

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**EKZOZOMLARIN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU
VE KANSER TEŞHİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI ÜZERİNE MODEL BİR ÇALIŞMA**

HAZIRLAYAN

SELİN GÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA – 2025

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**EKZOZOMLARIN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU
VE KANSER TEŞHİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI ÜZERİNE MODEL BİR ÇALIŞMA**

HAZIRLAYAN

SELİN GÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. EMİR BAKİ DENKBAŞ

ANKARA – 2025

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Selin GÜR tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05 / 05 / 2025

Tez Adı: Ekzozomların Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kansere Teşhisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması Üzerine Model Bir Çalışma

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı – Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Başkent Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Lokman UZUN, Hacettepe Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Oğuz BALCI, Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih : ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: ... / ... / 2025

Öğrencinin Adı, Soyadı : Selin GÜR

Öğrencinin Numarası : 22120361

Anabilim Dalı : Biyoteknoloji

Programı : Biyoteknoloji

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Tez Başlığı : Ekzozomların Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kansere Teşhisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması Üzerine Model Bir Çalışma

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 53 sayfalık kısmına ilişkin, 03 / 05 / 2025 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

ONAY

...../ ... / 2025

Öğrenci danışmanı : Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca sadece akademik değil aynı zamanda hayat dersleri de aldığım, bilgi ve tecrübesine sonsuz güvendiğim, bu zor yolda desteğini her zaman hissettiğim, o bitmez tükenmez enerjisiyle ve çalışma aşkıyla hayran kaldığım sayın danışman Hocam Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca yardım aldığım ve sabrı sayesinde her soruma karşılık bulduğum, akademik bilgisiyle yol gösteren sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi FİLİZ KARA'ya saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için laboratuvar olanaklarını sunan Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Lokman UZUN, güler yüzü, samimiyeti ve her türlü yardımlarıyla yanımda olan Arş. Gör. Sena PİŞKİN'e'ya saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarımın son bölümü olan lipozomal yapıların hazırlanması ve karakterizasyonu aşamasında çok değerli desteklerini gördüğüm Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bölümü hocalarından Sayın Hocalarım Prof. Dr. İpek Eroğlu ve Dr. Dilek Güngör'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecimde desteğini esirgemeyen eşime, aileme ve varlığı en büyük şansım olan doğurup büyüttüğüm canım kızıma teşekkür ederim.

ÖZET

Selin GÜR

EKZOZOMLARIN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE KANSER TEŞHİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI ÜZERİNE MODEL BİR ÇALIŞMA

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

2025

Son yıllarda yapılan araştırmalara ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre her yıl milyonlarca (yaklaşık yirmi milyon dolayında) insanın kanser hastalıklarına yakalandığı ve bunların yaklaşık olarak yarısının hayatını kaybettiği bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü raporlarına -göre bu rakamların 2040 yılına kadar yaklaşık iki katına çıkmasının beklendiği bildirilmiştir. Kanser hastalıklarının teşhis edilmesinde kullanılan invazif yöntemlerin (örneğin; doku biyopsisi gibi) ve görüntüleme tekniklerinin (örneğin BT, ultrasonik değerlendirme gibi) sahip olduğu sınırlamalar nedeniyle hastalığın teşhis edilmesi genellikle vücutta yayılmasından sonra bir başka deyimle ileri evrelerde mümkün olabilmektedir. Dolayısıyla kanser teşhis ve tanısının erken dönemlerde konulmasıyla hastaların iyileşme şansının yükseleceği bir gerçektir. Öte yandan hastalar açısından kanserin erken teşhis edilmesi sadece maliyetleri düşürmekle kalmayacak, tedavi etkinliğini de arttırarak ölüm riskini de azaltacaktır. Son yıllarda, üzerinde yoğun araştırmalar yapılan sıvı biyopsiler, kanserin erken teşhisinde noninvazif teşhis/tanı yöntemleri olarak önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Sıvı biyopsi uygulamaları temel olarak kan dolaşımındaki tümör hücreleri (circulating tumor cells, CTC'LER), eksozomlar ve diğer veziküler yapıların değişik hastalıklarla ilgili olarak hastaların çeşitli biyolojik sıvılarından yapılan örnekleme ve analizleri ile gerçekleştirilmektedir. Burada sözü edilen hücre ve diğer bileşenler arasında eksozomlar fizyolojik ve patolojik açıdan son derece değerli bilgiler sunmakta ve konu ile ilgili araştırmalar son on yılda yoğunlaşmaya başlamış ve artan bir eğilimle artış göstermektedir. Sunulan tez çalışması kapsamında son yıllarda özellikle kanser teşhis ve tedavilerinde kullanılabilirliği üzerinde yoğun araştırmalar yapılan eksozomlar ile ilgili olarak manyetik mikro/nanopartiküler yapılar kullanılarak eksozomların ayırma-saflaştırma teknikleri ile bulundukları ortamdan izole edilmeleri ve devamında da kanser teşhis-

tanısında kullanılabilirliği ile ilgili olarak model bir çalışma yapılması planlanmıştır. Bu kapsamda; temel çalışma olarak lipozom hazırlama teknikleri kullanılarak önce yalın lipozmal yapılar oluşturulmuş ve ardından bu yapılara model biyolojik molekül (rneđin L-Histidin) ilave edilerek yapay ekzozom modeli geliştirilmiştir. Gerek lipozomal yapılar ve gerekse yapay ekzozomların ayrılması-saflaştırılması çalışmalarında demiroksit nanopartikül içeren HSA mikropartiküller hazırlanıp yüzeyleri uygun bir ligand ile (rneđin bakır iyonları gibi) dekore edilerek ayırma/saflaştırma verimliliği arttırılarak seçimli ayırma sistemi geliştirilmiştir. Tez çalışmalarından elde edilen bulgular gerçek ekzozomların bulundukları ortamlardan pratik ve ekonomik olarak ayrıştırılması ve saflaştırılması kanser teşhis/tedavisinde kullanılmasına ışık tutabilecek nitelikte değerlendirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Kanser Teşhis ve Tedavisi, Manyetik Nanopartikül, HSA Mikropartikül, Ekzozom, Ekzozom Ayırma

ABSTRACT

Selin GÜR

A MODEL STUDY ON PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF EXOSOMES AND INVESTIGATION OF THEIR USABILITY IN CANCER DIAGNOSIS

Başkent University Institute of Times

Department of Biotechnology

2025

According to recent research and World Health Organization (WHO) reports, it is reported that millions (about twenty million) of people get cancer diseases every year and about half of them lose their lives. According to the World Health Organization reports - it has been reported that these numbers are expected to approximately double by 2040. Invasive methods used in the diagnosis of cancer diseases (for example, due to the limitations of imaging techniques (for example, tissue biopsy) and imaging techniques (for example, CT, ultrasonic evaluation), diagnosing the disease is usually possible in the advanced stages, in other words, after it has spread throughout the body. Therefore, it is a fact that patients' chances of recovery will increase with the diagnosis and diagnosis of cancer at an early stage. On the other hand, early detection of cancer for patients will not only reduce costs, but also reduce the risk of death by increasing the effectiveness of treatment. In recent years, liquid biopsies, on which intensive research has been conducted, have come to the fore as an important alternative as noninvasive diagnostic / diagnostic methods in the early diagnosis of cancer. Liquid biopsy applications are mainly performed by sampling and analyzing tumor cells (circulating tumor cells, CTCs), exosomes and other vesicular structures in the bloodstream from various biological fluids of patients related to various diseases. Among the cells and other components mentioned here, exosomes provide extremely valuable physiological and pathological information, and research on the subject has begun to intensify in the last Decennium and is increasing with an increasing trend. Within the scope of the presented thesis study, it is planned to isolate exosomes from their environment using magnetic micro/nanoparticulate structures using separation-purification techniques, especially in relation to exosomes, whose usability in cancer diagnosis and treatment has been extensively researched in recent years, and then to conduct a model study on their usability in cancer diagnosis. In this context; as a preliminary study, first simple liposomal

structures were created using liposome preparation techniques and then, model biological molecules (e.g. L-Histidine) were added to these structures then an artificial exosome model was developed. In the separation-purification studies of both liposomal structures and artificial exosomes, HSA microparticles containing iron oxide nanoparticles were prepared and their surfaces were decorated with a suitable ligand (e.g. copper ions) and a selective separation system was developed to be increased the separation/purification efficiency. The obtained findings from the thesis studies were evaluated as being able to shed light on the practical and economical separation/purification of real exosomes from their environments to their use in cancer diagnosis/treatment.

KEYWORDS: Cancer Diagnosis and Treatment, Magnetic Nanoparticle, HSA Microparticle, Exosome, Exosome Separation

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ekzozomlar	3
2.1.1. Ekzozomların yapısı	3
2.1.2. Ekzozomların fonksiyonları.....	5
2.1.3. Ekzozomların kullanım alanları.....	5
2.2. Ekzozom Ayırma ve Saflaştırma Teknikleri	6
2.2.1. Diferansiyel santrifüjleme.....	6
2.2.2. Yoğunluk gradyen santrifüjleme.....	6
2.2.3. Büyüklükçe ayırma kromatografisi	7
2.2.4. Ultrafiltrasyon.....	7
2.2.5. İmmün yakalama dizileri	7
2.2.6. Çöktürme.....	7
2.3. Yeni Nesil Ayırma Teknikleri	8
2.3.1. Membran temelli ayırma teknikleri.....	8
2.3.2. Mikroakışkan temelli ayırma teknikleri.....	8
2.3.3. Fiziksel özellik temelli ayırma teknikleri.....	8
2.3.4. İmmün afinite ayırma teknikleri.....	9
2.4. Manyetik Alan Etkili Ayırma Teknikleri	9
2.5. Yapay Ekzozomlar (Artificial Exosomes).....	10
2.5.1. Yapay ekzozom hazırlama yöntemleri.....	13
2.5.2. Yapay ekzozom içerikleri ve L-Histidin yapısal özellikleri	14
3. MATERYAL METOD	16
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	16

3.2. Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	16
3.2.1. Demir oksit nanopartiküllerin sentezi	17
3.2.2. Demir oksit NP'lerin karakterizasyonu.....	18
3.3. HSA Mikropartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	19
3.3.1. HSA mikropartiküllerin morfolojik olarak değerlendirilmesi.....	20
3.3.2. HSA mikropartiküllere demir oksit nanopartikül yüklenmesi	20
3.4. HSA Mikropartiküller ile Ekzozom Ayırma ve Saflaştırma	21
3.4.1. Lipozomların hazırlanması.....	21
3.4.2. Lipozomların manyetik HSA mikropartiküller ile ayrıştırılması.....	22
3.4.3. Yapay ekzozom model çalışmaları	24
4. DENEYSEL BULGULAR.....	27
4.1. Demir Oksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	27
4.1.1. Demir oksit nanopartiküllerin morfolojik değerlendirilmesi.....	27
4.1.2. Demir oksit nanopartiküllerin boy-boy dağılımları	28
4.1.3. Demir oksit nanopartiküllerin boy-boy dağılımına demir tuzlarının etkisi.....	29
4.2. HSA Mikropartiküllerin Karakterizasyonu	30
4.2.1. HSA mikropartiküllerin morfolojik ve kimyasal olarak değerlendirilmesi	31
4.2.2. HSA mikropartiküllerin boy-boy dağılımları	35
4.3. Lipozomların Morfolojik ve Yapısal Karakterizasyonu	37
4.4. Lipozomların Ayrılması ve Saflaştırılması.....	39
4.4.1. Adsorpsiyon süresinin etkisi	39
4.4.2. Adsorbent etkisi	41
4.5. Yapay Ekzozom (L-Histidin İçeren Lipozom) Çalışmaları	42
4.5.1. L-Histidin içeren lipozom formülasyonların karakterizasyonu.....	42
4.5.2. Yapay ekzozomların (L-Histidine içeren lipozomlar) ayrılması ve saflaştırılması.....	43
5. SONUÇLAR.....	47
KAYNAKLAR.....	48

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Doğal eksozomlar ile Farklı Yapay Eksozom Türlerinin Karşılaştırılması	14
Tablo 3.1. Demir Oksit Nanopartikül Hazırlama Koşulları/Parametreleri.....	17
Tablo 3.2. Lipozom Ayırma-saflaştırma Çalışmalarında Kullanılan Örnekler	23
Tablo 3.3. Adsorpsiyon Kinetiği Belirlenmesinde Kullanılan Örnekler	24
Tablo 3.4. Yapay Eksozom Hazırlanmasında Kullanılan Formülasyonlar	25
Tablo 3.5. Yapay Eksozom Hazırlanmasında Kullanılan Formülasyonlar	26
Tablo 4.1. LS100 ile Hazırlanan Lipozomların Adsorpsiyon Süresine Göre Değişen Adsorpsiyon Miktarları	40
Tablo 4.2. P90G ile Hazırlanan Lipozomların Adsorpsiyon Süresine Göre Değişen Adsorpsiyon Miktarları	40
Tablo 4.3. LS100 ve P90G ile Hazırlanan Lipozomların Adsorbent Türüne Göre Değişen Adsorpsiyon Kapasiteleri	41
Tablo 4.4. Yapay Eksozomların Bazı Fizikokimyasal Özellikleri	43
Tablo 4.5. Yapay Eksozom Ayırma Çalışmalarında Kullanılan Örneklerin İçerikleri	44
Tablo 4.6. Yapay Eksozom Ayırma Çalışmalarında Elde Edilen Veriler	44
Tablo 4.7. Yapay Eksozom (L-Histidin Rehidrasyonda eklenmiş) Ayırma Verileri	45
Tablo 4.8. Yapay Eksozom (PEG'li ve L-Histidin Rehidrasyonda eklenmiş) Ayırma Verileri	45
Tablo 4.9. Yapay Eksozom (L-Histidin Adsorpsiyonla eklenmiş) Ayırma Verileri	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Ekzozomların genel yapısı	4
Şekil 2.2. Ekzozomların bünyesinde yer alan moleküller	4
Şekil 2.3. Ekzozomların manyetik ayırma teknolojileri ile ayrılması ve saflaştırılması proses basamakları.....	10
Şekil 2.4. (A) Yukarıdan aşağıya (Top-down) ve aşağıdan yukarıya (Bottom-Up), (B) Biyo-hibrit sistem ile yapay ekzozom üretim şemaları	12
Şekil 2.5. L-Histidin yapısının şematik gösterimi	15
Şekil 3.1. Demir oksit nanopartiküllerin sentezi için uygulanan işlem basamakları.....	18
Şekil 3.2. Lipozomal yapıların hazırlanmasında kullanılan işlem basamakları	22
Şekil 3.3. Lipozomların demir oksit içeren HSA mikropartiküller ile ayırma işlemleri	23
Şekil 4.1. Demir Oksit Nanopartiküllerin SEM fotoğrafı	28
Şekil 4.2. Demir Oksit Nanopartiküllerin SEM fotoğrafı ($\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ mol/mol oranı: 1/4).....	29
Şekil 4.3. Demir Tuzları Derişiminin Demiroksit Nanopartikül Boy-Boy Dağılımına Etkisi	30
Şekil 4.4. HSA Mikropartiküllerin Optik Mikrofotografı	32
Şekil 4.5. Fe_3O_4 Nanopartikül İçeren HSA Mikropartiküllerin Optik Mikrofotografı	32
Şekil 4.6. HSA Mikropartiküllerin SEM Fotoğrafı	33
Şekil 4.7. Fe_3O_4 Nanopartikül İçeren HSA Mikropartiküllerin SEM Fotoğrafı	34
Şekil 4.8. HSA Mikropartiküllerin EDX Spektrumu ve Elementel İçeriği	34
Şekil 4.9. Demir Oksit NP İçeren HSA Mikropartiküllerin EDX Spektrumu- Elementel İçeriği.....	35

Şekil 4.10. HSA Derişiminin HSA Mikropartikül Çapına Etkisi.....	36
Şekil 4.11. HSA Derişiminin HSA Mikropartikül Çapına Etkisi.....	37
Şekil 4.12. LS100 Lipozomların NTA’da Ölçülen Boy-Boy Dağılımı (Ort. Çap: 155.6±43.8nm)	38
Şekil 4.13. P90G Lipozomların NTA’da Ölçülen Boy-Boy Dağılımı (Ort. Çap: 143.0±56.8 nm)	38



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CT	Bilgisayarlı Tomografi (Computed Tomography)
CTC	Kan Dolaşımındaki Tümör Hücreleri (Circulating Tumor Cells)
DLD	Deterministik Lateral Yer Değiştirme (Deterministic Lateral Displacement)
DLS	Dinamik Işık Saçılması (Dynamic Light Scattering)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOPE	Dioleoyl Phosphatidylethanolamine
DOTAP	Dioleoyltrimethylammonium Propane
EDX	Enerji Dağılım Spektroskopisi
ESR	Elektron Spin Rezonansı
EV	Ekstraselüler Vezikül
ExoChip	Ekzozom Tanı Çipi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
g	Gram
HSA	İnsan Serum Albümini
LS100	Lipoid S100
miRNA	Mikro RNA
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MNP	Manyetik Nanopartikül
MP	Mikropartikül
mRNA	Mesajcı RNA
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
P90G	Phospholipon 90G
pH	Hidrojen İyon Konsantrasyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
µm	Mikrometre

1. GİRİŞ

Ekzozomlar, 30-200 nm çapında, fosfolipid çift tabakasıyla çevrili ve DNA, mRNA, miRNA, proteinler ve lipidler gibi biyomoleküller içeren hücre dışı veziküllerdir. Çoğu ökaryotik hücre tarafından salgılanan bu veziküller, hücreler arası iletişimi sağlamak için sinyal molekülleri taşımak, reseptör hücrelerin fizyolojik ve patolojik durumlarını düzenlemek gibi önemli roller üstlenir [1]. Kan, idrar, tükürük, anne sütü ve beyin-omurilik sıvısı gibi biyolojik sıvılarda yaygın olarak bulunmaları, ekzozomları erken hastalık teşhisi ve prognozu için kolay erişilebilen değerli biyobelirteçler haline getirir. Bu özellikleri nedeniyle ekzozomlar, son yıllarda klinik uygulamalar ve terapötik araştırmalar açısından büyük ilgi görmektedir [2].

