3 (119), 2012.

- [53] L. Qing, H. Chen, J. Tang, X. Jia, "Exosomes and their microRNA cargo: new players in peripheral nerve regeneration," *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 32(9), pp.765–776, 2018.
- [54] S. Saeedi, S. Israel, C. Nagy, G. Turecki, "The emerging role of exosomes in mental disorders", *Translational Psychiatry*, 9(122), 2019.
- [55] J. Lin, J. Li, B. Huang, J. Liu, X. Chen, X. Z. Wang, "Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis," *The Scientific World Journal*, 657086, 2015.
- [56] S.L Maas, X.O. Breakefield, A.W. Weaver, "Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles," *Trends in Cell Biology*, 27(3), pp. 172–188. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.003, 2017.
- [57] S. Ailawadi, X. Wang, H. Gu, G.C. Fan, "Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease," *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(1), pp. 1–11, 2015.
- [58] L. Barile, T. Moccetti, E. Marban, G. Vassalli, "Roles of exosomes in cardioprotection," *European Heart Journal* 38(18), pp. 1372–1379, 2017.
- [59] J.S. Schorey, Y. Cheng, P.P Singh, V.L. Smith, "Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions," *EMBO Report*, 16 (1), pp. 24–43, 2015.
- [60] C. Villarroja-Beltri, F. Baixauli, C. Gutierrez-Vazquez, F. SanchezMadrid, M. Mittelbrunn, "Sorting it out: regulation of exosome loading," *Seminars Cancer Biology*, 28, pp. 3–13, 2014.
- [61] W.M. Henne, N.J. Buchkovich, S.D. Emr, "The ESCRT pathway," *Developmental Cell*, 21(1), pp. 77-91, 2011.
- [62] C. Raiborg, H. Stenmark, "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins," *Nature*, 458(7237), pp. 445-452, 2009.
- [63] J. H. Hurley, "The ESCRT complexes," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(6), pp. 463–487, 2010.
- [64] J. McCullough, L.A. Colf, W.I. Sundquist, "Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway," *Annual Review of Biochemistry*, 82, pp. 663-692, 2013.
- [65] M. Alonso Y. Adell, S.M. Migliano, D. Teis, "ESCRT-III and Vps4: a dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission," *The FEBS Journal*., 283 (18), pp. 3288-3302, 2016.
- [66] K. Bowers, S. C. Pipe, M. A. Edeling, S. R. Gray, D. J. Owen, P. J. Lehner, J. P. Luzio, "Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII," *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), pp. 5094–5105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508632200>, 2006
- [67] K. Tamai, N. Tanaka, T. Nakano, E. Kakazu, Y. Kondo, J. Inoue, M. Shiina, K. Fukushima, T. Hoshino, K. Sano, Y. Ueno, T. Shimosegawa, K. Sugamura, "Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0

- protein,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3),Npp. 384–390, 2010.
- [68] M. Colombo, C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L.F. Moita, C. Thery, G. Raposo, “Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles,” *Journal of Cell Science*, 126 (24), pp. 5553–5565, 2013.
 - [69] S. Stuffers, C. Sem Wegner, H. Stenmark, A. Brech, “Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs,” *Traffic* 10, pp.925–937, 2009.
 - [70] K. Trajkovic, C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, F. Wieland, P. Schwille, B. Brügger, M. Simons, “Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes,” *Science*, 319 (5867):1244-7,2008.
 - [71] M. V. Airola, Y.A. Hannun, “Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases,” *Handb Exp Pharmacol.* 2013;215:57–76, 2013.
 - [72] B.M. Castro, M. Prieto, L. C. Silva, “Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties,” *Progress in Lipid Research*, 54, pp. 53–67, 2014.
 - [73] H. Matsuo, J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N.S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R. G. Parton, F. Vilbois, J. Gruenberg, “Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization,” *Science*, 303 (5657), pp. 531-534, 2004.
 - [74] I. Nazarenko, S. Rana, A. Baumann, J. McAlear, A. Hellwig, M. Trendelenburg, G. Lochnit, K. T. Preissner, M. Zoller, “Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation,” *Cancer Research*, 70 (4), pp. 1668–1678, 2010.
 - [75] D. Wei, W. Zhan, Y. Gao, L. Huang, R. Gong, W. Wang, R. Zhang, Y. Wu, S. Gao, T. Kang, T. “RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway,” *Cell Research*, 31, pp. 157–177, 2021.
 - [76] S. Mathivanan, C.J. Fahner, G.E. Reid, R.J. Simpson, “ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids,” *Nucleic Acids Research*, 40(1), pp. 1241–4, 2012.
 - [77] D.K. Kim, B. Kang, O.Y. Kim, D.S. Choi, J. Lee, S.R. Kim, G. Go, Y. J. Yoon, J. H. Kim, S.C. Jang, K.S. Park, E.J. Choi, K.P. Kim, D. M. Desiderio, Y.K. Kim, J. Lotvall, D. Hwang, Y.S. Gho, “EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles,” *Journal of Extracell Vesicles*, 2 (20384), 2013.
 - [78] A.V. Vlassov, S. Magdaleno, R. Setterquist, R. Conrad, “Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials,” *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820 (7), pp. 940–8, 2012.

- [80] J.M. Scott, M.J. Imperiale, "Promoter-proximal poly(A) sites are processed efficiently, but the RNA products are unstable in the nucleus," *Molecular and Cellular Biology* 17 (4), pp. 2127-2135, 1997.
- [81] V. Ruvolo, A. K. Gupta, S. Swaminathan, "Epstein-Barr virus SM protein interacts with mRNA in vivo and mediates a gene-specific increase in cytoplasmic mRNA," *Journal of Virology* 75 (13), pp. 6033-6041, 2001.
- [82] J. Scott Butler, "The yin and yang of the exosome," *Trends in Cell Biology*, 12 (2), pp. 90-96, 2002.
- [83] K. Laulagnier, C. Motta, S. Hamdi, S. Roy, F. Fauvelle, J. F. Pageaux, T. Kobayashi, J. P. Salles, B. Perret, C. Bonnerot, M. Record, "Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization," *The Biochemical Journal*, 15,380(Pt 1), pp. 161-71, 2004.
- [84] C. Subra, D. Grand, K. Laulagnier, A. Stella, G. Lambeau, M. Paillasse, P. De Medina, B. Monsarrat, B. Perret, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, M. Record, "Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins," *Journal Lipid Research*, 51(8), pp. 2105-20, 2010.
- [85] A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, H. H. Gerdes, "Nanotubular highways for intercellular organelle transport," *Science*, 13 (303), pp. 1007-1010, 2004.
- [86] N.M. Sherer, W. Mothes, "Cytonemes and tunnelling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis," *Trends Cell Biology*, 18 (9), pp. 414-420, 2008.
- [87] G. Camussi, M. C. Deregibus, S. Bruno, V. Cantaluppi, L. Biancone, "Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication," *Kidney International*, 78(9), pp. 838-48, 2010.
- [88] K. Nazimek, K. Bryniarski, M. Santocki, W. Ptak, "Exosomes as mediators of intercellular communication: clinical implications," *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 125(5), pp.370-80, 2015.
- [89] C. Harding, J. Heuser, P. Stahl, "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes," *The Journal of Cell Biology*, 97 (2), pp. 329-339, 1983.
- [90] B. T. Pan, K. Teng, C. Wu, M. Adam, R. M. Johnstone, "Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes," *The Journal of Cell Biology*, 101 (3), pp.942-948, 1985.
- [91] G. Raposo, H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, H. J. Geuze, "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles," *The Journal of experimental medicine*, 183 (3), pp. 1161-1172, 1996.
- [92] J. Wolfers, A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Théry, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, L. Zitvogel, "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming," *Nature Medicine*, 7(3), pp. 297-303, 2001.

- [93] M. Simons, G. Raposo, "Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication," *Current Opinion In Cell Biology*, 21(4), pp. 575–81, 2009.
- [94] A. Khalyfa, D. Gozal, "Exosomal miRNAs as potential biomarkers of cardiovascular risk in children," *Journal of Translational Medicine*, 10(12), 162, 2014.
- [95] C. Corrado, S. Raimondo, A. Chiesi, F. Ciccia, G. de Leo, R. Alessandro, "Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: Basic science and clinical applications," *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), pp. 5338-66, 2013.
- [96] Z. Khatun, A. Bhat, S. Sharma, A. Sharma, "Elucidating diversity of exosomes: biophysical and molecular characterization methods," *Nanomedicine*, 11(17), pp. 2359–2377, 2016.
- [97] H.R. Garrett, C.M. Grisham, "Biochemistry," 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, ISBN-13: 978-1-133-10629-6, 2013.
- [98] J. Webber, R. Steadman, M.D. Mason, Z. Tabi, A. Clayton, "Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation," *Cancer Research*, 70(23), pp. 9621–30, 2010.
- [99] T. Yamashita, Y. Takahashi, M. Nishikawa, Y. Takakura, "Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 98, pp. 1–8, 2016.
- [100] 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," *Scientific reports*, 24(6), 23550, 2016.
- [101] J. Ko, E. Carpenter, D. Issadore, "Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices," *Analyst*, 141(2), pp. 450-460, 2016.
- [102] M. Y. Konoshenko, E. A. Lekchnov, A. V. Vlassov, P. P. Laktionov, "Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends," *BioMed Research International*, 2018 (8545347), 2018.
- [103] A. M. Booth, Y. Fang, J. K. Fallon, J. M. Yang, J. E. Hildreth, S. J. Gould, "Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane," *The Journal of Cell Biology*, 172(6), pp. 923-35, 2006.
- [104] M. Grapp, A. Wrede, M. Schweizer, S. Hüwel, H.J. Galla, N. Snaidero, J. Gärtner, "Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma," *Nature Communications*, 4, 2123, 2013.
- [105] C. Gardiner, D. Di 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, 32945, 2016.

- [106] J. F. Quintana, B. L. Makepeace, S.A. Babayan, A. Ivens, K. M. Pfarr, M. Blaxter, V. N. Tanya, "Extracellular *Onchocerca*-derived small RNAs in host nodules and blood," *Parasit Vectors*. 8, 58, 2015.
- [107] T. Baranyai, K. Herczeg, Z. Onódi, I. Voszka, K. Módos, N. Marton, G. Nagy, I. Mäger, M. J. Wood, S. El Andaloussi, Z. Pálkás, V. Kumar, P. Nagy, A. Kittel, E. I. Buzás, P. Ferdinandy, Z. Giricz, "Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods," *PloS One*, 10 (12), e0145686, 2015.
- [108] D. Kang, S. Oh, S. M. Ahn, B. H. Lee, M. H. Moon, "Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation, nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Journal Proteome Research*, 7(8), pp. 3475-80, 2008.
- [109] Bioo Scientific Corporation, ExoMir™ Kit, 2016. <http://www.biooscientific.com/exosome-analysis/exomir-kit>. Erişim Tarihi: 05.02.2022.
- [110] A. Cheruvanky, H. Zhou, T. Pisitkun, J.B. Kopp, M.A. Knepper, P.S. Yuen, R.A. Star, "Rapid isolation of urinary exosome biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator," *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 292 (5), pp. 1657-61, 2007.
- [111] E. Zeringer, T. Barta, M. Li, A.V. Vlassov, "Strategies for isolation of exosomes," *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(4), pp. 319-23 2015.
- [112] Y. Feng, W. Huang, M. Wani, X. Yu, M. Ashraf, Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. *PloS One*, 18, 9(2), e88685, 2014.
- [113] R.C. Lai, F. Arslan, M. M. Lee, N. S. K. Sze, A. Choo, T. S. Chen, M. Salto-Tellez, L. Timmers, C. N. Lee, R. M. El Oakley, G. Pasterkamp, D. P. V. de Kleijn, S. K. Lim, "Exosome secreted by MKH reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3), pp. 214-22, 2010.
- [114] R. Vaidyanathan, M. Naghibosadat, S. Rauf, D. Korbie, L. G. Carrascosa, M. J. Shiddiky, M. Trau, "Detecting Exosomes Specifically: A Multiplexed Device Based on Alternating Current Electrohydrodynamic Induced Nanoshearing," *Analytical Chemistry*, 86(22), pp. 11125-32, 2014.
- [115] C. Thery, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids," *Current Protocols In Cell Biology*, 3 (22), 206.
- [116] N. Zarovni, A. Corrado, P. Guazzi, D. Zocco, E. Laria, G. Radano, J. Muhhin, C. Fondelli, J. Gavrilov, A. Chiesa, "Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches," *Methods*, 87, pp. 46-58, 2015.
- [117] G. D. Lewis, T. G. Metcalf, "Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples," *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), pp. 1983-8, 1988.