Bununla birlikte, ekzozomların klinik ve araştırma alanındaki potansiyeline rağmen, etkili izolasyon teknolojilerinin eksikliği büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir. İzolasyon verimliliği, saflığı ve kalitesi hem temel bilimsel araştırmalar hem de klinik uygulamalar açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, düşük maliyetli, basit ve hızlı ekzozom izolasyon yöntemlerine duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Günümüzde ultrasantrifüjleme, immünoafinite, boyut dışlama kromatografisi, çöktürme ve mikroakışkan çipler gibi çeşitli yöntemler ekzozom izolasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır [3]. Bunlar arasında ultrasantrifüjleme, en yaygın kullanılan yöntem olmakla birlikte, düşük saflık, uzun işlem süresi ve yüksek maliyet gibi dezavantajlara sahiptir. Öte yandan, immünoafinite yöntemleri, ekzozomların lipid çift katmanındaki spesifik belirteçleri hedefleyen antikorlar veya aptamerler kullanarak daha saf ve spesifik izolasyon sağlarken, aynı zamanda kullanımı daha kolay bir alternatif sunmaktadır. Bu izolasyon modelinde, aptamerler veya antikorlar manyetik partiküller (MP) üzerine sabitlenebilir [4]. MP'lerin en büyük avantajı, süperparamanyetik özellikleri sayesinde manyetik bir alan uygulanarak kolayca manipüle edilebilmesidir. Manyetik partiküller (MP) genellikle, manyetik özellikteki nanopartiküller ve polimer bileşenlerinin kombinasyonuna dayanır. Manyetik özellikteki nanopartiküller partiküllere manyetik özellikler kazandırırken polimer matrisi aptamer veya antikor eklenmesine olanak tanıyarak ekzozom izolasyonu ve saflaştırılmasında yüksek verimlilik sunar [5]. Ekzozom izolasyonunda en yaygın kullanılan manyetik nanopartiküller demir bazlı metal oksitlerdir [6;7]. Demir oksit nanopartikülleri FDA tarafından onaylanmıştır ve manyetik rezonans görüntüleme, ilaç dağıtımı ve hastalık tedavisi dahil olmak üzere biyomedikal araştırmalar ve klinik uygulamalarda yaygın olarak

kullanılmaktadır. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ve Fe_3O_4 nanopartikülleri biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik avantajlarına sahiptir [8]. Albümin, biyolojik sıvılarda bol miktarda bulunan ve çeşitli moleküllerle etkileşime girebilen bir proteindir. Bu nedenle, albümin kaplı MNP'ler, biyomedikal uygulamalarda taşıyıcı platformlar olarak kullanılmaktadır. [9]. Ekzozom (HSA) ile kaplanmış manyetik partiküllerin kullanımı, HSA'nın yüksek biyouyumluluğu, geniş yüzey fonksiyonelleştirme kapasitesi ve spesifik biyomolekülleri bağlama yeteneği sayesinde avantaj sağlamaktadır [10]. Ekzozom izolasyonunda albümin kaplı MNP'lerin kullanımıyla ilgili literatürde doğrudan bir çalışma bulunmamakla birlikte, farklı fonksiyonelleştirme stratejileriyle MNP'lerin ekzozom izolasyonunda başarıyla kullanıldığı bilinmektedir [3; 6; 11].

Sunulan çalışmanın amacı, ekzozomların ayrılması ve saflaştırılmasında etkili bir şekilde kullanılacak manyetik özelliklere sahip partiküller geliştirmektir. Bu amaçla önce HSA partikülleri hazırlanmıştır. HSA, çeşitli ligandları ve biyomolekülleri bağlayabilen çoklu etkileşim bölgelerine sahip olup, yüzeyine antikor veya aptamer immobilizasyonu için uygun bir platform sunabilen, fizyolojik koşullarda hafif negatif yüke sahip olması sebebiyle elektrostatik etkileşimler aracılığıyla ekzozomların yüzeye adsorpsiyonunu destekleyebileceği için tercih edilmiştir. Bu özellikleri sayesinde demir oksit nanopartikülleri içeren HSA mikropartiküllerin ekzozom izolasyonunda yüksek seçicilik ve etkinlik sağlamasına olanak sağlayabileceği ve manyetik alan uygulanmasıyla ekzozomların bulundukları ortamdan kolayca ayrılmaları sağlanabilecektir. Elde edilen partiküllerin boyut analizleri yapılarak morfolojik özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan partiküllerin ekzozom ayırma ve saflaştırma çalışmalarını modellemek üzere yapay ekzozom olarak bilinen yapılara olan benzerliğinden ve üretim proseslerindeki kolaylıklardan dolayı lipozomal yapılar kullanılmıştır. Böylelikle HSA mikropartiküllere manyetik özellik kazandırılarak ekzozomlar ile benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olan lipozmlar üzerinde model bir izolasyon sürecinde etkili bir araç olarak kullanılabilirliği ortaya konulmuştur. Bu sayede, ekzozom saflaştırması için mevcut yöntemlerin sınırlamalarını aşmayı hedefleyen yenilikçi bir yaklaşım sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

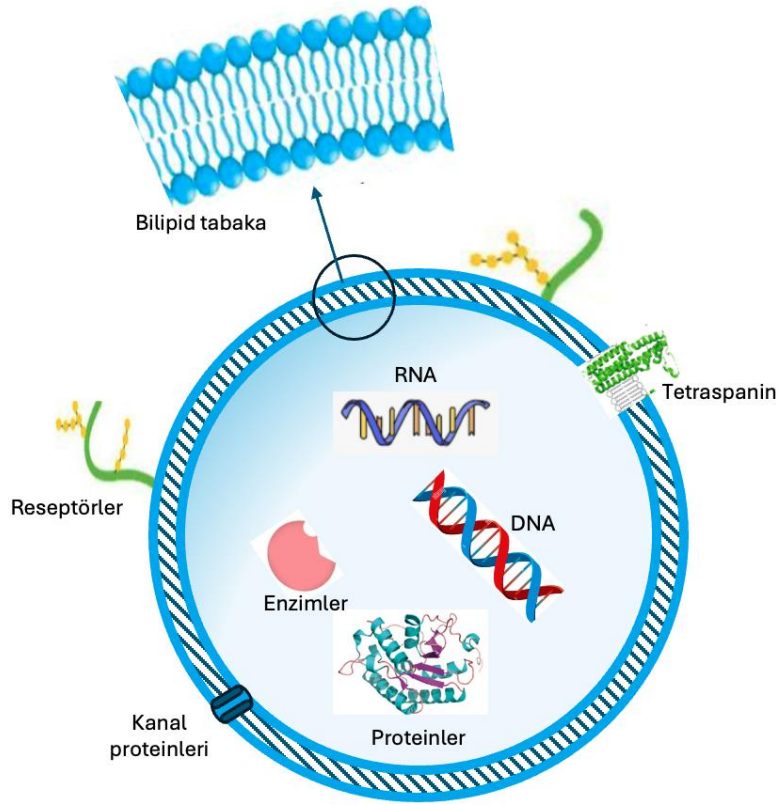
2.1. Ekzozomlar

2.1.1. Ekzozomların yapısı

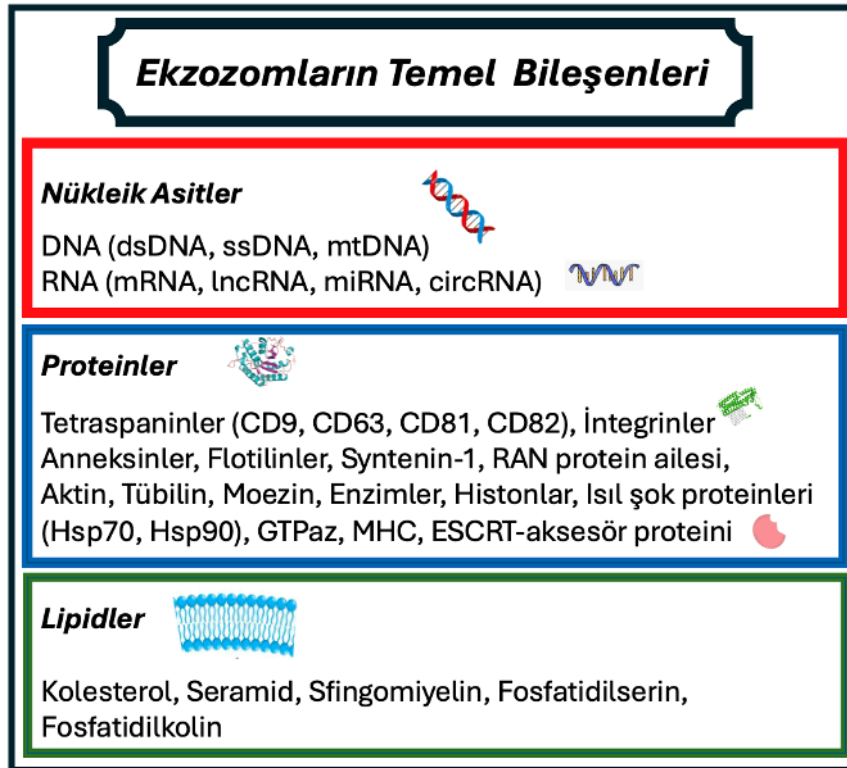
Yaklaşık olarak son 50 yıldır varlığı bilinen ekzozomlar, bütün vücut hücreleri tarafından oluşturulan, hücre dışı ortama salınan ve yaklaşık boyutları 40-100 nanometre arasında değişen doğal keseciklerdir. Keşfedildikleri yıllarda hücrel atık olarak değerlendirilen ekzozomların teknolojinin gelişmesiyle birlikte hücreler arası iletişimde oldukça önemli bir göreve sahip çeşitli nükleik asitler barındıran hücre dışı veziküller olduğu anlaşılmıştır. Ekzozomlar ilk keşfedildiklerinde (1983 yılında) hücre çöpi ya da hücre içeriğinin atılımı için bir aracı olarak değerlendirilmiştir, sonrasında 2007 yılında da mRNA ve miRNA içerdiklerinin keşfedilmesiyle, hücreler arası iletişim aracı olmalarından dolayı her geçen gün daha fazla ilgi çekmeye başlamışlardır [12-14]. Ökaryotik hücrelerden salınan ekzozomların zarla çevrili olup nükleik asit, protein, lipit ve metabolitler içermesi birçok hastalığın teşhisinde kullanılabilirliğini ortaya çıkmış ve böylece tanısal biyobelirteç olmaları daha ilgi çekici olmuştur [15].

Ekzozomlar proteinler, lipitler, nükleik asitler, metabolitler ve yüzey molekülleri gibi çeşitli biyomoleküller içerirler (Şekil 2.1). Bu biyomoleküller sayesinde, ekzozomlar hücrel iletişimde ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli rol oynarlar [16].

Ekzozomların içeriği, hücrel fonksiyonlarını ve biyolojik süreçlerdeki rollerini anlamak için önemlidir. Örneğin, kanser hücrelerinden salgılanan ekzozomlar, onkogenik proteinler ve miRNA'lar içererek tümör büyümesini ve metastazı teşvik edebilir. Benzer şekilde, nöronlardan salgılanan ekzozomlar, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili proteinler ve RNA'lar taşıyabilir. Bu içerikler, ekzozomların köken aldığı hücrelerin biyolojik durumunu yansıtır ve hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilir [15]. Konu ile ilgili olarak yapılan araştırmalardan elde edilen ayrıntılı ekzozom içerikleri hakkında Şekil 2.2.'de sunulan moleküllerin varlığı halihazırda ortaya konulmuş durumdadır [17].



Şekil 2.1. Ekzozomların genel yapısı



Şekil 2.2. Ekzozomların bünyesinde yer alan moleküller

2.1.2. Ekzozomların fonksiyonları

Hücreler arası iletişim

Ekzozomlar, hücreler arası iletişimde büyük rol oynarlar. Özellikle bu iletişimi kolaylaştırmak için hormon, sitokinin gibi maddeler salgılayan ekzozomlar kendinden uzakta bulunan hücrelerle iletişim kurarlar. Hedef hücrelere ulaşan ekzozom hedef hücrenin fenotipi ve işlevini de etkiler.

Her hücre ile iletişim kurma özelliği olan ekzozomların hedef hücre seçiciliği sayesinde hastalık teşhisinde ve tedavisinde cazip bir seçenek olmuşlardır [15].

Bağışıklık düzenleme

Ekzozomlar taşıdıkları sitokinin, antijen ve immünosupresif moleküller ile bağışıklık yanıtlarını baskılayabilir ya da başlatabilirler.

Kanser oluşumu

Ekzozomlar sürekli çoğalan tümör hücrelerine alan oluşturmak için hücre dışı matrisini genişletebilirler. Çeşitli çalışmalar bu hücre dışı matris bozulması ve kanser hücrelerinin yayılımının, etkisi altına alınmasının ve salgılanmasının arttığını göstermektedir [18].

Hücre onarımı ve rejenerasyon

Mezenkimal kök hücrelerden üretilen ekzozomlar, hasarlı dokulara büyüme faktörleri taşıyarak doku onarımı sürecini hızlandırabilirler.

2.1.3. Ekzozomların kullanım alanları

Ekzozomların teşhis ve tedavide kullanımı

Ekzozomlar biyobelirteç olarak kullanılabilirler. Yakın zamanda ekzozomlar kan, idrar, anne sütü vb. neredeyse tüm vücut sıvılarında keşfedilmiştir. Vücut sıvıları donör hücrenin özelliklerini de gösterirler. Bu sayede çeşitli hastalıkların biyobelirteçleri aktarılır ve hastalıkların erken teşhisinde yardımcı olur [15].

Ekzozomların yüzey proteinleri onların immün yakalanmasını sağlar. Tanısal olarak da kardiyovasküler hastalıklar, merkezi sinir sistemini etkileyen hastalıklar, kanser ve çeşitli organ hastalıkları belirlenebilir. Örneğin, prostat kanseri teşhisinde, idrarda bulunan ekzozomlardaki PCA3 ve TMPRSS2 gen füzyonları biyobelirteç olarak kullanılabilir [19].

Terapötik olarak kullanımı

Ekzozomlar ilaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılabilirler. Yapısal olarak düşük immünojenisiteye sahip olan bu nano veziküller terapötik olarak ilaç taşıma kapasitesi için

uygun donanımlıdırlar (2). Bu avantaj onların çeşitli tedavi edici molekülleri taşıyarak hastalıkların tedavisinde kullanılabilmesini mümkün kılar. Örneğin, kanser tedavisinde, ekzozomlar kemoterapi ilaçlarını veya gen düzenleyici molekülleri hedef hücrelere taşımak için kullanılabilmelerinin yanında inflamatuvar hastalıkların tedavisinde anti-inflamatuvar moleküller taşımak için de kullanılabilirler

2.2. Ekzozom Ayırma ve Saflaştırma Teknikleri

Ekzozomların ayrılması ve saflaştırılması zor bir süreçtir, çünkü ekzozomların ayrıştırılması ve saflaştırılması proseslerinde ekzozomların diğer farklı hücre dışı vezikül yapılarından/popülasyonlarından ayırt edilmesi gereklidir. Bu amaçla kullanılan bazı klasik yöntemler mevcuttur ve bu yöntemlerden bazıları sırasıyla aşağıda özetlenmiştir;

- Diferansiyel santrifüjleme
- Yoğunluk Gradyan Santrifüjleme
- Büyüklükçe ayırma kromatografisi
- Ultrafiltrasyon
- İmmün yakalama dizileri
- Çöktürme

2.2.1. Diferansiyel santrifüjleme

Biyolojik numunelerdeki hücrelerin, organelerin, hücre dışı sıvıların ve birçok nanopartikülün ayrıştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ekzozomların hücre kültürü ortamından ayrılması için en sık kullanılan yöntemdir.

Elde edilen biyolojik sıvı (tükürük, kan serumu gibi) cam şişede 4°C’da yaklaşık 5 gün saklanır. Bu süreçte düşük hızlı küçük EV (hücre dışı vezikül) tüpün dibinde birikirken üst kısmında yüksek hızlı dönüşe sahip proteinler, apoptotik cisimlerin mevcut olduğu görülür. Bu birlikte çökelme ekzozomların izole edilmiş olduğunu gösterir [20].

2.2.2. Yoğunluk gradyan santrifüjleme

Diferansiyel santrifüjlemeye göre daha saf ekzozom elde etme yöntemidir. Biyolojik sıvı cam şişede 4 °C’da yaklaşık 5 gün saklanır. Bu süreçte protein kombinasyonu yine sıvının üst kısmında birikir. Bu protein yoğunluğunu azaltmak için sükröz veya iyodiksanol gibi yoğunluk gradyan çözeltileri kullanılır. Yüksek hızda ultrasantrifüj uygulanır. Bu sırada

ekzozomlar ve diğer moleküller yoğunluklarına göre ayrılırlar. Ekzozom yoğunluğu genellikle 1.13-1.19 g/ml'dir [20].

2.2.3. Büyüklükçe ayırma kromatografisi

Bu ayırma tekniğinde partiküllerin geçişine izin vermeyen porlara sahip olan bir malzeme kullanılır. Ekzozomlu bir numune bir kolona koyulup kolondan geçişi sağlanır. Büyük partiküllü moleküller kolonu oluşturan matriksin porlarından takılmadan geçebilirler ama küçük partiküllü moleküller ise porlara takılır ya da yavaş geçebilirler. Bu nedenle kolon içerisinden hızla akarlar. Gözeneklere girebilecek moleküller ise kolon içinde dolaşır ve yavaşlatılırlar. Moleküller küçüldükçe kolonda tutulma süreleri artar bu nedenle en küçük moleküller kolonu en son terk ederler. Kolondan çıkan moleküller ayrı ayrı gözlemlenir ve ekzozomlar bu şekilde ayırt edilmiş olurlar [20].

2.2.4. Ultrafiltrasyon

Vezikül boyutunda gözenekli polimerik membran kullanılarak sıvı basıncıyla ayırma yöntemidir. Bu süreçte ekzozomlar biyolojik sıvıdan seçici olarak ayrılırken büyük moleküller membranda kalır [20].