- [118] E. V. Batrakova, M. S. Kim, "Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery," *Journal Control Release*, 219, pp. 396–405, 2015.
- [119] M. A. Rider, S. N. Hurwitz, D. G. Meckes Jr., "ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles," *Scientific Reports*, 6(23978), 2016.
- [120] K. Lee, H. Shao, R. Weissleder, H. Lee, "Acoustic purification of extracellular microvesicles. *ACS Nano*, 9(3), pp. 2321-7, 2015.
- [121] Z. Wang, H. J. Wu, D. Fine, J. Schmulen, Y. Hu, B. Godin, X. Liu, "Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles." *Lab on the Chip*, 13(15), pp.2879–2882, 2013.
- [122] C. Chen, J. Skog, C. H. Hsu, R. T. Lessard, L. Balaj, T. Wurdinger, B.S. Carter, X.O. Breakefield, M. Toner, D. Irimia, "Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab on the Chip*, 10(4):505-11, 2010.
- [123] J. T. Edward, "Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation," *Journal of Chemical Education*, 47(4), 1970.
- [124] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?," *Journal Control Release*, 235, pp. 337-351, 2016.
- [125] P. Harrison, R. Dragovic, A. Albanyan, A.S. Lawrie, M. Murphy, I. Sargent, "Application of dynamic light scattering to the measurement of microparticles," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7 (Suppl 2), 2009.
- [126] C. Gercel-Taylor, S. Atay, R. H. Tullis, M. Kesimer, D. D. Taylor, "Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients," *Analytical Biochemistry*, 428(1), pp. 44-53, 2012.
- [127] B. Giebel, C. Helmbrecht, "Methods to Analyze EVs ," *Methods in Molecular Biology*, 1545, pp. 1-20, 2017.
- [128] N. Karimi, A. Cvjetkovic, S.C. Jang, R. Crescitelli, M.A. Hosseinpour Feizi, R. Nieuwland, J. Lötvall, C. Lässer, "Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins," *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(15), pp. 2873-2886, 2018.
- [129] S.T.Y. Chuo, J.C.Y. Chien, C.P.K. Lai, "Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods," *Journal of biomedical science*, 25 (91), pp. 1-10, 2018.
- [130] L.G. Rikkert, R. Nieuwland, L.W.M.M. Terstappen, F.A.W. "Coumans Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent," *Journal Extracellular Vesicles*, 8(1), 1555419, 2019.
- [131] A. F. Orozco, D. E. Lewis, "Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma," 77(6), pp. 502-14, 2010.

- [132] E. van der Pol, M. J., van Gemert, A. Sturk, R. Nieuwland, T.G. van Leeuwen, "Single versus swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(5):919-30, 2012.
- [133] P. Harrison, C. Gardiner, "Invisible vesicles swarm within the iceberg," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10, pp. 916– 18, 2012.
- [134] D. Kozak, W. Anderson, R. Vogel, S. Chen, F. Antaw, M. Trau, "Simultaneous size and ζ -potential measurements of individual nanoparticles in dispersion using size-tunable pore sensors," *ACS Nano*, 6(8), pp. 6990-7, 2012.
- [135] S. L. Maas, J. De Vrij, M. L. Broekman, "Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing," *Journal of Visualized Experiments*, 19(92), e51623, 2014.
- [136] D.L. Rupert, C. Lasser, M. Eldh, S. Block, V.P. Zhdanov, J.O. Lotvall, M. Bally, F. Hook, Determination of exosome concentration in solution using surface plasmon resonance spectroscopy. *Anal Chem.*, 86(12), pp. 5929–36. 2014.
- [137] A.A. Farooqi, N. N. Desai, M.Z. Qureshi, D.R.N. Librelotto, M.L. Gasparri, A. Bishayee A. S. M.Nabavi, V. Curti, M. Daglia, "Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds," *Biotechnology Advances*, 36(1), pp. 328-334 2018.
- [138] C. Kilchert, S. Wittmann, L. Vasiljeva, "The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 17(4), pp. 227-39, 2016.
- [139] P. H. L Tran, T. Wang, W. Yin, T.T.D. Tran, H. T. Barua, Y. Zhang, S.B. Midge, Tuong 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," *International Journal of Pharmaceutics*, 566, pp. 697–707, 2019.
- [140] F. M. Barros, F. Carneiro, J.C. Machado, S.A. Melo, Exosomes and immune response in cancer: friends or foes?," *Frontiers in Immunology*, 9, 730, 2018.
- [141] T. Zhao, F. Sun, J. Liu, T. Ding, J. She, F. Mao, W. Xu, H., Qian, Y. Yan, "Emerging role of mesenchymal stem cell-derived exosomes in regenerative medicine," *Current Stem Cell Research & Therapy*, 14 (6), pp. 482–9, 2019.
- [142] T. Lener, M. Gimona, L. Aigner, V. Borger, E. Buzas, G. Camussi, et al., "Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper," *Journal Extracellular Vesicles*, 4, 30087, 2015.
- [143] J.M. Street, E.H. Koritzinsky, D.M. Glispie, R.A. Star, P.S. Yuen, "Urine exosomes: an emerging trove of biomarkers," *Advances in Clinical Chemistry*, 78, pp. 103-22, 2017.
- [144] Y. Yagi, T. Ohkubo, H. Kawaji, A. Machida, H. Miyata, S. Goda, S. Roy, Y. Hayashizaki, H. Suzuki, T. Yokota, "Next-generation sequencing-based

- small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes. *Neuroscience letters*, 636, pp. 48–57, 2017.
- [145] W. Qin, Y. Tsukasaki, S. Dasgupta, N. Mukhopadhyay, M. Ikebe, E.R. Sauter, “Exosomes in human breast milk promote EMT,” *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22(17), pp. 4517–24, 2016.
 - [146] T. Machida, T. Tomofuji, D. Ekuni, T. Maruyama, T. Yoneda, Y. Kawabata, H. Mizuno, H. Miyai, M. Kunitomo, M. Morita, “MicroRNAs in salivary exosome as potential biomarkers of aging,” *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), pp. 21294–309, 2015.
 - [147] S. Keller, C. Rupp, A. Stoeck, S. Runz, M. Fogel, S. Lugert, H.D. Hager, M.S. Abdel-Bakky, P. Gutwein, P. Altevogt, “CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid,” *Kidney International*, 72 (9), pp. 1095-1102, 2007.
 - [148] M.N. Madison, P. H. Jones, C. M. Okeoma, “Exosomes in human semen restrict HIV-1 transmission by vaginal cells and block intravaginal replication of LP-BM5 murine AIDS virus complex,” *Virology*, 482:189–201, 2015.
 - [149] H. Wang, L. Hou, A. Li, Y. Duan, H. Gao, X. Song, “Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma,” *BioMed Research International*, 2014, 864894, 2014.
 - [150] S. Dijkstra, I. L. Birker, F.P. Smit, G.H. Leyten, T.M. de Reijke, I.M. van Oort, P.F. Mulders, S.A. Jannink, J.A. Schalken, “Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes,” *The Journal of Urology*, 191(4), pp. 1132-8, 2014.
 - [151] L. Camacho, P. Guerrero, D. Marchetti, “MicroRNA and protein profiling of brain metastasis competent cell-derived exosomes,” *PLoS One*, 16, 2013.
 - [152] W.X. Wang, Q. Huang, Y. Hu, A.J. Stromberg, P.T. Nelson, “Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer’s disease human temporal cortex: White matter versus gray matter,” *Acta Neuropathologica*, 121, pp. 193–205, 2011.
 - [153] X. Chao, J. Lu, Z. Zhao, M. Li, T. Lu, X. An, L. Xue, “MicroRNA biomarkers of Parkinson’s disease in serum exosome-like microvesicles,” *Neuroscience Letters* 644, pp. 94-99, 2017.
 - [154] T. Tsunemi, K. Hamada, D. Krainc, “ATP13A2/PARK9 regulates secretion of exosomes and α -synuclein,” *Journal of Neuroscience*, 34 (46), pp. 15281-15287, 2014.
 - [155] S.M. Kong, B.K. Chan, J.S. Park, K.L. Hill, J.B. Aitken, L. Cottle, H. Farghaian, A.R. Cole, P.A. Lay, C.M. Sue, A.A. Cooper, “Parkinson’s disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes α -synuclein externalization via exosomes,” *Human Molecular Genetics*, 23(11), pp. 2816–2833, 2014.

- [156] P.R. Tomlinson, Y. Zheng, R. Fischer, R. Heidasch, C. Gardiner, S. Evetts, M. Hu, R. Wade-Martins, M.R. Turner, J. Morris, et al. "Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease," *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(4), pp.353–361, 2015.
- [157] A. Geiger, A. Walker, E. Nissen, "Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(2), pp.303-309, 2015.
- [158] R.C. Lai, F. Arslan, M.M. Lee, N.S.K. Sze, A. Choo, T.S. Chen, et al. "Exosome secreted by MKH reduces myocardial ischemia/reperfusion injury," *Stem Cell Research*, 4 (3), pp. 214-222, 2010.
- [159] G. Hu, Q. Li, X. Niu, B. Hu, J. Liu, S. Zhou, et al. "Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice," *Stem Cell Research&Therapy*, 6 (10), pp. 1-15, 2015.
- [160] C.Y. Tan, R.C. Lai, W. Wong, Y.Y. Dan, S.-K. Lim, H.K. Ho, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models," *Stem Cell Research&Therapy*, 5 (76), pp. 1-14, 2014.
- [161] B. Yu, H. Shao, C. Su, Y. Jiang, X. Chen, L. Bai, L. Zhang, L. Qu, X. Zhang, X. Li. "Exosomes derived from MKHs ameliorate retinal laser injury partially by inhibition of MCP-1," *Scientific Reports*, 6(34562), 2016.
- [162] X. Qi, J. Zhang, H. Yuan, Z. Xu, Q. Li, X. Niu, B. Hu, Y. Wang, X. Li. "Exosomes secreted by human-Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis osteoporotic rats," *International Journal of Biological Sciences*, 12(7), pp. 836–849, 2016.
- [163] S. Zhang, W.C. Chu, R.C. Lai, S.K. Lim, J.H.P. Hui, W.S. Toh, "Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration," *Osteoarthritis Cartilage*, 24 (12), pp. 2135-2140, 2016.
- [164] A. Aryani, B. Denecke, "Exosomes as a Nanodelivery System: a Key to the Future of Neuromedicine?," *Molecular Neurobiology*, 53(2), pp. 818–834, 2016.
- [165] D. Ha, N. Yang, V. Nadithe, "Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges," *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), pp. 287-296, 2016.
- [166] N. Chopra, B.D. Arya, N. Jain, P. Yadav, S. Wajid, S.P. Singh, S. Choudhury, "Biophysical characterization and drug delivery potential of exosomes from human Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells," *ACS Omega*, 4(8), pp. 13143–13152, 2019.
- [167] A. Montecalvo, A.T. Larregina, W.J. Shufesky, D.B. Stolz, M.L. Sullivan, J.M. Karlsson, C.J. Baty, G.A. Gibson, G. Erdos, Z. Wang, J. Milosevic, O.A. Tkacheva, S.J. Divito, R. Jordan, J. Lyons-Weiler, S.C. Watkins, A.E. Morelli, 2012. "Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes," *Blood*, 119(3), pp. 756-66, 2012.