2.2.5. İmmün yakalama dizileri

Vezikül yüzeyindeki ekzozom belirteç bileşenlerinin antikorlar tarafından tanınarak izole etme yöntemidir. Bu uygulamada ekzozom antijenlerini tanıyan belirli antikorlar (CD3, CD81, CD82, Alix, Annexin gibi) kullanılır. Bu antikorlarla kaplanan katı bir yüzey, manyetik boncuk gibi, antijen sunan ekzozomları ayırır. Ekzozoma bağlı kalan partiküller de yıkama yöntemiyle uzaklaştırılır. Bu uygulamada ekzozomların saflık oranı yüksektir. Biyolojik araştırmalarda, klinik alanda kullanılır.

2.2.6. Çöktürme

Bu yöntem ekzozomları ayırmak için kullanılan basit ve etkili bir yöntemdir. Polimer bazlı çöktürme reaktifleri kullanılarak ekzozomlar çökeltilir. Burada dikkat edilmesi gereken diğer moleküller ile birlikte çökme olmasıdır. Bunu önlemek için birkaç defa yıkama yapılması gereklidir. (Çöktürme ve kolon tabanlı yaklaşımlar kullanılarak farklı biyoakışkanlardan ekzozom izolasyonu gerçekleştirilebilir.

2.3. Yeni Nesil Ayırma Teknikleri

2.3.1. Membran temelli ayırma teknikleri

Bu yöntem, ekzozomları fiziksel özelliklerine göre ayırmak için kullanılır. Bu yöntemlerden bazıları; mikrofiltrasyon, nanofiltrasyon gibi.

2.3.2. Mikroakışkan temelli ayırma teknikleri

Mikroakışkan sisteminde vezikül ayırımı ekzozom zarındaki spesifik biyobelirteçlere bağlıdır. Mikroakışkan çipi (ExoChip) yaygın olarak bilinen CD63 ile fonksiyonel hale geldiğinden izole edilebilir. Bu sistem ekzozom izolasyonu ve tanımlanması için miRNA'ların amplifikasyonu ile de birleştirilebilir (4,7).

2.3.3. Fiziksel özellik temelli ayırma teknikleri

Ekzozomların fiziksel özellik temellerine dayalı olarak kullanılan ayırma ve saflaştırma teknik ve teknolojileri ekzozomların boyutları, yüzey yükleri ve yoğunlukları gibi fiziksel özelliklerine göre değerlendirilmektedirler [17].

Aktif izolasyon teknikleri

Ekzozomların daha verimli ve hızlı ayırt edilip saflaştırılabilmesi için geliştirilen ve aktif izolasyon yöntemleri adı verilen tekniklerin elektriksel, merkezkaç ve akustik kuvvetlerden yararlanılarak gerçekleştirilen tekniklerden oluştuğu bildirilmektedir. Bu tekniklerden akustik kuvvetlerin kullanıldığı yöntemde; biyolojik sıvılarda yer alan ekzozomların izolasyonunda akustik kuvvetler ve damlacık eğirmenin kullanıldığı akustik temelli ayırma işleminde kullanılan mikroakışkan çip uygulaması güncel uygulamalardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır [21]. Elektriksel alan etkisi ile çalışan bir diğer sistemde izotakoforezin odaklama gücü ve kağıt bazlı filtreleme yeteneği entegre edilerek ekzozom ayırma işlemleri gerçekleştirilmiştir [22]. Bir başka uygulamada ise ekzozomların tam kandan izole edilmesinde hidrodinamik temelli bir mikroakışkan sistem tasarımının kullanıldığı belirtilmiştir [23].

Pasif izolasyon teknikleri

Ekzozom üzerine araştırmalar yapan araştırmacıların mikroakışkan sistemleri esas olarak karmaşık kanal yapılarına veya hidrodinamik özelliklere dayalı stratejileri bu sistemlere dahil ettikleri bildirilmektedir. Bu tür sistemlerden nano gözenekli membranların, nanofiltrelerin, nanosütun dizilerinin ve hidrodinamik özelliklerini içeren sistemler pasif

izolasyon yöntemleri olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak; Suwatthanarak ve arkadaşları tarafından insan meme kanseri hücrelerinin kültürlenmiş ortamından verimli eksozom zenginleştirilmesi için ZnO nanotel dizilerinin modifiye eksozom hedefleme peptidleri şeklinde geliştirilmesi dikkat çeken bir uygulamadır [24]. Diğer bir uygulama olarak nanosütun temelli mikroakışkan sistemler deterministik yanal yer değiştirme (Deterministic Lateral Displacement, DLD) olarak adlandırılan değişik partikül izolasyonu için nanosütunların bir veya daha fazla optimal adım, boşluk ve çap dizisinden oluşmaktadır [25]. Burada sunulan yöntemin temel çalışma prensibi, kritik çaptan daha büyük partiküllerin, sütun aralığı ve dizi gradyanı tarafından tanımlanan belirli bir açıda hareket edebiliyor olmasıdır [26].

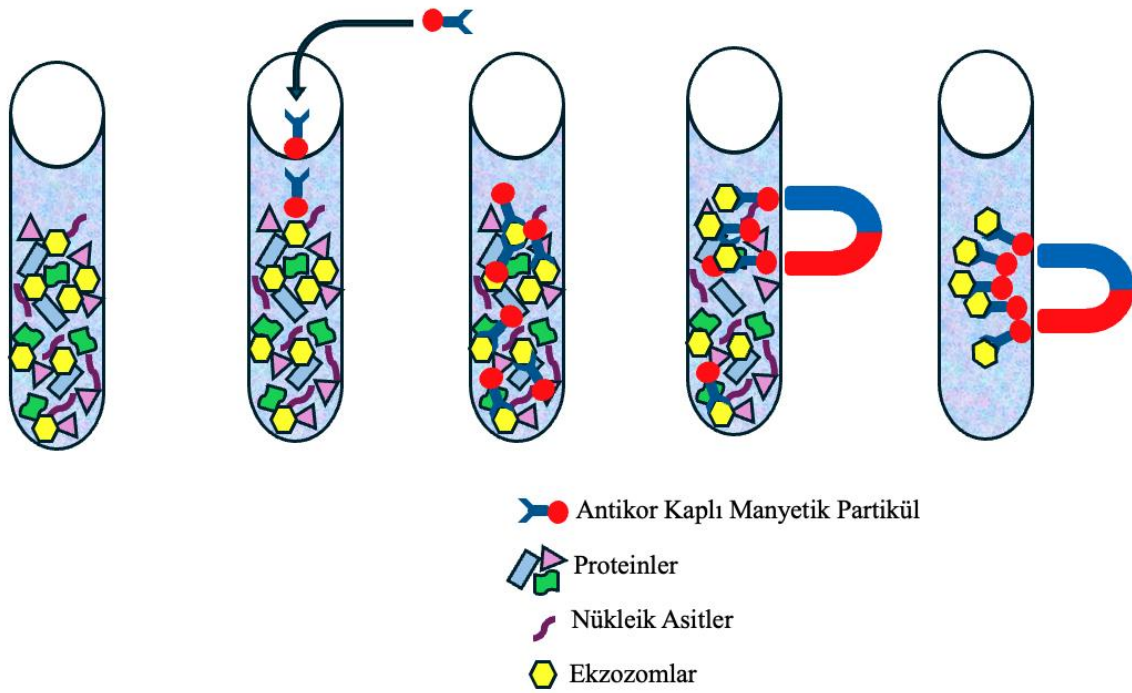
2.3.4. İmmün afinite ayırma teknikleri

İmmün afiniteye dayalı mikroakışkan sistemler, belirli eksozomları bulundukları ortamdan izole etmek ve saflaştırmak üzere antijen-antikor reaksiyonlarının kullanılması prensibine göre çalışmaktadır. Bu tür sistemlerde eksozomların verimli bir şekilde izole dilmelerinde en kritik husus, uygun antikörlerin seçilmesi, mikro ölçekli kütle transferinin teşvik edilmesi, partikül yüzey buluşmalarının sayısının (veya temas edecekleri yüzey alanının) artırılması şeklinde tanımlanmaktadır [27;28]. Konu ile ilgili olarak yapılan çalışmaların çoğunda, immün afinite ile yakalama işlemi sabit (stationary) antikör kaplı ortamlar ve mobil antikör kaplı ortamlar ile gerçekleştirilebilmektedir.

2.4. Manyetik Alan Etkili Ayırma Teknikleri

Eksozom uygulamalarından özellikle klinik uygulamalarda (örneğin; teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan eksozomlar için) öncelikle eksozomların yüksek saflıkta olmaları büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi geleneksel yöntemleri kullanarak eksozomların yüksek saflık ve verim değerinde kalitede elde edilmelerinde yaşanan zorluklar, zaman ve ekonomik yönden kayıplar ve güçlükler nedeniyle verim ve yüksek saflık yönünden daha etkili yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda öne çıkan uygulamalardan bir de manyetik alan teknolojilerinden yararlanılan manyetik alan etkili/etkisi ile manyetik taşıyıcıların/adsorbentlerin kullanıldığı manyetik alan etkili ayırma-saflaştırma teknikleri ve yöntemleri her geçen gün daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [29].

Söz konusu manyetik alan etkili ekzozom ayırma ve saflaştırma yöntemlerinin genel işlem basamakları Şekil 2.3.'te ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur. Şekil'den de anlaşılacağı üzere genel olarak biyolojik sıvıların içerisinde değişik biyolojik moleküller ile bir arada bulunan ekzozomların yüzeylerinde yer alan spesifik reseptörleri (özellikle belli antijenleri) tanıyacak olan antikorlar manyetik özellikli mikro-nanopartiküllerin yüzeylerine dekore edilmiş durumdadır. Söz konusu manyetik mikro-nanopartiküllerin biyolojik sıvı içerisine katılmasıyla bir süre uygun koşullarda gerçekleştirilen inkübasyon sırasında metdana gelen spesifik bağlanmalar ile antikor kaplı manyetik mikro-nanopartiküller sayesinde ekzozomların spesifik/hedefli olarak bulunduları ortamdan ayrılmaları mümkün olabilmektedir. Burada en kritik olan husus yukarıda da bahsedildiği gibi ekzozomların yüksek saflıkta elde edilebiliyor olmasıdır.



Şekil 2.3. Ekzozomların manyetik ayırma teknolojileri ile ayrılması ve saflaştırılması proses basamakları

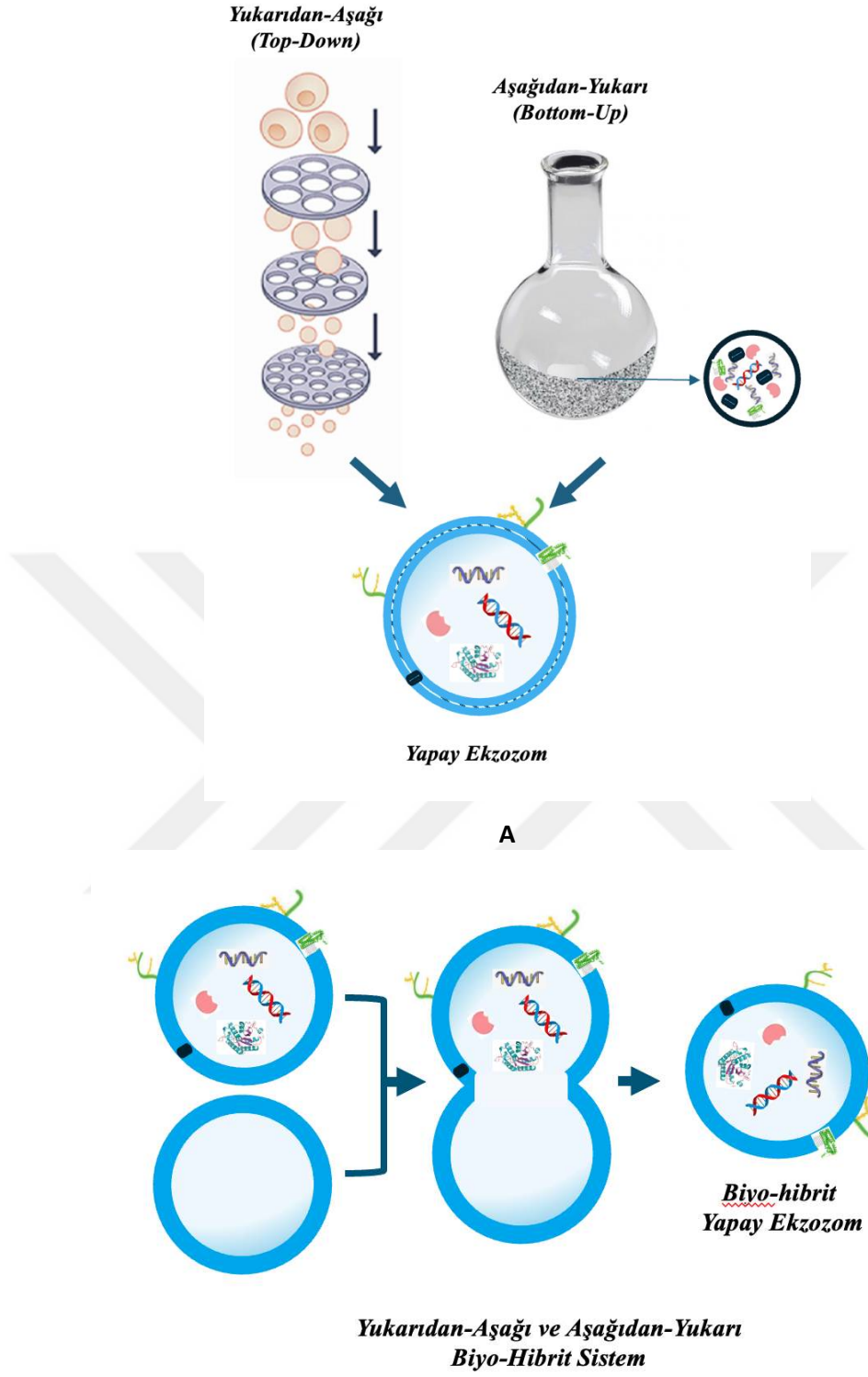
2.5. Yapay Ekzozomlar (Artificial Exosomes)

Daha önceki bölümlerde ayrıntılı bir şekilde sunulduğu gibi ekzozomlar salındıkları hücrelerden pek çok protein, nükleik asit ve lipid yapıları olmak üzere çeşitli biyolojik bileşenler ve molekülleri içerirler [30]. Ekzozomlar sahip oldukları bu moleküller sayesinde hücreler arası iletişim, tümör metastazı, ilaç direnci, immün yanıtlar ve mikro ortam homeostazı gibi değişik pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli bir rol oynamaktadır [8].

Ekzozomlar yine bu sahip oldukları moleküller ve fizyolojik yapıları sayesinde fagositoz prosesine yakalanmadıkları için kan dolaşımında uzun süreli dolaşıma sahip olabilirler ve bağışıklık sisteminden kaçabilmek için gerekli moleküllerin salımını sağlayabilirler. Ekzozomlar ayrıca sahip oldukları hücre zarı yapısına benzer yapılarından dolayı pek çok biyolojik bariyerden penetre olabilmelerini kolaylaştıran değişik hücrel yapışma moleküllerine sahiptir.

Son yıllarda doğal ekzozomların sahip oldukları birtakım dezavantajlardan dolayı (özellikle ayırma-saflaştırma teknik ve teknolojilerinde yaşanan güçlükler/zorluklar) son yıllarda yeni nesil yapay ekzozom (Artificial Exosome) adı verilen malzemelere büyük ihtiyaçlar duyulmaktadır. Bu nedenle ilgili alanda özellikle yukarıdan aşağıya (Top-down), aşağıdan yukarıya (Bottom-Up) veya biyo-hibrit teknolojiler olarak adlandırılan prosesler ile söz konusu yapay ekzozomların geliştirilmesine odaklanılmıştır (Şekil 2.4.A. ve 2.4.B.) [31].

Yapay ekzozomlar ilgili kaynaklarda genel olarak “nanoveziküller”, “ekzozom-mimetikler” ya da “hibrit ekzozomlar” şeklinde adlandırılmaktadır [32]. Söz konusu yapay ekzozomların yeni nesil teknolojiler (özellikle nanobiyoteknoloji prosesleri) ile geliştirilmesiyle doğal ve sentetik nanoyapıların sahip olduğu tüm avantajlar sayesinde kanser teşhis ve tedavileri başta olmak üzere pek çok uygulamada kullanım potansiyelinin mevcut olduğu bildirilmektedir [33].



Şekil 2.4. (A) Yukarıdan aşağıya (Top-down) ve aşağıdan yukarıya (Bottom-Up), (B) Biyo-hibrit sistem ile yapay ekzozom üretim şemaları

2.5.1. Yapay ekzozom hazırlama yöntemleri

Yukarıdan aşağıya (Top-Down) stratejileri

Yapay ekzozomların yukarıdan aşağıya stratejiler ile hazırlanmasında büyük ve kompleks olan yapıların daha küçük ölçekli bileşenlere ayrıştırılması prensibine dayanmaktadır. Bu stratejiler arasında yer alan farklı yöntemler aşağıda verilmiştir.

- a. Ekstrüzyon Temelli Yöntemler
- b. Filtrasyon Temelli Yöntemler
- c. Mikroakışkan Sistemler
- d. Sonikasyon Temelli Sistemler

Aşağıdan yukarıya (Bottom-Up) stratejileri

Yapay ekzozomların aşağıdan yukarıya stratejiler ile hazırlanmasında yukarıdan aşağıya stratejilerin aksine küçük moleküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri birleştirilerek büyük ve karmaşık yapılar oluşturmak üzere küçük moleküllerle başlayan üretim yaklaşımları yer almaktadır. Bu stratejiler arasında yer alan farklı yöntemler aşağıda verilmiştir.

- a. Spesifik Peptidler ile Lipozom Konjügasyonu
- b. Spesifik Antibodiler ile Lipozomların Birleşmesi
- c. Spesifik Proteinler ile Nanopartiküllerin Gömülmesi
- d. Lipozomların Membran Proteinleri ile Modifiye Edilmesi
- e. Proteinler Olmaksızın Tamamıyla Sentetik Ekzozom Taklitlerinin Hazırlanması

Biyohibrit stratejileri

Yapay ekzozomların hazırlanmasında kullanılan bir diğer yöntem olan biyohibrit stratejilerinde sentetik nanopartiküler ile doğal veziküller birleştirilerek ekzozom taklidi yapılar geliştirilebilir. Bu stratejiler arasında yer alan farklı yöntemler aşağıda verilmiştir.