- [168] M. Trivedi, M. Talekar, P. Shah, Q. Ouyang, M. Amiji, "Modification of tumor cell exosome content by transfection with wt-p53 and microRNA-125b expressing plasmid DNA and its effect on macrophage polarization," *Oncogenesis*, 5 (8), 2016.
- [169] N. Ran, X. Gao, X. Dong, J. Li, C..Lin, M. Geng, H. Yin, "Effects of exosome-mediated delivery of myostatin propeptide on functional recovery of mdx mice," *Biomaterials*, 236, 119826, 2020.
- [170] L. Pascucci, V. Cocce, A. Bonomi, D. Ami, P. Ceccarelli, "Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery," *Journal Control Release*, 192, pp. 262-270, 2014.
- [171] H. Saari, E. Lázaro-Ibáñez, T. Viitala, E. Vuorimaa-Laukkanen, P. Siljander, M. Yliperttula, "Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells," *Journal Control Release*, 220, pp. 727-737, 2015.
- [172] T. Yang, P. Martin, B. Fogarty, A. Brown, K. Schurman, R. Phipps, V. P. Yin, P. Lockman, S. Bai, "Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio rerio," *Pharm. Res.*, 32 (6), pp. 2003-2014, 2015.
- [173] I. Podolak, A. Galanty, D. Sobolewska, "Saponins as cytotoxic agents: a review," *Phytochemistry reviews*, 9(3), pp. 425–74, 2010.
- [174] G. Fuhrmann, A. Serio, M. Mazo, R. Nair, M.M. Stevens, "Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins," *Journal Control Release*, 205, pp. 35–44, 2015.
- [175] M.S. Kim, M.J. Haney, Y. Zhao, V. Mahajan, I. Deygen, N.L. Klyachko, et al. "Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(3), pp. 655–64, 2016.
- [176] Y. J. Li, J. Wu, J. M. Wang, X. B. Hu, J. X. Cai, D. X. Xiang, "Gemcitabine loaded autologous exosomes for effective and safe chemotherapy of pancreatic cancer," *Acta Biomaterials*, 101, pp. 519-530, 2020.
- [177] T. Y. Tsong, "Electroporation of cell membranes," E. Neumann, A.E. Sowers, C.A. Jordan (Eds.), *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, Springer, 401(28), pp. 149-163, 1989.
- [178] J. Wahlgren, T.D. Karlson, M. Brisslert, F.V. Sani, E. Telemo, P. Sunnerhagen, H. Valadi, "Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes." *Nucleic Acids Research*, 40(17), 2012.
- [179] S.A.A. Kooijmans, S. Stremersch, K. Braeckmans, S. Smedt, A. Hendrix, M.J.A. Wood, R.M Schiffelers, K. Raemdonck, P. Vader, "Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles," *Journal Control Release*, 172 (1), pp. 229-238, 2013.

- [180] Y.T. Sato, K. Umezaki, S. Sawada, S. Mukai, Y. Sasaki, N. Harada, H. Shiku, K. Akiyoshi, "Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes," *Science Reports*, 6: 21933, 2016.
- [181] M.N. Oskouie, N.S.A. Moghaddam, A.E. Butler, P. Zamani, A. Sahebkar "Therapeutic use of curcumin-encapsulated and curcumin-primed exosomes," *Journal of Cellular Physiology*, 234 (6), 2019.
- [182] A. Allahverdiyev, "Basic Principles of Somatic and Stem Cell Culture Systems, "1st Edition. Nobel Medicine Bookstore, Istanbul, 2018.
- [183] M.R. Alison, R. Poulson, R. Jeffery, A.P. Dhillon, A. Quaglia, J. Jacob, M. Novelli, G. Prentice, J. Williamson, N.A. Wright, "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells", *Nature*, 406(6793), 257 2000.
- [184] I. Mastrolia, E.M. Foppiani, A. Murgia, O. Candini, A.V. Samarelli, G. Grisendi, E. Veronesi, E.M. Horwitz, M. Dominici, "Concise Review: challenges in clinical development of mesenchymal stromal/stem cells", *Stem Cells Translational Medicine*, 8 (11), pp. 1135–1148, 2019.
- [185] S. Bajada, P.E. Harrison, B.A. Ashton, V.N. Cassar-Pullicino, N. Ashammakhi, J.B. Richardson "Successful treatment of refractory tibial nonunion using calcium sulphate and bone marrow stromal cell implantation," *J Bone Joint Surg Br*, 89, pp. 1382-1386, 2007.
- [186] Z.X. Zhang, L.X. Guan, K. Zhang, Q. Zhang, L.J. Dai, "A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury," *Cytotherapy*, 10, pp. 134-139, 2008.
- [187] O.Y. Bang, J.S. Lee, P.H. Lee, G. Lee, "Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients," *Annals of Neurology*, 57, pp. 874-882, 2005.
- [188] X. W., Zhang X., Qian H., Z. W., Sun X., H. J., et al. "Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro," *Exp Biol Med (Maywood)*, 229 (7), pp. 623-631, 2004.
- [189] O.D.G. Katritsis, P.A. Sotiropoulou, E. Karvouni, I. Karabinos, S. Korovesis, S.A. Perez, et al. "Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium," *Catheter Cardiovasc Interv*, 65, pp. 321-329, 2005.
- [190] C. Han, X. Sun, L. Liu, H. Jiang, Y. Shen, X. Xu, J. Li, G. Zhang, J. Huang, Z. Lin, N. Xiong, "Exosomes and their therapeutic potentials of stem cells," *Stem cells international*, 2016, 7653489, 2016.
- [191] V.T. Nooshabadi, S. Mardpour, A. Yousefi-Ahmadipour, A. Allahverdi, M. Izadpanah, F. Daneshimehr, J. Ai, H.R. Banafshe, and S. Ebrahimi-Barough, "The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine," *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(10), pp.8048-8073, 2018.
- [192] M. Mendt, K. Rezvani, E. Shpall, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use," *Bone Marrow Transplantation*, 54(2), pp.789-792, 2019.