- a. Dondurup-Çözme ile Biyohibrit Oluşturma
- b. İnkübasyon ile Biyohibrit Oluşturma
- c. Birlikte Ekstrüzyon ile Biyohibrit Oluşturma

Buraya kadar tanımlanan tüm yapay ekzozom hazırlama yöntemleriyle hazırlanan yapıların doğal ekzozomlar ile karşılaştırılmasına ilişkin olarak yapılan değerlendirmelere göre oluşturulan derlemeler Tablo 2.1.'de sunulmuştur [33]. Burada verilen değerler karşılaştırıldığında doğal ekzozomların farklı yönlerden diğer sentetik olan yapılar ile en benzerlik gösteren yapı biyohibrit yapılar olarak düşünülmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli husus olarak doğal ekzozomlara en benzer yapıyı elde etmek için diğer

yapıların üstün özellikleri göz önüne alınarak hibrit yapıların geliştirilmesine çalışılması gerekmektedir.

Tablo 2.1. Doğal eksozomlar ile Farklı Yapay Eksozom Türlerinin Karşılaştırılması

Eksozom Türü	Kaynak	Ölçek Büyütme	Prosedürler	Zaman Etkiflilik	İnsangücü	Karakterizasyon	Uygulanabilirlik
Doğal	Hücre Sıvısı	★	☆☆	☆☆☆☆	☆☆☆☆	★	★★
Yapay Eksozom (Top-Down)	Hücre	★★	☆☆	☆☆	☆☆	★	★★★
Yapay Eksozom (Bottom-Up)	Sentetik Malzeme	★★★	☆☆	☆	☆	★★	★
Yapay Eksozom (Bivohibrit)	Sentetik Malzeme ve Hücre Sıvısı	★★★	☆☆☆☆	☆☆☆☆	☆☆☆☆	★	★★★

☆ Bu yönün olumlu olduğunu belirtmek içindir

★ Bu yönün elverişsiz olduğunu belirtmek içindir

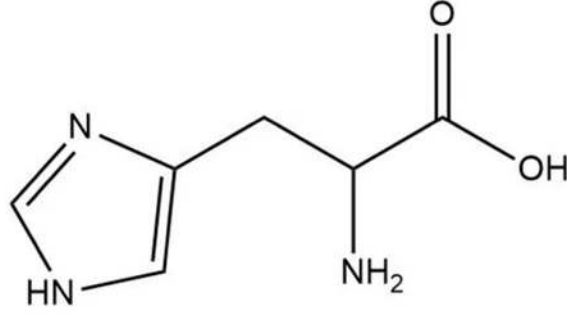
2.5.2. Yapay eksozom içerikleri ve L-Histidin yapısal özellikleri

Yapay eksozom olarak geliştirilen yapılarda önceki bölümlerde ayrıntılı bir şekilde söz edildiği gibi pek çok değişik biyolojik molekül (örneğin; proteinler, lipidler vb) yer almaktadır. Sunulan tez çalışması kapsamında model bir yapay eksozom geliştirilmesi adına belirtilen biyolojik molekülleri temsilen bir amino asit (L-Histidin) molekülü seçilmiştir. Bu amino asidin fizyolojik ortamdaki etkileşimleri araştırılarak geliştirilen manyetik özelliklere sahip HSA mikropartiküllere bağlanarak bulundukları ortamdan seçimli bir şekilde ayrıştırılmalarını sağlamak üzere metal-şelat afinite kromatografisi esaslı ayırma için bakır iyonlarının kullanılabilirliği dikkate alınarak HSA mikropartiküllerin bakır ile dekore edilmesi kararlaştırılmıştır.

L-Histidin; proteinlerin sentezinde yer alan temel amino asitlerden biridir ve yapısal olarak değerlendirildiğinde pozitif yüklü yan grup içeren amino asitlerden biridir. Yapısında her amino asit yapısında olduğu gibi fizyolojik koşullarda protonize bir amin grubu ile deprotonize bir karboksil grubunun yanı sıra kısmen protonize olmuş bir imidazol yan zinciri mevcuttur ve bu nedenle de fizyolojik pH değerlerinde pozitif yüklü amino asitler grubunda yer almaktadır. Sembolik olarak His veya H harfi ile gösterilmektedir.

Literatürde yapılan araştırmalara göre özellikle histidin amino asidinin divalent iyonlar (örneğin; Ni^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , and Zn^{+2}) ile şelat yapabilme yeteneğine sahiptir [34]. Bu nedenle yapılan çalışmalarda pratik ve ekonomik kullanımı nedeniyle bakır iyonlarının kullanılmasına karar verilmiş ve HSA mikropartiküllerin bakır ile dekore edilmesiyle

hazırlanan L-Histidin içeren yapay ekzozom yapılarının seçimli/hedefli olarak ayırma/safılaştırma prosesinde kullanılabilirliğinin araştırılmasına karar verilmiştir.



Şekil 2.5. L-Histidin yapısının şematik gösterimi

3. MATERİYAL METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

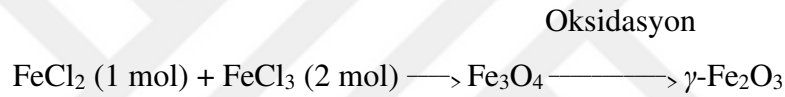
Tez kapsamında yapılan çalışmaların ilk bölümünde demir oksit nanopartiküllerin hazırlanmasında farklı iyonik yüklere sahip (+2 ve +3 yüklü) demir klorür tuzları (FeCl_2 ve FeCl_3 şeklinde) kullanılmıştır. Ortamın bazik hale getirilmesi ve ortak çöktürmenin sağlanmasında da amonyak (NH_3 , Merck, Almanya) ve nanopartiküllerin yıkanmasında da nitrik asit (HNO_3 , Merck, Almanya) kullanılmıştır. Çalışmaların ikinci bölümünde, mikropartikül hazırlamak üzere insan serum albümini, HSA ile çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit (% 25'lik, Merck, Almanya) kullanılmıştır. Dağıtma ortamı olarak da ayçiçek yağı (Komili, Türkiye) kullanılmıştır. Bu bölümde kullanılan ekipmanlar ise; mekanik karıştırıcı (IKA, Almanya), optik mikroskop olarak Olympus marka (CH 30, Japonya) ön izleme mikroskobu kullanılmıştır. Çalışmaların son bölümünde ise Lipoid S100 (LS100), Phospholipon 90G, P90G, kolesterol, DOTAP ve DOPE kimyasalları kullanılmıştır. Ayrıca bu bölümde ekipman olarak da Buchi marka (R-114, IKA RV 10 digital, Almanya) rotary evaporatör ve Bandelin Sonopuls marka (HD 2070, Almanya) sonikatör cihazları kullanılmıştır.

3.2. Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Günümüzde başta bilişim sistemlerinde bilgi depolama uygulamaları, değişik ayırma ve saflaştırma prosesleri, kimyasal ve biyolojik ajanların tespit edilmesi, ısıtma ve sıcaklık görüntüleme gibi proseslerde yaygın olarak kullanılan manyetik nanopartikül teknolojileri sektörel anlamda özellikle sağlık alanında çok sayıda ve önemli uygulama alanlarına sahiptir. Söz konusu manyetik özellikli nanopartiküllerin son yıllarda en yaygın olarak kullanılanları demir oksit nanopartiküller olmuştur [35]. Bu oluşumda demir ve oksijen atomları kimyasal olarak birleşerek demir oksitleri oluşturur ve tanımlanmış 16 dolayında demir oksit bileşiği olduğu bilinmektedir. Doğada demir (III) oksit pas şeklinde bulunur [36]. Genel olarak, demir oksitler ucuz olduklarından yaygın olarak kullanılmaktadırlar ve birçok biyolojik ve jeolojik süreçte zorunlu bir rol oynamaktadırlar. Doğada en yaygın olarak bulunan üç farklı demir oksit türü olduğu bildirilmektedir ve bunlar sırasıyla; manyetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) şeklindedir.

3.2.1. Demir oksit nanopartiküllerin sentezi

Sunulan çalışmalarda literatürde yer alan değişik biyolojik, fiziksel ve kimyasal demir oksit nanopartikül üretim yöntemlerinden en yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntemlerden biri olan ve değişik yüklere sahip demir klorür tuzlarının reaksiyonu ile elde edilen demir oksit nanopartikül sentez yöntemi kullanılmıştır [37]. Bu yöntemin seçilmesinin nedeni diğer tüm yöntemler arasında çoğunlukla düşük üretim maliyeti ve yüksek verimli üretim prosesine sahip olmasıdır. Yapılan deneysel çalışmalarda temel olarak Tablo 3.1.'de verildiği gibi değişik oranlarda (1:4-1:2-1:1 mol oranında gibi) sulu Fe^{2+} ve Fe^{3+} klorür tuzlarından oluşan karışımlara bir baz (NaOH gibi) eklenerek hedeflenen demir oksitler sentezlenmiş ve reaksiyon sonunda oluşan siyah renkli partiküller prosesin başarıyla sonuçlandırıldığının işareti olarak kabul edilmektedir. Burada gerçekleşen örnek bir reaksiyon aşağıda sunulmuştur, bu reaksiyonun devamında görüldüğü gibi Fe_3O_4 'in yeniden okside olması sonucu γ - Fe_2O_3 oluşmaktadır.

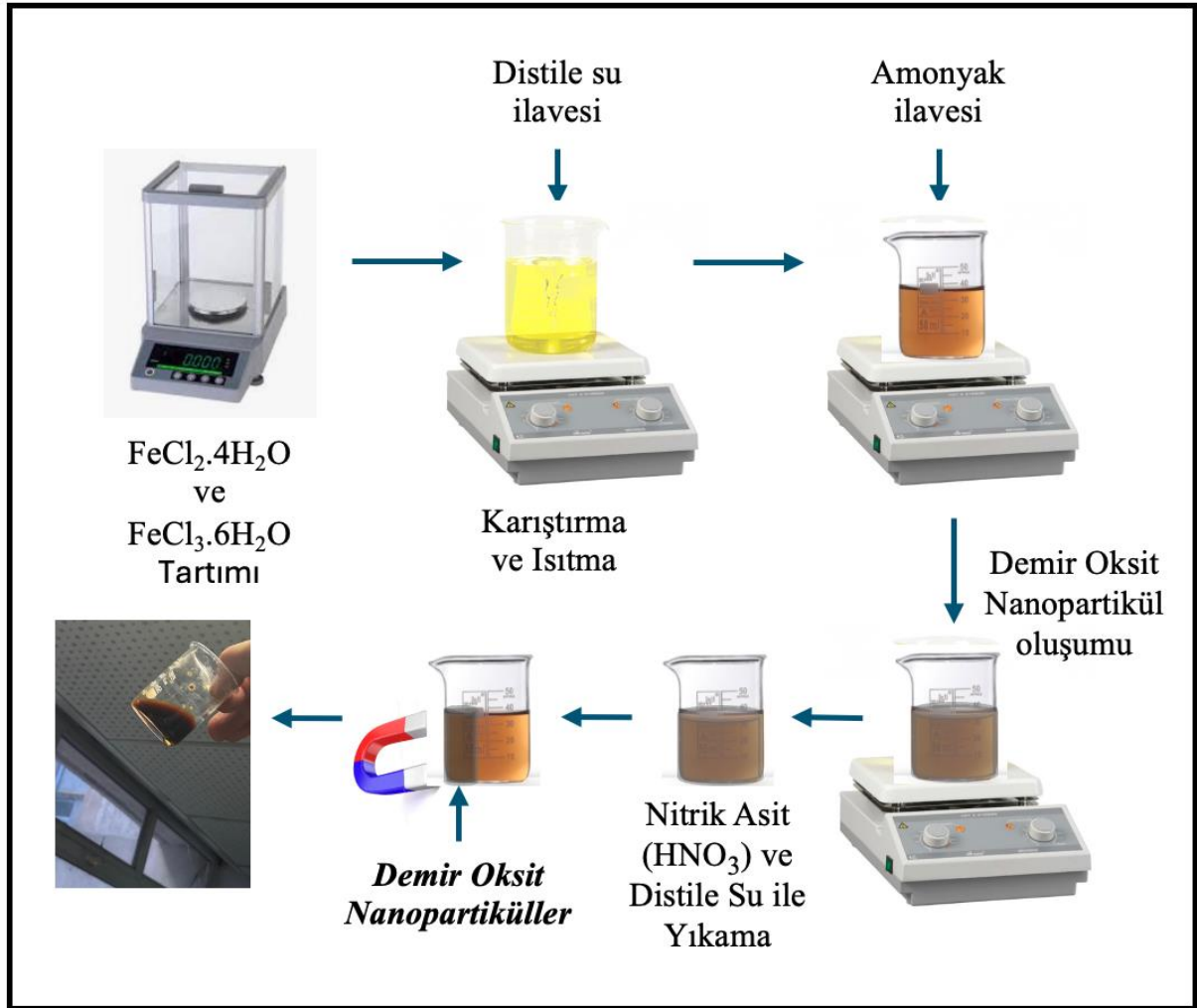


Tablo 3.1. Demir Oksit Nanopartikül Hazırlama Koşulları/Parametreleri

Örnek No	$FeCl_2$ (g)	$FeCl_3$ (g)	Fe^{2+} : Fe^{3+} (mol:mol)
1	0,126	0,162	1:1
2	0,126	0,324	1:2
3	0,063	0,324	1:4

Yapılan çalışmalarda tipik bir prosedüre göre (Şekil 3.1.); ilk olarak $FeCl_2:FeCl_3$ (Merck, USA) mol oranı 1:2 olacak şekilde (bu amaçla sırasıyla 0,126 g $FeCl_2$ ve 0,324 g $FeCl_3$ tartılmış ve her ikisi 1'er ml kaynamış su içerisinde çözünmüştür. Daha sonra 100 ml'lik beher içerisine alınan bu çözeltilerin üzerine 7 ml kaynar su ilave edilmiş ve karışım bir manyetik karıştırıcı ile 5 dakika karıştırılmış ve sıcaklık $85^\circ C$ 'ye çıkarılmıştır. Karıştırma esnasında ortam pH değerinin 9,3-9,4 değerine ulaşmasını sağlamak üzere çözelti karışımın üzerine damla damla amonyak (NH_3) çözeltisi (Merck, USA) damla damla ilave edilmiştir. Bu işlem esnasında amonyak damlatıldıkça belli bir süre sonra çözelti rengi siyaha dönmeye

başlamış ve siyah renk kalıcı olduğu anda amonyak ilavesine son verilmiş ve bu dönüşümün birlikte çöktürme reaksiyonunun tamamlandığını göstermektedir. Bu işlemden sonra demir oksit nanopartiküllerinin kararlı bir şekilde oluşumu için çözelti 1 saat boyunca 90°C'de ısıtmaya devam edilmiştir. Daha sonra, demir oksit çözeltisinin süpernatant kısmı güçlü bir mıknatıs kullanılarak boşaltılmış ve geriye kalan demir oksit nanopartiküller iki kez distile su kullanılarak yıkanmıştır. Elde edilen demir oksit nanopartiküllerin amonyaktan arındırılması için 3 ml 2 M HNO₃ çözeltisi nanopartiküllerin üzerine ilave edilmiş ve karışım 10 dakika daha karıştırılmaya devam etmiştir. Bu işlem sonunda elde edilen demir oksit nanopartiküller bol distile su ile yıkanmış ve elde edilen demir oksit nanopartikül çözeltisi sonraki işlemlerde kullanıma kadar 4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Demir oksit nanopartiküllerin sentezi için uygulanan işlem basamakları

3.2.2. Demir oksit NP'lerin karakterizasyonu

Kimyasal yöntemlerden birlikte çöktürme yöntemiyle hazırlanan demir oksit nanopartiküllerin karakterizasyonunda sırasıyla fizikokimyasal, morfolojik ve manyetiklik

özellikleri optimum özelliklere sahip demir oksit nanopartiküllerin belirlenmesi için incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Demir oksit NP'lerin fizikokimyasal değerlendirmeleri

Sentezlenen demir oksit nanopartikül numunelerinin fizikokimyasal karakterizasyonunda FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bir Nicolet iS 50 model fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spektroskopi, FTIR) kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda tüm spektrumlar iletim modunda 500 ila 4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığına 4 cm^{-1} çözünürlük ile kaydedilmiştir.

Demir Oksit NP'lerin Morfolojik Değerlendirmeleri

Hazırlanan demir oksit nanopartiküllerin boy-boy dağılımları ve polidispersite indeksleri (PDI) dinamik ışık saçılması, DLS (Dynamic Light Scattering, Malvern 3000, UK) kullanılarak belirlenmiştir. Analizden önce nanopartiküller distile su ile seyreltilmiş ve tüm boy-boy dağılımı ölçümleri, 25°C'de üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Demir oksit NP'lerin manyetiklik özelliklerinin değerlendirmeleri

Hazırlanan demir oksit nanopartiküllerin manyetiklik özellikleri elektron spin rezonans (ESR, Bruker EMX 131 X-band) sistem, kullanılarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu analizlerde numuneler boşluğu homojen olan elektromıknatısın kutupları arasına yerleştirilmiş ve değeri doğrusal olarak değişen harici bir manyetik alan oluşturularak veriler elde edilmiştir. Bu çalışmalarda mikrodalga frekansı 9.3 GHz değerinde sabit tutularak değişen manyetik alan içerisinde elde edilen absorpsiyon eğrisinin birinci türevi şeklinde çizilen ESR spektrumları oluşturulmuştur.

3.3. HSA Mikropartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Albümin (insan serum albümini, HSA) mikroküreler emülsiyon ortamında çapraz bağlanma tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda HSA mikropartiküllerin boy-boy dağılımını ve morfolojilerini etkileyen bazı değişkenler/parametreler incelenmiştir. Tipik bir prosedüre göre önce 0,5 ml HSA çözeltisi (200 mg/ml HSA derişimine sahip) yaklaşık 1000 rpm karıştırma hızına sahip bir karıştırıcıda karışmakta olan ve 25 ml Ayçiçek Yağı (Komili, Türkiye) içeren ortama damla damla ilave edilmiş ve 30 dakika süreyle karıştırmaya devam edilmiştir. Emülsiyonun halinde bulunan HSA mikro damlacıkların çapraz bağlanması için emülsiyona ortamına farklı oranlarda (%0,25'lik) glutaraldehit'ten 2 ml kadar ilave edilmiştir. HSA mikropartiküllerin stabilizasyonu için karıştırma işlemine bir saat devam edilmiştir. HSA

mikropartiküllerin üzerinden fazla GA'in ve ayçiçek yağının uzaklaştırılması için yaklaşık 30 ml dietil eter ilave edilerek mikropartiküller yıkanmıştır.

3.3.1. HSA mikropartiküllerin morfolojik olarak değerlendirilmesi

Hazırlanan HSA mikropartiküllerin morfolojik incelemeleri mikropartiküllerin boy-boy dağılımları mikrometre ölçekli olduğundan hem optik mikroskop hem de taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM, Jeol, Japonya) kullanılarak incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Bu bölümde hazırlanan HSA mikropartiküller damlalık yardımıyla optik mikroskop lameli üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuş ve optik mikroskopta boy-boy dağılımı analizleri yapılmak üzere mikrofotografları çekilmiştir. Elde edilen fotoğraflardan belli sayıda (50-10 adet) mikropartikül çapları belirlenerek ortalama çapları hesaplanmıştır. HSA mikropartiküllerin morfolojik yapılarının değerlendirilmesinde kullanılan SEM fotoğrafları çekilmeden önce, tüm numuneler ince bir Pt/Pd tabakası ile kaplanmıştır. Söz konusu değerlendirmeler elde edilen fotoğraflar ile yapılmış ve numunelerin kimyasal bileşimi SEM çekimleri ile eş zamanlı olarak alınan enerji dağılım spektroskopisi (EDX) ile analiz edilmiştir.

3.3.2. HSA mikropartiküllere demir oksit nanopartikül yüklenmesi

Demir oksit nanopartikülleri içeren, bir başka deyimle manyetik özellikli HSA mikropartiküllerin hazırlanmasında da boş (herhangi bir başka madde/malzeme içermeyen) HSA mikropartiküllerin hazırlanmasına benzer şekilde bir prosedür izlenmektedir. Bu yöntemle göre yine önce 0,5 ml HSA çözeltisi (200 mg/ml HSA derişimine sahip) ve 0,5 ml kadar demir oksit nanopartikül içeren çözeltiden bir araya getirilerek karıştırılır ve homojenizatörde homojen hale getirilir ve yaklaşık 1000 rpm karıştırma hızına sahip bir karıştırıcıda karışmakta olan ve 25 ml Ayçiçek Yağı (Komili, Türkiye) içeren ortama damla damla ilave edilmiş ve 30 dakika süreyle karıştırmaya devam edilmiştir. Emülsiyonun halinde bulunan HSA mikro damlacıkların çapraz bağlanması için emülsiyona ortamına farklı oranlarda (% 0,25'lik) glutaraldehit'ten 2 ml kadar ilave edilmiştir. HSA mikropartiküllerin stabilizasyonu için karıştırma işlemine bir saat devam edilmiştir. HSA mikropartiküllerin üzerinden fazla GA'in ve ayçiçek yağının uzaklaştırılması için yaklaşık 30 ml dietil eter ilave edilerek mikropartiküller yıkanmıştır.

Demir oksit nanopartikülleri içeren HSA mikropartiküllerin hazırlanması çalışmalarında farklı manyetiklik özelliğine sahip HSA mikropartiküllerin hazırlanması

alışmalarında 0,25 ve 1 ml demir oksit çözeltisi ilave edilerek HSA mikropartiküller hazırlanmış ve bu değışikliklerin HSA mikropartikül morfolojisine, boy-boy dağılımına ve manyetiklik özelliğı değışimlerine etkileri incelenmiştir.

HSA mikropartiküllerin morfolojik değlendirmeleri

Hazırlanan manyetik özellikli HSA mikropartiküllerin morfolojik incelemeleri yapılırken de mikropartiküllerin boy-boy dağılımları hem optik mikroskop hem de taramalı elektron mikroskobu (SEM, Jeol, Japonya) kullanılarak incelenmiştir.

HSA mikropartiküllerin manyetiklik özelliklerinin belirlenmesi

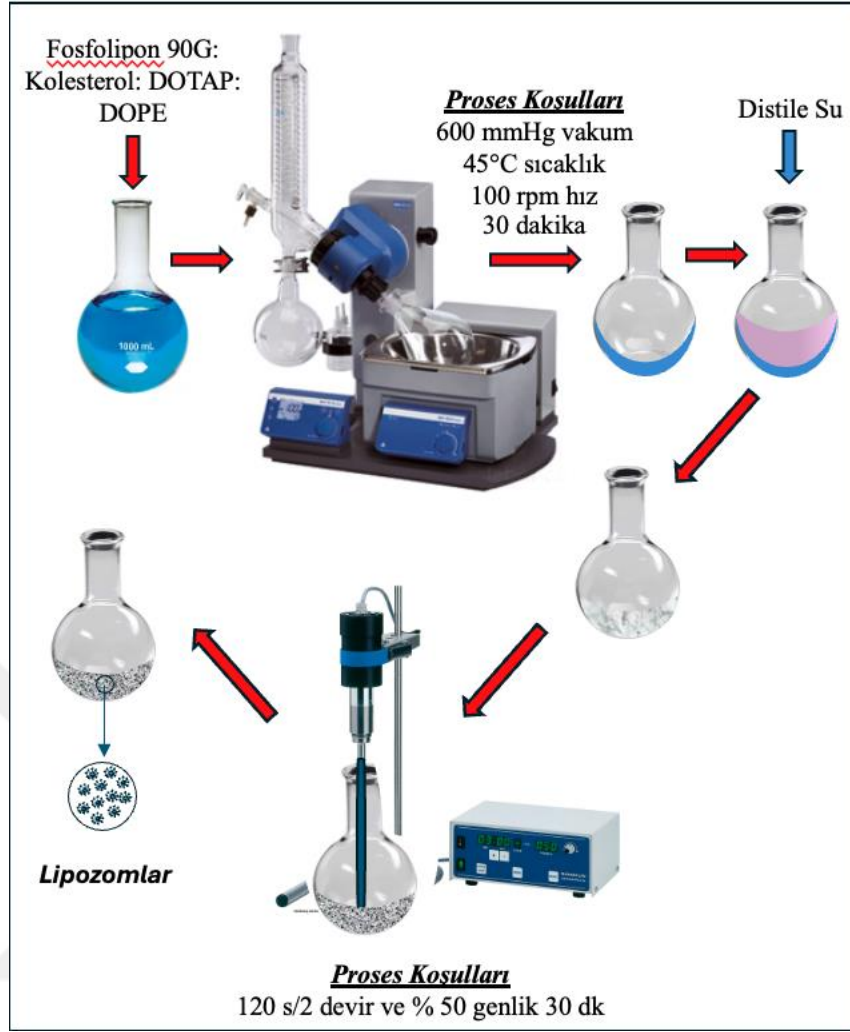
3.4. HSA Mikropartiküller ile Ekzozom Ayırma ve Saflaştırma

3.4.1. Lipozomların hazırlanması

Yapılan deneysel çalışmalarda lipozomlar hazırlanmadan önce konu ile ilgili olarak yapılan önceki çalışmalar değlendirilmiş [38], en düzgün ve istenilen boyutlarda lipozomal yapılar elde edebilmek üzere yapılan optimizasyon çalışmaları gözden geçirilmiştir. Yapılan değlendirmelere göre burada seçilen iki önemli parametreden biri reaksiyon kabı olarak 100 ml’lik yuvarlak tabanlı şişe ve boyut ayarlamak için de sonikasyon süresi olarak 30 dk’lık sürenin seçilmesine karar verilmiştir.

Lipozom formülasyonunun hazırlanmasında yukarıda belirtilen çalışmaya göre, optimize edilmiş bir lipit karışımı (Fosfolipon 90G: Kolesterol: DOTAP: DOPE, - 74:17:4.5:4.5 mol%) kullanılarak ince film hidrasyon yöntemi ile gerekli üretim yapılmıştır. Burada ilk olarak, lipitler ve kolesterol 12,5 mL kloroform içinde çözölmüş ve organik çözücü, bir döner şişe buharlaştırıcı (Ika RV 10 döner buharlaştırıcı; IKA®-Werke GmbH & A.Ş., Staufen, Almanya) kullanılarak ince bir lipit filmi elde etmek üzere yaklaşık 600 mmHg vakum ve 45°C sıcaklık, 100 rpm hızda 30 dakika süreyle buharlaştırılmıştır. İnce film, tüm organik çözücü kalıntılarını gidermek üzere ortama yavaş yavaş azot gazı ilave edilerek yıkanmıştır. Uygulanan işlem basamakları Şekil 3.3.’te şematik olarak özetlenmiştir.

Hedeflenen lipozomal yapılar ultrasonikasyon işlemi (Bandelin Sonopuls HD 2070, Almanya) sonucunda 120 s/2 devir ve % 50 genlik 30 dk uygulanarak oluşturulmuştur.

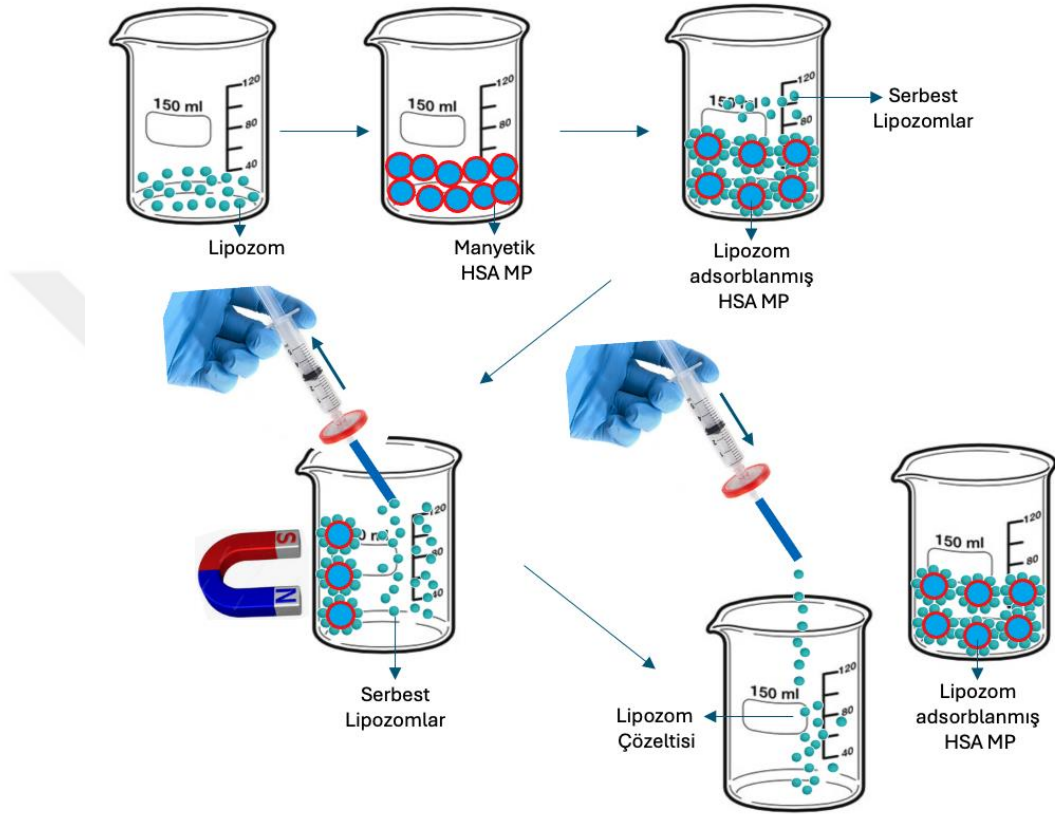


Şekil 3.2. Lipozomal yapıların hazırlanmasında kullanılan işlem basamakları

3.4.2. Lipozomların manyetik HSA mikropartiküller ile ayrıştırılması

Yapılan lipozom ayırma/saflaştırma çalışmalarında iki farklı formülasyon (hammadde grubu) ile hazırlanan ve karakterize edilen lipozomal yapıların sahip oldukları pozitif yükler (katyonik yapılar) ve HSA mikropartiküllerin yüzeyindeki negatif yükler (anyonik yapılar) sayesinde meydana gelecek olan elektrostatik etkileşimler ile lipozomların bulundukları ortamdan izole edilmesi/ayrıştırılması ve saflaştırılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.). Bu kapsamda hazırlanan deney gruplarında bir kontrol grubu (sadece lipozomların bulunduğu), HSA mikropartiküller ile etkileştirilen lipozomlar, demir oksit NP içeren HSA mikropartiküller ile etkileştirilmiş lipozomlar ve son olarak da demir oksit NP'ler ile etkileştirilmiş olan lipozomların yer aldığı örnekler hazırlanmıştır (Tablo 3.1 ve 3.2). Her bir stok çözeltiden alınan 1'er ml'lik örneklerin üzerine 1'er ml lipozom örnekleri ilave edilmiş ve bu örneklerle ilave edilen 4'er ml distile su ile nihai örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler uygun deney tüplerine ve bu tüplerle bir rotatöre yerleştirildikten sonra

yaklaşık 1 saatlik adsorpsiyon süresi boyunca döndürülmüşlerdir. Yapılan deneysel çalışmalarda ayrıca adsorpsiyon mekanizmasını anlayabilme adına demir oksit içeren HSA mikropartiküller ile zamana karşı adsorpsiyon denemeleri de gerçekleştirilerek adsorpsiyon izotermeleri elde edilmeye çalışılmıştır. Bu maksatla adsorpsiyon deneyleri değişik sürelerde (30, 60 ve 120 dk olmak üzere) değiştirilmiştir.



Şekil 3.3. Lipozomların demir oksit içeren HSA mikropartiküller ile ayırma işlemleri

Tablo 3.2. Lipozom Ayırma-safılaştırma Çalışmalarında Kullanılan Örnekler

Örnek No	Formülasyon	Örnek Tanımı
1	LS100	Sadece LS100 esaslı lipozom içeren
2	HSA MP+LS100	HSA MP ve LS100 esaslı lipozom içeren
3	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+LS100	Fe ₃ O ₄ NP içeren HSA MP ve LS100 esaslı lipozom içeren
4	Fe ₃ O ₄ NP+LS100	Fe ₃ O ₄ NP ve LS100 esaslı lipozom içeren
5	P90G	Sadece P90G esaslı lipozom içeren
6	HSA MP+P90G	HSA MP ve P90G esaslı lipozom içeren
7	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+P90G	Fe ₃ O ₄ NP içeren HSA MP ve P90G esaslı lipozom içeren
8	Fe ₃ O ₄ NP+P90G	Fe ₃ O ₄ NP ve P90G esaslı lipozom içeren

Tablo 3.3. Adsorpsiyon Kinetiği Belirlenmesinde Kullanılan Örnekler

<i>Örnek No</i>	<i>Formülasyon</i>	<i>Adsorpsiyon Süresi (dk)</i>
9	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+ LS100	30
3	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+LS100	60
10	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+ LS100	120
<i>Örnek No</i>	<i>Formülasyon</i>	<i>Adsorpsiyon Süresi (dk)</i>
11	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+ P90G	30
7	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+P90G	60
12	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+ P90G	120

Yapılan deneysel çalışmalardan sonra elde edilen serbest lipozomlar ortamdaki ayırıştırılarak (burada HSA mikropartikül içeren örnekler steril filtreler-450 nm göz açıklığına sahip, demir oksit NP içeren HSA ve sadece demir oksit içeren NP'ler mikropartiküller ise manyetik alan etkisi-sabit bir magnet kullanılarak) ortamdaki izole edilmişlerdir. Sonuç olarak elde edilen serbest lipozomların sayıları NTA cihazı ile sayılarak yapılan deneysel çalışmalarda bulundukları ortamdaki saflaştırılabilen lipozom miktarları belirlenmiş ve gerekli değerlendirmeler bu rakamlar üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Burada lipozomların miktarı (partikül/ml) ve ortalama çapını (nm) olarak belirlemek üzere nanoparçacık izleme analizini (NTA) sistemi (Malvern Panalytical NanoSight, NS300, UK) kullanılmıştır. Kullanılan NTA sistemi, lipozomların 10-1000 nm aralığında görsel olarak izlenmesini ve nicelleştirilmesini kolaylaştırarak miktarlarının doğru ölçümünü sağlamıştır. Hedeflenen miktarların sağlıklı ölçümü için örnekler 2000 kat seyreltilmiş ve lipozom yakalama süresi 30 s olarak ayarlanmıştır.

3.4.3. Yapay ekzozom model çalışmaları

Bu bölümde tez çalışmalarının önceki bölümlerinde geliştirilen lipozomal yapıları model biyolojik yapı olarak L-histidin (Sigma, US) ilavesi gerçekleştirilerek basit bir yapay ekzozom modeli geliştirilmiştir. Bu kapsamda kullanılması planlanan lipozomal yapılar temel olarak iki farklı yöntem ile sentezlenmiş ve ayrıca kullanılan yöntemlerden biri ile bir diğeri ile iki farklı formülasyon olmak üzere toplam üç farklı formülasyon geliştirilmiştir.

Daha sonra geliştirilen bu farklı formülasyonların ayırma saflaştırma işlemleri için geliştirilmiş olan demir oksit nanopartikülleri içeren HSA mikropartiküller ile yapılması planlanan çalışmalara geçilmiştir. Bu bölümde de L-histidin afinitesi olduğu bilinen divalent katyonlardan (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} gibi) [39] Cu^{2+} seçilerek hazırlanan albümin mikropartiküllere Cu^{2+} ilavesi gerçekleştirilmiştir [40]. Çalışmaların son bölümünde hazırlanan albümin mikropartiküllere söz konusu bakır ilavesinin L-histidin ayırma ve saflaştırma prosesine etkileri araştırılmıştır.