- [193] R.W.Y. Yeo, R. C. Lai, B. Zhang, S.S. Tan, Y. Yin, B. J. Teh, S. K. Lim, "Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), pp. 336-41, 2013.
- [194] M.C. Deregibus, V. Cantaluppi, R. Calogero, M. Lo Iacono, C. Tetta, L. Biancone, S. Bruno, B. Bussolati, G. Camussi, "Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA," *Blood*, 110 (7), pp. 2440-2448, 2007.
- [195] H. Xin, Y. Li Y., B. Buller, M. Katakowski, Y. Zhang, X. Wang, X. Shang, Z. Gang, M. Chopp, "Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth," *Stem Cells*, 30 (7), pp. 1556-1564, 2012.
- [196] H. Xin, Y. Li, Z. Liu, X. Wang, X. Shang, Y. Cui, Z. G. Zhang, M. Chopp, "MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles," *Stem Cells*, 31 (12), pp. 2737-2746, 2013.
- [197] "Biomaterials," *Nature Research*; Springer, <https://www.nature.com/subjects/biomaterials>, Erişim Tarihi: 05-01-2021.
- [198] B.M. Holzapfel, J.C. Reichert, J.-T. Schantz, U. Gbureck, L. Rackwitz, U. Nöth, F. Jakob, M. Rudert, J. Groll, D.W. Hutmacher, "How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view," *Advance Drug Delivery Reviews*, 65 (4), pp. 581–603, 2013.
- [199] R. O. Hynes, "The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils," *Science*, 326(5957), pp. 1216-9 2009.
- [200] F. Guilak, D. M. Cohen, B. Estes, J. M. Gimble, W. Liedtke, C.S. Chen, "Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix," *Cell Stem Cell*, 5(1), pp. 17-26, 2009.
- [201] Y. Hao, W. Zhao, L. Zhang, X. Zeng, Z. Sun, D. Zhang, P. Shen, Z. Li, Y. Han, P. Li, Q. Zhou, "Bio-multifunctional alginate/ chitosan/fucoidan sponges with enhanced angiogenesis and hairfollicle regeneration for promoting full-thickness wound healing," *Materials & Design*, 193, 108863, 2020.
- [202] H. Baharvand, S.M., Hashemi, S.K. Ashtiani, A. Farrokhi, "Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro," *The International Journal of Developmental Biology*, 50, pp. 645–652, 2006.
- [203] E. Knight, S. Przyborski, "Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro," *Journal of Anatomy*, 227, pp. 746–756, 2015.
- [204] K.P. Xu, X.F. Li, F. S.X. Yu, "Corneal organ culture model for assessing epithelial responses to surfactants," *Toxicological Science*, 58 (2), pp. 306–314, 2000.

- [205] D.S. Benoit, M.P. Schwartz, A.R. Durney, K.S. Anseth, "Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells," *Nature Materials*, 7, pp. 816–823, 2008.
- [206] C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, "The extracellular matrix at a glance," *Journal of Cell Science*, 123(24), pp. 4195–4200, 2010.
- [207] M. Imaninezhad, L. Hill, G. Kolar, K. Vogt, S.P. Zustiak, "Templated macroporous polyethylene glycol hydrogels for spheroid and aggregate cell culture," *Bioconjugate Chemistry*, 30 (1), 34–46, 2019.
- [208] J.J. Schmidt, J. Rowley, H.J. Kong, "Hydrogels used for cell-based drug delivery," *Journal of Biomedical Materials Research A*, 87, pp. 1113–1122, 2008.
- [209] M. Sepantafar, R. Maheronnaghsh, H. Mohammadi, F. Radmanesh, M.M. Hasani-Sadrabadi, M. Ebrahimi, H. Baharvand, "Engineered hydrogels in cancer therapy and diagnosis," *Trends Biotechnology*, 35(11), pp.1074–1087, 2017.
- [210] J. Lou, R. Stowers, S. Nam, Y. Xia, O. Chaudhuri, "Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture," *Biomaterials*, 154, pp.213–222, 2018.
- [211] F. Ullah, F. Javed, M.R Zakaria, D.N. Jamila, R. Khattak, A. Khan, H.M. Akil, "Determining the Molecular-weight and interfacial properties of chitosan built nanohydrogel for controlled drug delivery applications," *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 9, pp. 4452–4457, 2019.
- [212] S.H. Park, K. Kim, J.H Lim, S.J. Lee, "Selective lithium and magnesium adsorption by phosphonate metal-organic framework-incorporated alginate hydrogel inspired from lithium adsorption characteristics of brown algae," *Separation and Purification Technology*, 212, pp. 611–618, 2019.
- [213] Y. Zhao, M. Li, B. Liu, J. Xiang Z. Cui, X. Qu, D. Qiu, Y. Tian, Z. Yang, "Ultra-tough injectable cytocompatible hydrogel for 3D cell culture and cartilage repair," *J. Mater. Chem. B*, 6, pp. 1351–1358, 2018.
- [214] M.F. Passos, N.M.S. Carvalho, A.A. Rodrigues, V.P. Bavaresco, A.L. Jardini, M.R.W. Maciel, R.M. Filho, "PHEMA hydrogels obtained by infrared radiation for cartilage tissue engineering," *I International Journal of Chemical Engineering*, 4249581, 2019.
- [215] N.C. Hunt, D. Hallam, A. Karimi, C.B. Mellough, J. Chen, D.H.W. Steel, M. Lako, "3D culture of human pluripotent stem cells in RGD-alginate hydrogel improves retinal tissue development," *Acta Biomaterials*, 49, pp. 329–343, 2017.
- [216] G. Hochleitner, F. Chen, C. Blum, P.D. Dalton, B. Amsden, J. Groll, "Melt electrowriting below the critical translation speed to fabricate crimped elastomer scaffolds with non-linear extension behaviour mimicking that of ligaments and tendons," *Acta Biomaterials*, 72, pp. 110–120, 2018.