L-Histidin içeren Lipozom formülasyonlarının hazırlanması

Lipozom formülasyonları ince tabaka hidrasyon metodu kullanılarak hazırlanmıştır. Fosfolipit ve kolesterol yuvarlak tabanlı cam balon içerisinde 15 ml kloroform kullanılarak çözülmüş ve rotavaporda düşük basınç altında organik çözücü uzaklaştırılarak ince lipid tabaka oluşturulmuştur. Rehidrasyon adımı 10 ml sulu faz, ince lipid tabaka üzerine eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla tüm lipid tabaka hidrate edilmiştir. Boyut kontrolü ve optimizasyonu için 5 dk 2 döngü/dk %50 güç koşullarında sonikasyon uygulanmıştır. Hidrofilik yapıdaki etkin maddelerin ve/veya bileşenlerin lipozom yapısına katılması için iki farklı yöntem kullanılmıştır (Tablo 3.3.).

- Rehidrasyon adımı bileşenlerin sulu fazda çözülerek bu bileşenlerin lipozomun hidrofilik çekirdek kısmına yüklenmesini sağlayan yöntem
- Lipozom yapısının etkin bileşeni içermeyen sulu faz ile oluşturulduğu boş lipozom formülasyonuna etkin maddenin eklenip çalkalandığı (1 saat), böylece etkin bileşenin adsorpsiyon ile lipozom yapısına katıldığı yöntem

Bu yöntemler ile 3 farklı formülasyon hazırlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonların terkihi ve formülasyonlara ait DLS yöntemi ile elde edilen partikül büyüklüğü (PS, nm), partikül büyüklük dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel (ZP, mV) verileri ortalama ve standart sapma olarak tabloda sunulmuştur.

Tablo 3.4. Yapay Ekzozom Hazırlanmasında Kullanılan Formülasyonlar

Formülasyon	İçerik
Formülasyon 1 (Histidin Rehidrasyonda eklendi)	Lipoid S100: 50 mg, Kolesterol: 6 mg, HisTAG: 20 µg/mL
Formülasyon 2 (Histidin Rehidrasyonda eklendi)	Lipoid S100: 45 mg, DSPE-PEG2000: 5 mg, Kolesterol: 6 mg, HisTAG: 20 µg/mL
Formülasyon 3 (Histidin Adsorpsiyonla eklendi)	Lipoid S100: 50 mg, Kolesterol: 6 mg, HisTAG: 20 µg/mL

Fe₃O₄ nanopartikül içeren HSA mikropartiküllere bakır ilavesi

Bu bölümde yapılan çalışmalarda; literatürde yapılan benzer çalışmalar dikkate alınarak [41] Fe₃O₄ nanopartikül içeren HSA mikropartiküllere bakır ilave etmek üzere bakır sülfat CuSO₄.5H₂O çözeltisi kullanılmış ve sonrasında bakır iyonlarının yüzeye depozit edilebilmesi için NaOH çözeltisi ile yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. HSA mikropartikülleri 0.1 M derişiminde hazırlanan CuSO₄.5H₂O çözeltisinde 15 dakika karıştırılmış ve sonrasında partiküller bu çözeltiden alınarak 0.1 M derişiminde NaOH çözeltisinde 15 dakika karıştırılmıştır. Sonrasında HSA mikropartikülleri çözeltiden çıkarılarak buzdolabında saklanmıştır. Böylelikle CuO'in, HSA mikropartiküllerine tutunması sağlanmış ve Cu⁺² iyonlarının mikropartiküllerin yüzeyinde biriktirilmesi sağlanmıştır.

Fe₃O₄ NP içeren/bakırlı HSA mikropartiküller ile L-Histidin ayırma işlemleri

Bu bölümde demir oksit NP içeren HSA mikropartiküller ile bu formülasyonun bakır ilavesi yapılmış olanlar ile karşılaştırmalı olarak model yapay lipozomlar (L-Histidin içeren) ile etkileştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan tüm formülasyonlar Tablo 3.4.'de sunulmuştur. Deneysel çalışmalarda; her bir stok çözeltiden alınan 1'er ml'lik örneklerin üzerine 1'er ml lipozom örnekleri ilave edilmiş ve bu örneklerle ilave edilen 4'er ml distile su ile nihai örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler uygun deney tüplerine ve bu tüplerle bir rotatöre yerleştirildikten sonra yaklaşık 1 saatlik adsorpsiyon süresi boyunca döndürülmüşlerdir. Yapılan deneysel çalışmalarda bakırın adsorpsiyon üzerine etkileri araştırılmıştır.

Tablo 3.5. Yapay Ekzozom Hazırlanmasında Kullanılan Formülasyonlar

<i>Lipozom Formülasyonu/Adsorbent Özellikleri</i>	Lipozom/HSA Mikropartikül Miktarı (ml)	İlave Edilen Saf Su (ml)
<i>LS100/His(R)</i>	1/0	5
<i>LS100+PEG/His(R)</i>	1/0	5
<i>LS100/His(Adsorption)</i>	1/0	5
<i>Bakır içermeyen HSA Mikropartiküller</i>		
<i>LS100/His(R)+HSA/Fe₃O₄NP</i>	1/1	4
<i>LS100+PEG/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	1/1	4
<i>LS100/His(Adsorption)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	1/1	4
<i>Bakır içeren HSA Mikropartiküller</i>		
<i>LS100/His®+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	1/1	4
<i>LS100+PEG/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	1/1	4
<i>LS100/His(Adsorption)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	1/1	4

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Demir Oksit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

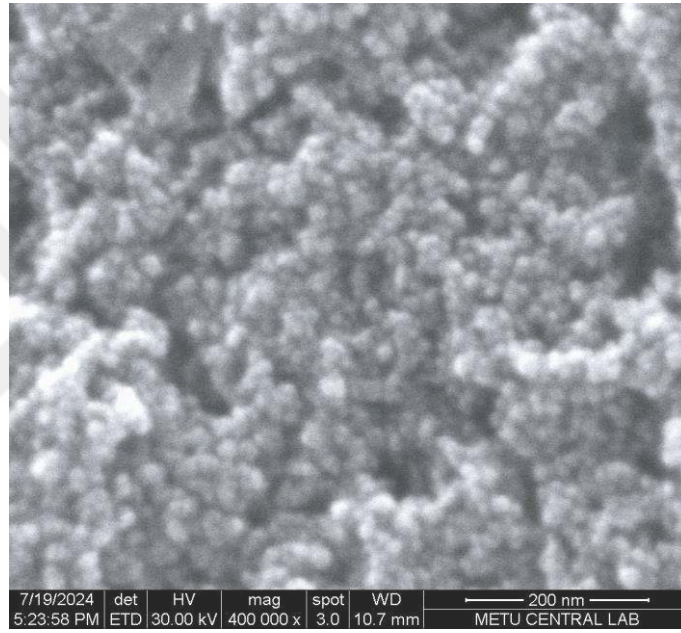
Sunulan tez kapsamında manyetik özellikli HSA mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılmak üzere öncelikle literatürde daha önce yapılan çalışmalar dikkate alınarak nano ölçekli demir oksit nanopartiküllerin hazırlanması planlanmıştır [35]. Bu kapsamda konu ile ilgili olarak en yaygın olarak kullanılan ve yöntemsel kolaylıklar, ekonomik üstünlükler ve pek çok değişik uygulamada kendini ispatlamış olan demir klorür tuzlarından yararlanılarak demir oksit nanopartiküllerin elde edilmesi sağlanmıştır [38]. Söz konusu yöntemin temeli farklı iyonik karaktere sahip olan demir klorür tuzlarının bazik ortamda ortak çöktürülmesiyle katı formda ve nano ölçekli demir oksit nanopartiküllerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır.

Çalışmalar kapsamında hazırlanan demir oksit nanopartiküller öncelikle morfolojik olarak değerlendirilmiş ve ardından demir oksit nanopartiküllerin hedeflenen boy-boy dağılımında elde edilebilmesi için gerçekleştirilen parametre değerlendirmelerine tabi tutulmuştur. Bu bölümde de konu ile ilgili olarak gerçekleştirilen literatür taramalarına göre en etkin parametre olan ve yöntem kapsamında kullanılan farklı iyonik karakterde olan demir klorür çözeltilerinin oranları değiştirilerek farklı özelliklere sahip demir oksit nanopartiküllerin hazırlanması sağlanmıştır.

4.1.1. Demir oksit nanopartiküllerin morfolojik değerlendirilmesi

Tez çalışmaları kapsamında ortak çöktürme yöntemi ile hazırlanmış olan demir oksit nanopartiküllerin şekilsel ve geometrik özelliklerinin yanı sıra boy-boy dağılımları hakkında gerekli morfolojik değerlendirmeleri yapmak üzere hazırlanan nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu yardımıyla görüntüleri alınmış ve elde edilen bulgulara örnek olarak alınan görüntülerden biri Şekil 4.1.'de verilmiştir. SEM fotoğrafından da görüldüğü gibi elde edilen demir oksit nanopartiküller yaklaşık olarak 10-20 nm boy aralığında oldukları gözlemlenmiştir. Burada hazırlanan demir oksit nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan demir klorür tuzlarının oranlarına bağlı olarak değişim göstermekte olduğu ve ilgili kaynaklarda hazırlanan benzer demir oksitlerin genel boy-boy dağılımı değerlerinin (SEM cihazı yardımıyla yapılan ölçümlere göre) benzer aralıklarda olduğu belirlenmiştir [38]. Burada elde edilen en önemli bulgulardan biri hazırlanan demir oksit nanopartiküllerin oldukça homojen bir boy dağılımına sahip olması ve hazırlanan bu manyetik özellikli

nanopartiküllerin genel olarak birbirleri ile agrega olmaları/yığın yapılar oluşturma eğiliminde oldukları anlaşılmıştır. Bu bulgulardan sahip olunan homojen sayılabilecek boy dağılımlarının elde edilmesi bir sonraki aşamada HSA mikropartiküllerin hazırlanmasında manyetiklik özelliği kazandırmak üzere kullanılacak olmalarından dolayı hedeflenen homojen boyutlu HSA mikropartiküllerin kolaylıkla ve istenilen özelliklerde hazırlanabilmesi adına önem taşıdığı düşünülmektedir. Ayrıca diğer bir özellik olan yığın yapı oluşturma eğiliminin bir sonraki karakterizasyon çalışması olan boy-boy dağılımı belirleme çalışmalarında elde edilen bulgular ile uyum içerisinde olduğu anlaşılmış ve elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.



Şekil 4.1. Demir Oksit Nanopartiküllerin SEM fotoğrafı

4.1.2. Demir oksit nanopartiküllerin boy-boy dağılımları

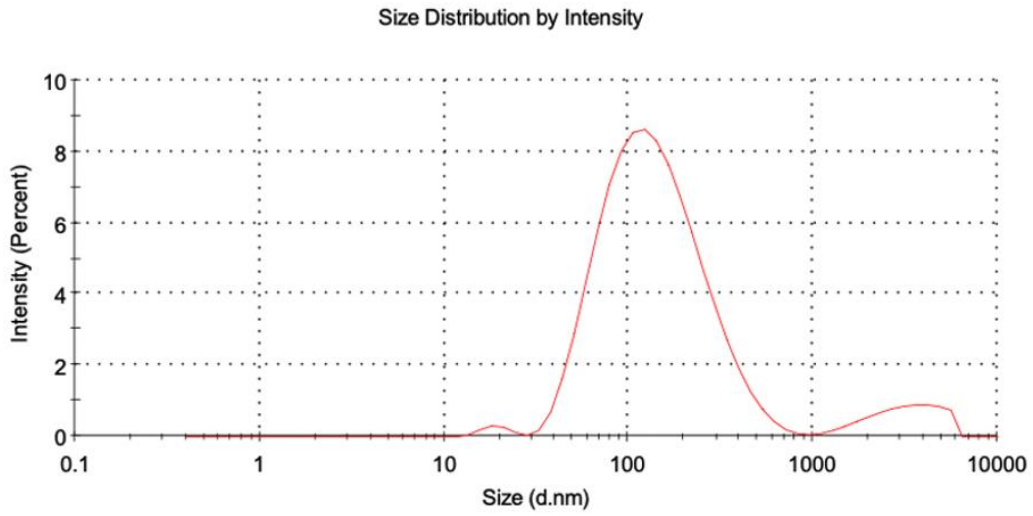
Yapılan çalışmalar kapsamında hazırlanan demir oksit nanopartiküllerin boy-boy dağılımlarının belirlenmesinde parçacık boyut analiz cihazı olarak dinamik ışık saçılması (Dynamic Light Scattering, DLS) sistemi kullanılarak hazırlanan ve distile su ile yıkanan demir oksitlerin boy-boy dağılım değerleri ölçülmüş ve elde edilen bulgular ile ilgili örnek bir diyagram Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

System

Temperature (°C): 25.0
Count Rate (kcps): 222.6
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Duration Used (s): 70
Measurement Position (mm): 0.85
Attenuator: 6

Results

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 121.2	Peak 1: 158.5	91.7	107.2
Pdl: 0.342	Peak 2: 3303	7.3	1277
Intercept: 0.944	Peak 3: 19.34	1.0	3.394
Result quality : Good			



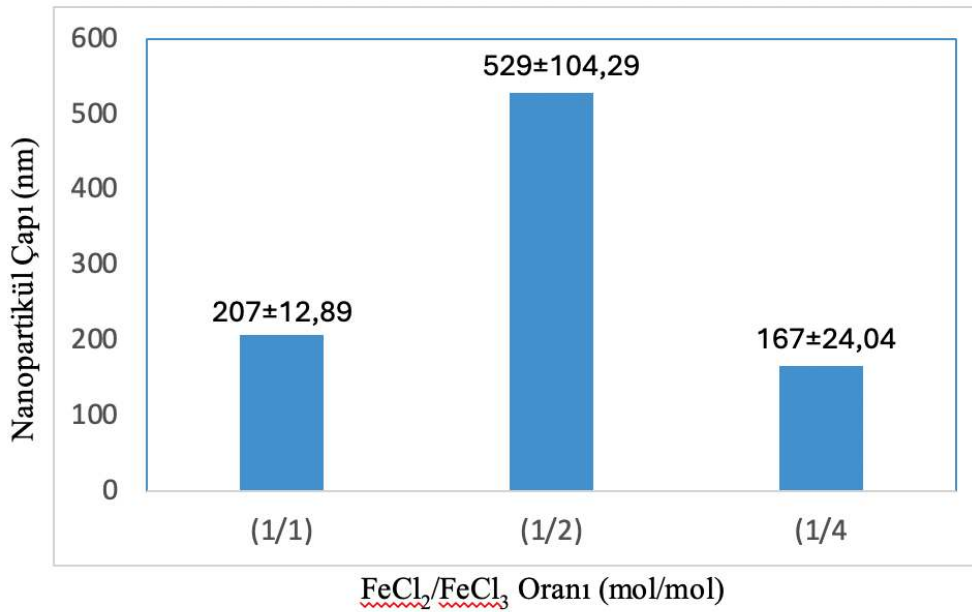
Şekil 4.2. Demir Oksit Nanopartiküllerin SEM fotoğrafı ($\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ mol/mol oranı: 1/4)

Elde edilen verilerin ışığında her bir $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ oranı (1/1, 1/2 ve 1/4) için benzer bulgular elde edilmiş ve bir sonraki bölümde elde edilen değerler ile söz konusu tuzların oranlarının nanopartikül boy-boy dağılıma etkileri incelenmiştir.

4.1.3. Demir oksit nanopartiküllerin boy-boy dağılımına demir tuzlarının etkisi

Çalışmalar kapsamında ortak-çöktürme yöntemiyle hazırlanan demir oksit nanopartiküllerin boy-boy dağılımlarına etki eden parametrelerden bazıları; nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan ortamın pH'ı, dağıtma ortamının karıştırılması/homojenize edilmesi, kullanılan demir klorür tuzlarının derişimleri ve oranları gibi parametrelerdir [37]. Sunulan tez kapsamında belirtilen parametrelerden sadece en radikal değişimlerin beklendiği demir klorür tuzlarının oranları olarak seçilmiştir. Bunun temel nedeni de sunulan çalışmaların temel amacı söz konusu demir oksit nanopartiküllerin görevi hazırlanacak olan manyetik özellikli HSA mikropartiküllere söz konusu manyetiklik özelliğinin kazandırılmasıdır. Bir başka deyimle hedeflenen ekzozom ayırma-saflaştırma

işlemlerinde kullanılması planlanan hedef ürün HSA mikropartiküller olduğundan sadece uygun boy-boy dağılımına sahip manyetik özellik gösterebilen demir oksit nanopartikül örneklerinin bu görevi yerine getirmelerinin yeterli olacağı düşünülmüştür. Bu kapsamda demir oksit nanopartiküllerin hazırlanmasında $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ mol oranı olarak 1/1, 1/2 ve 1/4 değerlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu aşamada literatürde yer alan benzer çalışmalar temel alınmıştır [42]. Belirtilen tuz oranları kullanılarak ortak çöktürme yöntemiyle hazırlanan demir oksit nanopartiküllerin boy-boy dağılımları yine dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi ile belirlenmiş ve elde edilen ortalama demir oksit nanopartikül boy-boy dağılımı değerleri Şekil 4.3.'te sunulmuştur.



Şekil 4.3. Demir Tuzları Derişiminin Demiroksit Nanopartikül Boy-Boy Dağılımına Etkisi

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde Şekil 4.3.'te de görüldüğü gibi Fe^{+2} iyonlarının oluşumunu sağlayan FeCl_2 tuzunun miktarı arttıkça başlangıçta oluşan demir oksit nanopartiküllerin boyları artmakla beraber söz konusu tuzun miktarı daha da arttığında oluşan nanopartiküllerin boylarında azalma gözlenmiştir. Burada elde edilen bu eğilimin ilgili kaynaklarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular ile örtüşmekte olduğu belirlenmiştir [43].