- [217] M. Xie, Z. Wang, X. Wan, J. Weng, M. Tu, J. Mei, Z. Wang, X. Du, L. Wang, C. Chen, "Crosslinking effects of branched PEG on decellularized lungs of rats for tissue engineering," *J. Biomater. Appl.*, 34, pp. 965–974, 2019.
- [218] C. Zhao, Y. Li, G. Peng, X. Lei, G. Zhang, Y. Gao, "Decellularized liver matrix-modified chitosan fibrous scaffold as a substrate for C3A hepatocyte culture," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 31, pp. 1041–1056, 2020.
- [219] D.A. Taylor, P.-F. Lee, Y. Barac, C. Hochman-Mendez, L.C. Sampaio, "Decellularization of whole hearts for cardiac regeneration," *Emerg. Technol. Heart Dis.*, 1, pp. 291–310, 2020.
- [220] A. Acikgöz, S. Giri, M.G. Cho, A. Bader, "Morphological and functional analysis of hepatocyte spheroids generated on poly-hema-treated surfaces under the influence of fetal calf serum and nonparenchymal cells," *Biomolecules*, 3(1), pp. 242–269, 2013.
- [221] Z. Cesarz, K. Tamama, "Spheroid culture of mesenchymal stem cells," *Stem Cells International*, 2016, 9176357, 2016.
- [222] B. Yavuz, "Klorojenik asidin insan servikal kanser hücreleri (hela) üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması," *Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye*, 2016.
- [223] F. Yu, P. Li, S. Du, K.W. Lui, Y. Lin, L. Chen, Q. Ren, J. Wang, J. Mei, J. Xiao, J. Zhu, "Olfactory ensheathing cells seeded decellularized scaffold promotes axonal regeneration in spinal cord injury rats," *Journal of Biomedical Materials Research*, pp. 1–9, 2020.
- [224] C. Coughlan, K.D. Bruce, O. Burgy, T.D. Boyd, J.E.G. Perez, V. Adame, P. Anton, B.M. Bettcher, H.J. Chial, M. Königshoff, E.V.Y. Hsieh, M. Graner, H. Potter, "Exosome isolation by ultracentrifugation and precipitation and techniques for downstream analyses." *Current Protocols*, 110(88), 2020.
- [225] R. T. Branquinho, V. C. F. Mosqueira, E. K. Kano, J. de Souza, D. D. R. Dorim, D. A. Saúde-Guimarães, M. de Lana, "HPLC-DAD and UV-spectrophotometry for the determination of lychnopholide in nanocapsule dosage form: Validation and application to release kinetic study," *Journal of Chromatographic Science*, 52 (1), pp.19-26, 2014.
- [226] I. Karagöz Kutlutürk, "Retina hastaliklari tedavisinde kullanilmak üzere aflibercept temelli nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve etkinliğinin in vitro incelenmesi," *Yildiz Technical University Institute of Natural Sciences*, 2021.
- [227] R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock, L. Yang, "Threedimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors," *Assay and drug development technologies*, 12(4), pp. 207-218, 2014.
- [228] V. van Duinen, S.J. Trietsch, J. Joore, P. Vulto, T. Hankemeier, "Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models," *Current opinion in biotechnology*, 35, pp. 118- 126, 2015.

- [229] A. P. Zorba Yildiz, H. Darici, B. Yavuz, E.S. Abamor, C Ozdemir, M. E. Yasin, M.Bagirova, A. Allahverdiyev, E. Karaoz, "Preparation and characterization of graphene-based 3D biohybrid hydrogel bioink for peripheral neuroengineering," *J. Vis. Exp.*, e63622, 2022.
- [230] Z. Bacsik, J. Mink, G. Keresztury, "FTIR spectroscopy of the atmosphere. i. principles and methods," *Applied Spectroscopy Reviews*, 39(3), pp. 295-363, 2007.
- [231] P. Chen, L. Zheng, Y. Wang, M. Tao, Z. Xie, C. Xia, C. Gu, J. Chen, P. Qiu, S. Mei, L. Ning, Y. Shi, C. Fang, S. Fan, X. Lin, "Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration," *Theranostics*, 9(9), pp. 2439–2459, 2019.
- [232] Y.T. Cheung, W.K. Lau, M.S. Yu, C.S. Lai, S.C. Yeung, K.F. So, R. C.-C. Chang, "Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research," *Neurotoxicology*, 30, pp. 127-135, 2009.
- [233] A.A. Rizvanov, M.E. Yalvac, A.K. Shafigullina, I. Salafutdinov, N.L. Blatt, F. Sahin, A.P. Kiyasov, A. Palotas, "Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuro-blastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: A novel system for modeling cancer cell micro-environment," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2 (76), pp. 253-259, 2010.
- [234] J.M. Huber, A. Amann, S. Koeck, E. Lorenz, J.M. Kelm, P. Obexer, H. Zwierzina, G. Gamerith, , "Evaluation of assays for drug efficacy in a three-dimensional model of the lung," *J Cancer Res Clin Oncol*, 142, pp. 1955-1966, 2016.
- [235] S.A. Jagmag, N. Tripathi, S.D. Shukla, S. Maiti, S. Khurana, "Evaluation of models of Parkinson's disease," *Frontiers in Neuroscience*, 9(503), 2016.
- [236] J. Boix, T. Padel, G. Paul, "A partial lesion model of Parkinson's disease in mice—characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion." *Behav Brain Res*, 284, pp.196–206, 2015.
- [237] S.K. Bhattamisra, A.T. Shak, X.L. Xi, X.L., Safian H.N., et al. "Nose to brain delivery of rotigotine loaded chitosan nanoparticles in human SH-SY5Y neuroblastoma cells and animal model of Parkinson's disease," *International Journal of Pharmaceutics*, 579119148, 2020.
- [238] R.W. Sabnis, "Handbook of biological dyes and stains: Synthesis and industrial applications," Wiley, ISBN:9780470586242, 2010.
- [239] I. Arganda-Carreras, V. Kaynig, C. Rueden, K. W. Eliceiri, J. Schindelin, A. Cardona, H. S. Seung, "Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification," *Bioinformatics*, 33 (15), pp. 2424–2426, 2017.
- [240] O. Avwenagha, G. Campbell, M.M. Bird, "Distribution of GAP-43, beta-III tubulin and F-actin in developing and regenerating axons and their growth

- cones in vitro, following neurotrophin treatment,” *J Neurocytol*;32, pp. 1077-89, 2003
- [241] F. Gillardon, “Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Phosphorylates Brain Tubulin-Beta Isoforms and Modulates Microtubule Stability—A Point of Convergence in Parkinsonian Neurodegeneration?,” *J. Neurochem.*, 110, pp. 1514–1522, 2009.
- [242] A. Abeliovich, F. M. Beal, “Parkinsonism genes: culprits and clue,” *J. Neurochem.* 99, pp. 1062– 1072, 2006.
- [243] S.A. Othman, C.F. Soon, F. Ma, K.S. Tee, G.P. Lim, M. Morsin, M.K. Ahmad, A.I. Abdulmageed, S.C. Cheong, “Alginate-gelatin bioink for bioprinting of hela spheroids in alginate-gelatin hexagon shaped scaffolds” *Polymer Bulletin*, 567(1), 2020.
- [244] Jardine GJ , Holiman JD , Stoeger CG , et al . Imaging and quantification of endothelial cell loss in eye bank prepared DMEK grafts using trainable segmentation software. *Curr Eye Res* 2014;39:894–901.doi:10.3109/02713683.2014.887120
- [245] L.A. Mulcahy, R.C. Pink, D.R. Carter, “Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake,” *Journal of Extracell Vesicles*. 3, 2014.
- [246] S.A. Kooijmans, P. Vader, S.M. van Dommelen, W.W. van Solinge, R.M. Schiffelers, “Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems,” *International Journal of Nanomedicine*, 7 (1), pp. 1525–1541, 2012.
- [247] Z. Yuan, K.K. Kolluri, K.H. Gowers, S.M. Janes, “Trail delivery by MKH-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy,” *Journal Extracell Vesicles*, 6 (1), 1265291, 2017.
- [248] A. Kalani, P.K. Kamat, P. Chaturvedi, S.C. Tyagi, N. Tyagi, “Curcumin-primed exosomes mitigate endothelial cell dysfunction during hyperhomocysteinemia,” *Life Sciences*. 107 (1-2), pp. 1–7, 2014.
- [249] H. Darici, E. Sun, D. Koyuncu-Irmak, E. Karaöz, “Mesenchymal stem cells for the treatment of COVID-19: why and when they should be used?,” In Khan M. (eds), *Human Mesenchymal Stem Cells*, *Journal of Stem Cells*, 4 (15), pp.159-181, 2021.
- [250] D. Koyuncu-Irmak, H. Darici, E. Karaoz, “Stem cell-based therapy option in COVID-19: Is It promising?,” *Aging and Disease*, 11 (4), 2020.
- [250] P. Leblanc, Z.E. Arellano-Anaya, E. Bernard, L. Gallay, M. Provansal, S. Lehmann, L. Schaeffer, G. Raposo, D. Vilette, “Isolation of exosomes and microvesicles from cell culture systems to study prion transmission,” *Exosomes Microvesicles*, 1245, pp. 153–76, 2017.
- [251] F. Mehryab, S. Rabbani, S. Shahhosseini, F. Shekari, Y. Fatahi, H. Baharvand, A. Haeri, “Exosomes as a next-generation drug delivery system: an update on drug loading approaches, characterization, and clinical application challenges,” *Acta Biomaterialia*, 1(113), pp. 42-62, 2020.
- [252] Y. Zhang, J. Bi, J. Huang, Y. Tang, S. Du, P. Li, “Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted

- therapy applications,” *International Journal of Nanomedicine*. 15, pp. 6917–6934, 2020.
- [253] T.M. Achilli, S. McCalla, A. Tripathi, J. R. Morgan, “Quantification of the kinetics and extent of self-sorting in three dimensional spheroids,” *Tissue Eng Part C Methods*, 4 (18), pp. 302-309, 2012.
- [254] J. Iglesias-González, S. Sánchez-Iglesias, E. Méndez-Álvarez, S. Rose, A. Hikima, P. Jenner R. Soto-Otero, “Differential toxicity of 6-hydroxydopamine in sh-sy5y human neuroblastoma cells and rat brain mitochondria: Protective role of catalase and superoxide dismutase,” *Neurochemical Research*, 10 (37), pp. 2150-2160, 2012.
- [255] B. Yavuz, H. Darici, H., A.P Zorba Yildiz, E.S. Abamor, M. Topuzoğullari, M. Bağırova, A. Allahverdiyev, A., E. Karaoz, “Formulating and Characterizing an Exosome-based Dopamine Carrier System,” *The Journal of Visualized Experiments*, Doi: 10.3791/63624, 2022

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. **Yavuz, B.**, Use of Nanocarrier Systems in the Treatment of Neurological Diseases, 10 th 10th International Conference of Strategic Research on Scientific Studies and Education (ICoSReSSE), 17-18 June, Rome, Italy. 2019.
2. **Yavuz, B.**, Allahverdiyev, A., Parkinson Hastalığının Tedavisinde Ekzosom Temelli Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, 1st International Congress of Multidisciplinary Studies in Health Sciences 3-5 June 2020/İstanbul. ISBN: 978-625-7897-33-4.
3. **Yavuz, B.**, Zorba Yıldız, A.P., Ruşen, E., Abamor, E.Ş., Bağırova, M., Allahverdiyev, A. 2020. "A New Approach To Biomarker Of Parkinson's Disease: Exosomes". 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 6- 10 December 2020.
4. Zorba Yıldız, A.P., **Yavuz, B.**, Abamor, E.Ş., Darıca, H., Bağırova, M., Allahverdiyev, A. 2020. "3D Therapeutic Approaches for Peripheral Nerve Damage". 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 6-10 December 2020.

Makaleler

1. **Yavuz, B.**, Darici, H., Zorba Yildiz, A.P., Abamor, E.S., Topuzoğullari, M., Bağırova, M., Allahverdiyev, A., Karaoz, E., "Formulating and Characterizing an Exosome-based Dopamine Carrier System," The Journal of Visualized Experiments, 2022, Doi: 10.3791/63624.
2. Zorba Yildiz, A.S., Darici, H., **Yavuz, B.**, Abamor, E.S., Özdemir, C., Yasin, M.E., Bağırova, M., Allahverdiyev, A., Karaoz, "Preparation and Characterization of GrapheneBased 3D Biohybrid Hydrogel Bioink for Peripheral Neuroengineering," The Journal of Visualized Experiments, 2022, doi: 10.3791/63622.

Projeler

1. "Sinir Sistem Hastalıklarında Eksozom Temelli Tedavi Yaklaşımlarının Geliştirilmesi", YTÜ- BAP, Genel Araştırma Projesi (Proje No: TSA-2021-4713) (2021-halen) (Araştırmacı)