4.2. HSA Mikropartiküllerin Karakterizasyonu

Yapılan çalışmalarda ekzozom ayırma-saflaştırma işlemlerinde kullanılmak üzere geliştirilmesi planlanan HSA mikropartiküller HSA'in yağ fazında karıştırılarak uygun bir çapraz bağlayıcı ile proses edilmesiyle oluşturulmuştur. Bir başka deyimle HSA'in

emülsiyon ortamında çapraz bağlanması yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan HSA mikropartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında öncelikle mikropartiküllerin morfolojik incelemeleri yapılmış ve bu çalışmaların ardından da HSA mikropartiküllerin ayırma-saflaştırma işlemlerinde en önemli özelliklerinden birini oluşturacak olan yüzey alanını doğrudan etkileyecek olan HSA mikropartikül boy-boy dağılımına etki edecek olan parametrelerin değerlendirilmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir.

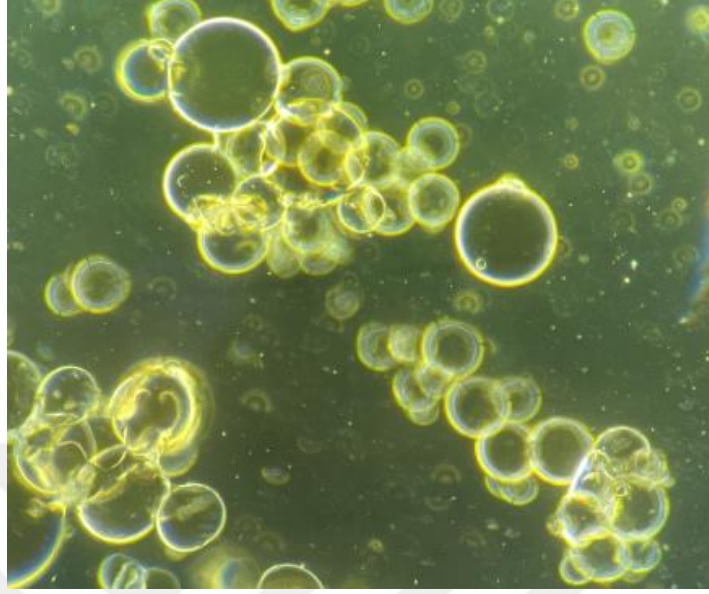
4.2.1. HSA mikropartiküllerin morfolojik ve kimyasal olarak değerlendirilmesi

HSA mikropartiküllerin morfolojik olarak değerlendirilmesi aşamasında hazırlanan mikropartiküllerin boy aralıkları mikrometre düzeyinde olduğundan öncelikle optik mikroskop ile ve ardından da özellikle yüzey morfolojisini değerlendirmek üzere taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde gerçekleştirilen SEM çalışmaları esnasında hazırlanan HSA mikropartiküllerin enerji dağıtıcı X-ışınları analizi (Energy Dispersive X-Ray Analysis, EDX) ile de mikropartiküllerin yapısında yer alan elementel bileşenler hakkında bilgi edinilmiştir.

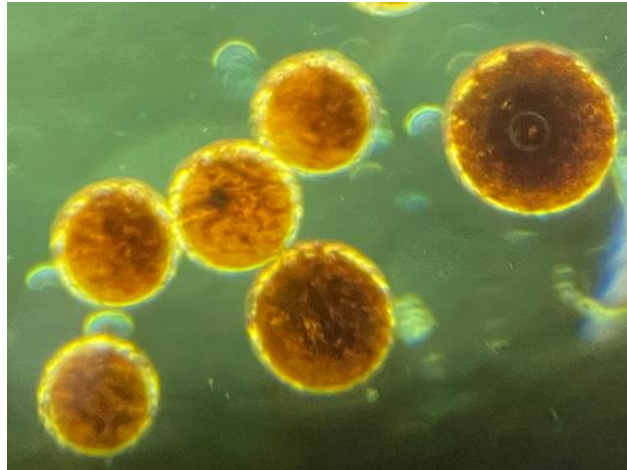
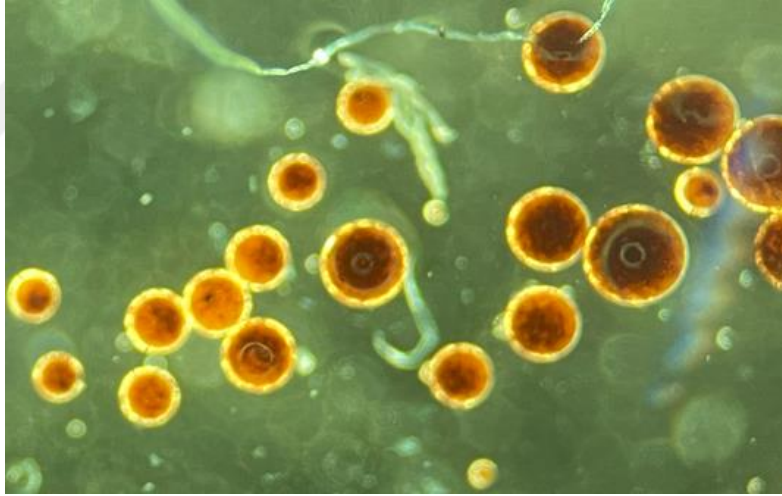
Optik mikroskop değerlendirmeleri

HSA mikropartiküllerin optik mikroskop ile yapılan incelemelerinde hem demir oksit nanopartikülleri içermeyen hem de içeren HSA mikropartiküllerin optik mikroskop yardımıyla mikrofotografı çekilmiş ve elde edilen görüntü örnekleri Şekil 4.4. ve 4.5.'te sunulmuştur. Görüntülerden de çok net olarak anlaşılacağı üzere içeriğinde demir oksit içermeyen HSA mikropartiküller şeffaf bir görüntü sergilerken formülasyona/proses demir oksitlerin dahil edildiği örneklerin (bir başka deyimle demir oksit içeren) HSA mikropartiküllerin görüntülerinde ise siyah renkli demir oksit nanopartiküllerin varlığı çok net olarak fark edilebilmektedir. Burada elde edilen bulgulardan demir oksit NP içermeyen HSA mikropartiküller ile ilgili olarak literatürde yer alan sığır serum albümini (BSA) ile gerçekleştirilen çalışma da oldukça benzer sonuçlar (bir başka deyimle şeffaf ve benzer boy aralığına yakın mikropartiküller) elde edilmiş olduğu anlaşılmıştır [44]. Öte yandan demir oksit nanopartikülleri içermeyen ve içeren her iki formda elde edilen mikropartiküllerin boy-boy dağılımları benzerlik/yakınlık göstermekle beraber bünyesinde demir oksit nanopartikülleri içeren (bir başka deyimle manyetik özellikli olan) HSA mikropartiküllerin boylarının biraz daha büyük oldukları anlaşılmıştır. Bunun nedeni olarak da proses gereği karıştırma ortamına ilave edilen HSA'in yanında ortama katılan demir oksit nanopartikülleri de ortam viskozitesini arttırmakta ve bu durumda karıştırma ve polimerik

yapıyı parçalama işlemi için daha fazla enerji ihtiyacı duyulmaktadır. Gerekli bu enerji artışı sağlanmadığı ve eşit enerji ile işlemler gerçekleştirildiği için demir oksit içeren HSA mikropartiküllerin nihai büyüklüklerinin arttığı düşünülmektedir.



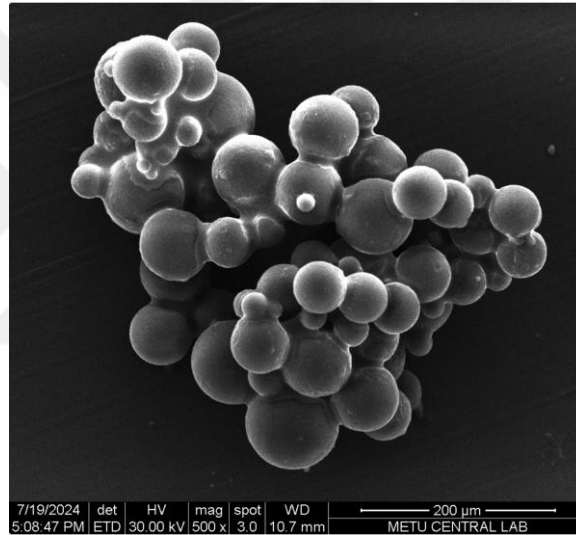
Şekil 4.4. HSA Mikropartiküllerin Optik Mikrofotografı



Şekil 4.5. Fe_3O_4 Nanopartikül İçeren HSA Mikropartiküllerin Optik Mikrofotografı

Taramalı elektron mikroskop (SEM) değerlendirmeleri

Yapılan çalışmalarda hazırlanan HSA mikropartiküllerin morfolojik olarak değerlendirmelerinin yapıldığı bu bölümde hazırlanan mikropartiküllerin SEM ile alınan görüntüleri Şekil 4.6. ve 4.7.'de sunulmuştur. Şekil 4.6.'dan anlaşılabacağı üzere elde edilen HSA mikropartiküllerin düzgün, küresel yapıda olup oldukça homojen boy dağılımına sahip konumdadır. Mikrofotoğraftan ve ölçek skalasından anlaşılabacağı üzere elde edilen mikropartiküllerin boyutları önceki bölümde ayrıntılı bir şekilde irdelenen optik mikroskop değerlendirmeleri ile uyum içerisinde olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca hazırlanan HSA mikropartiküllerin sahip olduğu yüzey yapısı yakından incelendiğinde mikropartiküllerin yüzeylerinin oldukça pürüzlü bir yapıda olduğu ve bu özelliğin de mikropartiküllerin adsorpsiyon kapasitesini arttıracak nitelikte yüzeyi büyütmüş olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.6. HSA Mikropartiküllerin SEM Fotoğrafi

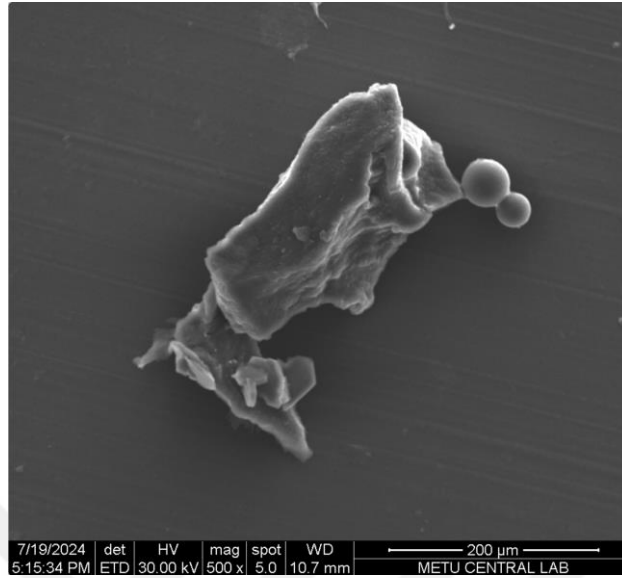
Yine yapılan çalışmalarda elde edilen manyetik özellikli (demir oksit nanopartikül içeren) HSA mikropartiküllere ait SEM mikrofotoğrafi (Şekil 4.7.) incelendiğinde de demir oksit nanopartikül içermeyen HSA mikropartiküllere benzer özelliklere sahip yapıların elde edilmiş olduğu anlaşılmaktadır. Burada da elde edilen mikropartiküllerin boy-boy dağılımları optik mikroskop ile elde edilen sonuçlar ile tutarlı olduğu gözlemlenmiştir.

HSA mikropartiküllerin EDX değerlendirmeleri

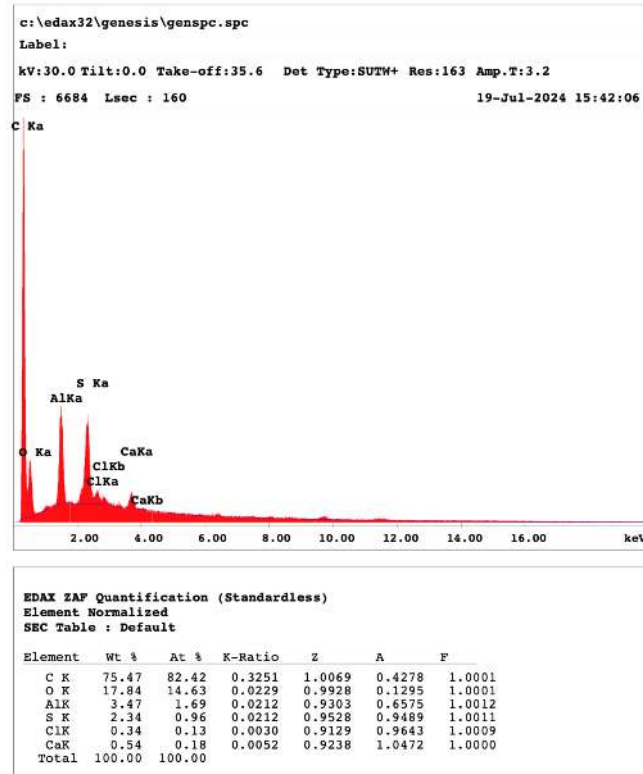
Yapılan SEM çalışmaları esnasında üzerinde çalışılan HSA mikropartiküllerin kimyasal/elementel bileşenler yönünden değerlendirilmeleri işlemi EDX sistemi yardımıyla gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular sırasıyla Şekil 4.8. ve 4.9.'da sunulmuştur.

Sırasıyla Şekil 4.8 ve 4.9.'da sunulan veriler dikkatle incelendiğinde demir oksit NP içermeyen (bir başka manyetik özellik göstermeyen) HSA mikropartiküllere ait EDX

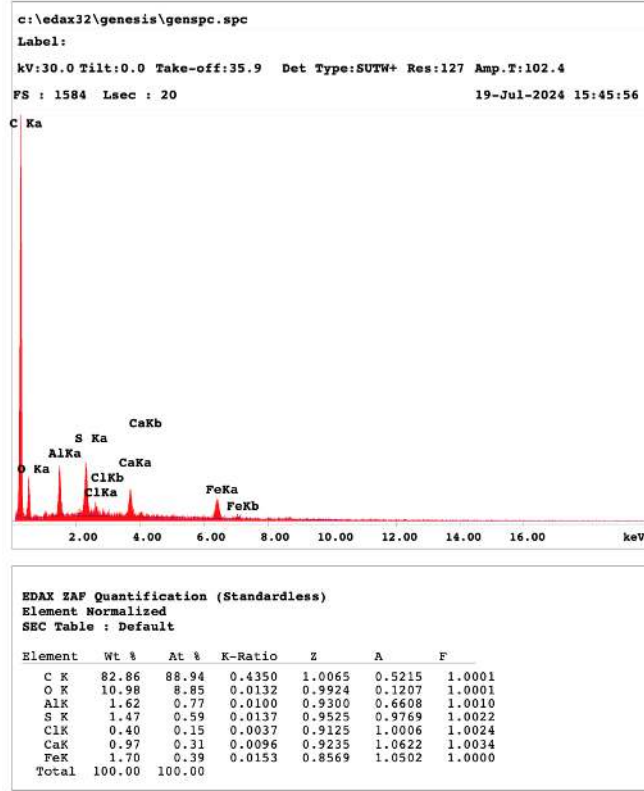
spektrumunda herhangi bir demir (Fe) elementine rastlanmazken, demir oksit içeren HSA örneğine ait EDX spektrumunda demir elementinin varlığı çok net olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7. Fe_3O_4 Nanopartikül İçeren HSA Mikropartiküllerin SEM Fotoğrafı



Şekil 4.8. HSA Mikropartiküllerin EDX Spektrumu ve Elementel İçeriği



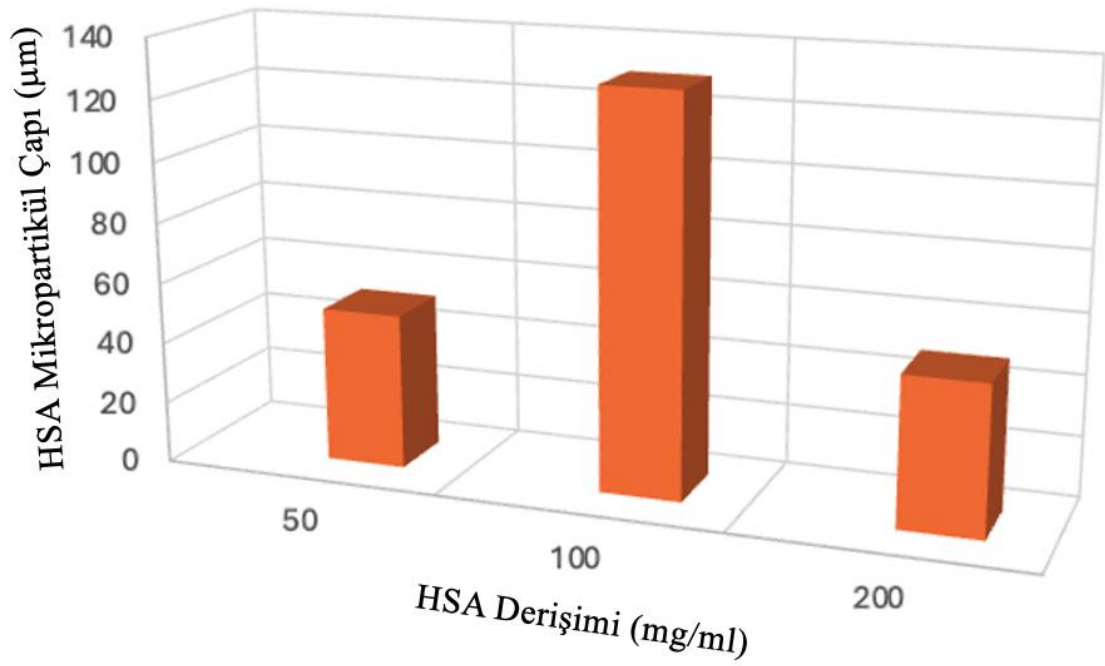
Şekil 4.9. Demir Oksit NP İçeren HSA Mikropartiküllerin EDX Spektrumu-Elementel İçeriği

4.2.2. HSA mikropartiküllerin boy-boy dağılımları

Çalışmalar kapsamında hazırlanan HSA mikropartiküllerin daha önceki bölümlerde de belirtildiği gibi en önemli hedeflenen özelliklerinden biri yüzey büyüklüğü, diğeri de manyetiklik özelliği olduğundan bu bölümde kullanılan HSA miktarı değiştirilerek farklı boy-boy dağılımına sahip mikropartiküllerin hazırlanması ve yine HSA mikropartikül formülasyonlarına dahil edilen demir oksit nanopartikül miktarı değiştirilerek manyetik özelliğe sahip HSA mikropartiküller hazırlanmıştır. Elde edilen bulgular aşağıdaki bölümlerde ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiştir.

HSA derişiminin mikropartikül boy-boy dağılımına etkisi

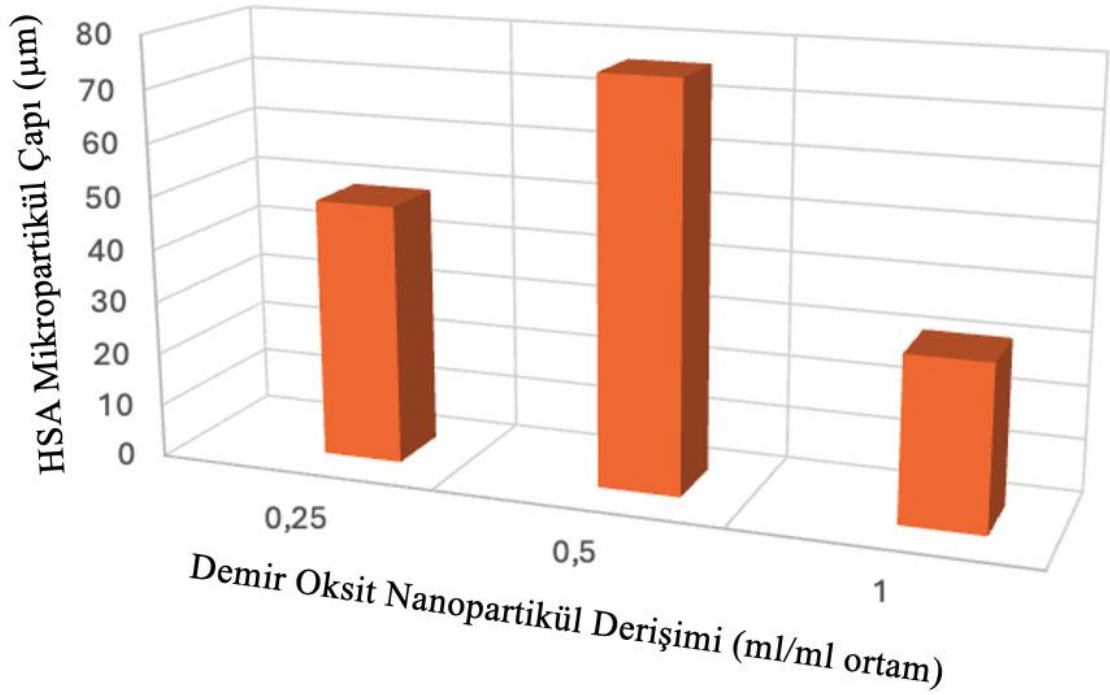
HSA mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan HSA miktarı dağıtma ortamının viskozitesini etkilediğinden (arttırdığından) ortamda oluşan damlacıklar daha büyük olmakta ve karıştırma etkisiyle küçülmeleri zorlaşmaktadır. Bu nedenle başlangıçta HSA miktarının artmasıyla oluşan mikropartiküllerin çapı büyümeye başlamıştır. Ancak sonrasında HSA miktarı artmasına rağmen mikropartikül çapında bir azalma gözlemlenmiştir. Bu etkileşim ilgili kaynaklar ile uyum içerisinde [45].



Şekil 4.10. HSA Derişiminin HSA Mikropartikül Çapına Etkisi

Demir oksit NP derişiminin HSA mikropartikül boy-boy dağılımına etkisi

Manyetik özellikli HSA mikropartiküllerin hazırlanması çalışmalarında kullanılan HSA miktarı sabit tutulmak koşuluyla sadece demir oksit nanopartiküllerin başlangıç miktarları/oranları değiştirilerek HSA mikropartiküller hazırlanmış ve optik mikrofotografılarda yer alan mikropartiküllerin ortalama çapları ölçülerek gerekli değerlendirmeler yapılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.9.'da sunulmuş ve demir oksit nanopartikül miktarının artmasıyla başlangıçta elde edilen mikropartiküllerin boyları/çapları artma eğiliminde olmasına rağmen demir oksit miktarı arttırılmaya devam ettikçe söz konusu mikropartikül büyüklüğü tekrar azalma eğilimi göstermiştir. Burada elde edilen bulguların ilgili kaynaklarda yer alan bulgular ile örtüşmüş olduğu anlaşılmıştır [46].



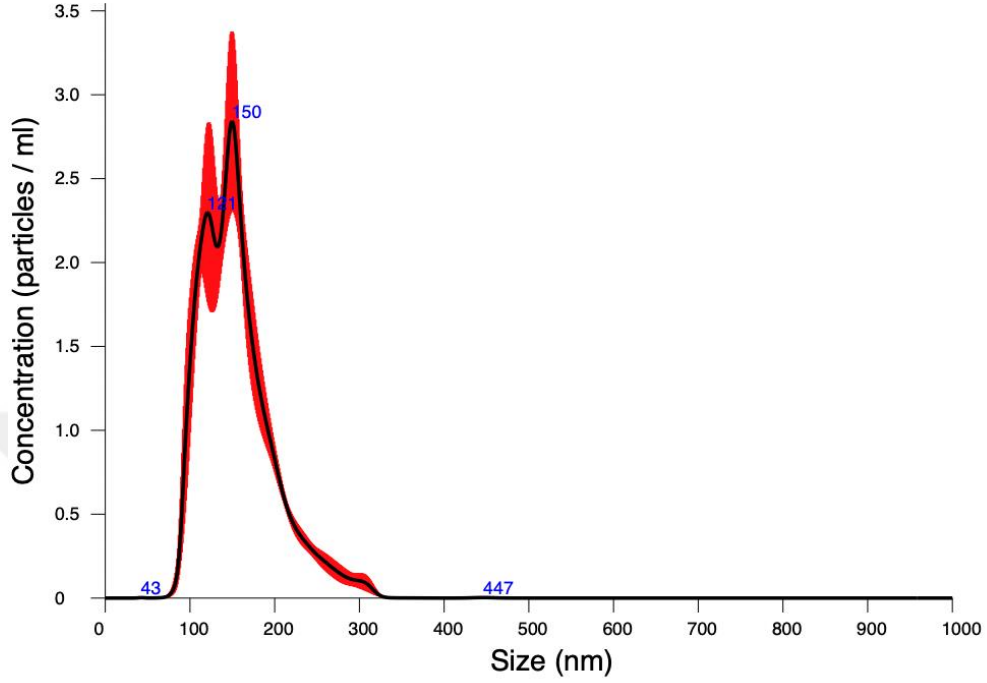
Şekil 4.11. HSA Derişiminin HSA Mikropartikül Çapına Etkisi

4.3. Lipozomların Morfolojik ve Yapısal Karakterizasyonu

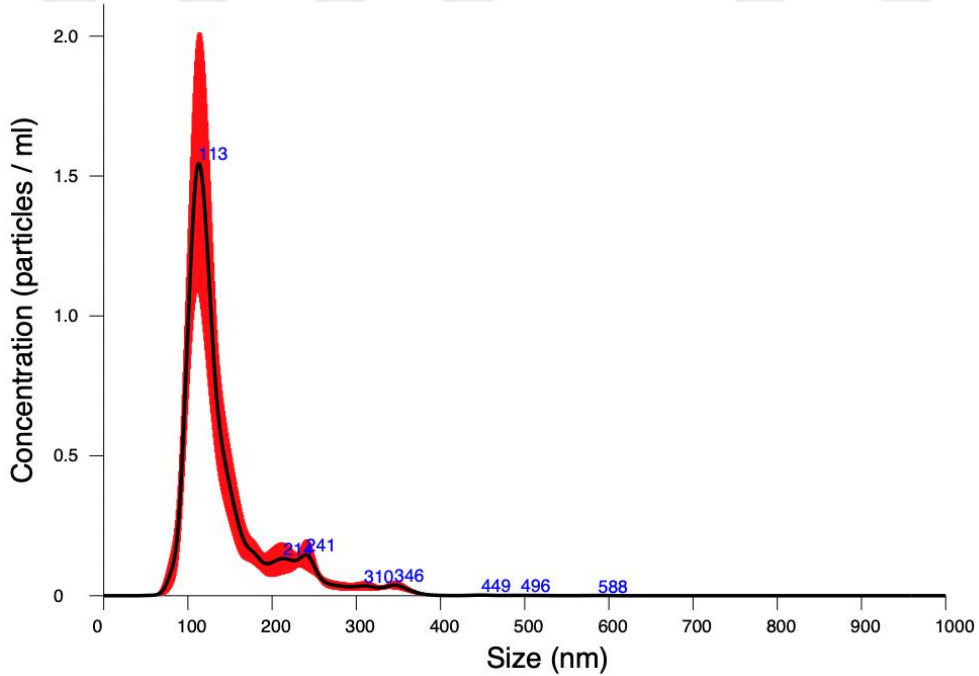
Sunulan tez kapsamında hazırlanan lipozomal yapıların karakterizasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda elde edilen lipozomların boy-boy dağılımları NTA ile ölçülmüştür. Elde edilen bulgular her iki farklı lipozom formülasyonu için Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Şekillerden kolaylıkla anlaşılabileceği üzere her iki formülasyonda da oldukça homojen ve dar boy aralığında lipozomal yapılar hazırlanmıştır. LS100 ile hazırlanan lipozomların P90G ile hazırlanan formlara göre boyca daha büyük oldukları değerlendirilmiştir. Ancak burada elde edilen boy-boy dağılımları proses parametreleri ile (özellikle sonikasyon işlemi vb) ilgili olarak değişim gösterebilen değerlerdir. Bu bölümde gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda ayrıca lipozomal yağların yüzey yükleri zeta potansiyeli ölçüm cihazı ile ölçülmüş ve LS100 lipozomlar için +(13-14) mV aralığında olduğu P90G ile hazırlanan lipozomlar için ise bu değer +(12-13) mV aralığında olduğu belirlenmiştir. Özet olarak hazırlanan farklı lipozom yapılarının yüzey yükleri birbirine oldukça yakın olmasının yanında her ikisinin yüzeyi de pozitif yüklü (bir başka deyimle lipozomlar katyonik yüzey yüküne sahiptir) olarak belirlenmiştir.

Bir sonraki aşamaya kadar hazırlanan lipozomal yapılar test-analiz ve ileri uygulamalar için +4C'de muhafaza edilmiş ve yapılan benzer çalışmalarda söz konusu saklama işlemleri ile çalışılan lipozomal yapıların günlerce (hatta haftalarca) stabil olarak

kalabildikleri bildirilmiştir [47]. Ayrıca daha uzun ya da daha sağlıklı muhafaza işlemleri olarak hazırlanan lipozomal yapıların liyofilize edilerek +4C’de saklanması lipozom kararlılığı açısından son derece daha uygun olduğu bildirilmiştir [48].



Şekil 4.12. LS100 Lipozomların NTA’da Ölçülen Boy-Boy Dağılımı (Ort. Çap: 155.6±43.8nm)



Şekil 4.13. P90G Lipozomların NTA’da Ölçülen Boy-Boy Dağılımı (Ort. Çap: 143.0±56.8 nm)

4.4. Lipozomların Ayrılması ve Saflaştırılması

Sunulan tez kapsamında her iki formülasyon ile hazırlanan lipozomal yapıların yine tez kapsamında geliştirilen HSA mikropartiküller (ve demir oksit nanopartiküller) ile gerçekleştirilen adsorpsiyon prosesi ile bulundukları ortamdan izole edilmesi ve saflaştırılması işlemlerinde stok çözelti formunda hazırlanan (ve içerisindeki lipozomların NTA ile sayıca belirlenmiş miktarları bilinen) örnekler sırasıyla belirli miktarlarda mikro ve nanopartiküller ile etkileştirilmiştir. Bu etkileşim çalışmaları esnasında tüm örnekler rotatör üzerindeki yerine yerleştirilmiş ve uygun bir dönme hızında örneklerin döndürülerek homojen etkileşimin sağlanması mümkün olmuştur. Yapılan deneysel çalışmalarda adsorpsiyon ortamında yer alan lipozomların mikro-nanopartiküller ile adsorplanması aşamasında adsorbent doygunluk değerinin belirlenmesi için adsorpsiyon işlemleri aynı içerikteki formülasyonlar ile (örneğin demir oksit içeren HSA mikropartiküllerin kullanıldığı örnekler ile) 30, 60 ve 120 dakikalık adsorpsiyon süreleri kullanılmış ve bu sürenin sonunda elde edilen adsorplanmadan ortamda kalan serbest lipozomların NTA sistemi ile sayılması ve ortamda yer alan başlangıç lipozom sayısından eksilenlerin adsorbent yüzeyinde tutulması esasına göre lipozom formülasyonlarının adsorpsiyon kinetikleri belirlenmiştir. Çalışmaların diğer bir bölümünde de adsorbent etkisini değerlendirmek üzere her iki formülasyon ile hazırlanan lipozom örnekleri kullanılarak yaklaşık 1 saatlik bir adsorpsiyon süresi kullanılarak işlemler gerçekleştirilmiş ve bu süre sonunda tüm örnekler için adsorpsiyon kapasiteleri belirlenmiştir.

Yapılan tüm çalışmalardan elde edilen lipozomal yapıların miktarları/sayıları Tablo 4.1., 4.2. ve 4.3.'de sırasıyla verilmiştir. Buradan anlaşılabileceği üzere ilk iki Tablo adsorpsiyon kinetikleri ile ilgili olan Tablolar olup, diğer üçüncü Tablo ise aynı sürede farklı adsorbentlerin kullanıldığı örnekleri temsil edecek şekilde tasarlanmıştır.

4.4.1. Adsorpsiyon süresinin etkisi

Adsorpsiyon yöntemiyle ayırma-saflaştırma uygulamalarında en temel hususlardan biri adsorbent ile adsorplanıp bulunduğu ortamdan ayrılması planlanan hedef malzemelerin (burada lipozomların) birbirleriyle etkileşim süreleri olacaktır [49]. Dolayısıyla yapılan çalışmalarda özellikle adsorpsiyon işleminin doygunluk değerinin belirlenmesi için adsorpsiyon işlemleri farklı süreler boyunca (30, 60 ve 120 dk olacak şekilde) değerlendirilmiş ve uygulanmıştır. Lipozom hazırlanmasında kullanılan LS100 ve P90G ile hazırlanan lipozomların manyetik özellikli HSA (demir oksit NP içeren) mikropartiküller ile

etkileştirilmesiyle elde edilen serbest lipozom miktarları sırasıyla Tablo 4.1. ve 4.2.'de verilmiştir.

LS100 ile hazırlanan lipozomların ayırma-saflaştırma çalışmalarında en kısa süren (30 dk) etkileşim sonrası elde edilen serbest lipozom sayısının bir sonraki değerden (60 dk) yüksek değere sahip olması etkileşimin yeterli seviyeye ulaşp desorpsiyonun gerçekleşmekte olduğu ve adsorpsiyon işlemine devam edildiğinde adsorpsiyonun tekrar artarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu bulguya göre HSA mikropartiküllerin yüzeyine adsorbe olan lipozomlar belirli bir süre sonra serbest konuma geçebilmekte (bir başka deyimle desorbe) olduğu anlamına gelmektedir. Bu nedenle ideal/maksimum adsorpsiyon değerine yaklaşık 1 saatlik süre dolayında ulaşılabilirdiği düşünülmüştür. Bu nedenle bir sonraki bölümde farklı adsorbentlerin lipozom ayırma-saflaştırma çalışmalarına etkisinin değerlendirildiği bölümde adsorpsiyon süresi tüm örnekler için 1 saat olarak belirlenmiştir. Diğer lipozom türü olan P90G ile yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular ise Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. LS100 ile Hazırlanan Lipozomların Adsorpsiyon Süresine Göre Değişen Adsorpsiyon Miktarları

<i>Örnek No</i>	<i>Formülasyon</i>	<i>Serbest Lipozom Sayısı/mg Malzeme</i>
11	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+ LS100 (30 dk)	1.06e+11 +/- 2.47e+09 2.12e+9 +/- 4.94e+07
3	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+LS100 (60 dk)	1.55e+11 +/- 5.32e+09 3.1e+09 +/- 1.06e+08
12	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+ LS100 (120 dk)	1.24e+11 +/- 2.17e+09 2.48e+09 +/- 4.34e+07

Tablo 4.2. P90G ile Hazırlanan Lipozomların Adsorpsiyon Süresine Göre Değişen Adsorpsiyon Miktarları

<i>Örnek No</i>	<i>Formülasyon</i>	<i>Serbest Lipozom Sayısı/mg Malzeme</i>
9	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+ P90G (30 dk)	7.99e+10 +/- 2.09e+10 1.60e+09 +/- 4.18e+08
7	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+P90G (60 dk)	1.11e+11 +/- 2.28e+09 2.22e+09 +/- 4.56e+07
10	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+ P90G (120 dk)	2.16e+11 +/- 6.42e+09 4.32e+09 +/- 1.28e+08

P90G lipozomların zamana bağılı adsorpsiyon denemelerinde yine ilk 30 dk dolayında yüksek olan adsorpsiyon değerleri 60. dakika ve 120. Dakikalarda elde edilen adsorpsiyon değerlerindeki azalma eğiliminin zaman geçtikçe desorpsiyon oranının baskın geldiği ve bu eğilim ile karşılaşıldığı anlaşılmıştır.

4.4.2. Adsorbent etkisi

Lipozomların manyetik özellikli (bir başka deyimle demir oksit NP içeren) HSA mikropartiküller ile ayırma ve saflaştırma işlemlerinin gerçekleştirildiği ve bu amaçla farklı yapıdaki mikro-nanopartiküllerin kullanıldığı bu bölümde öncelikle demri oksit içermeyen HSA mikropartiküller ile demri oksit içeren HSA mikropartiküller adsorbent olarak kullanılmış ve ayrıca demir oksit NP'ler doğrudan lipozomlar ile etkileştirilerek deneysel çalışmalar sonuçlandırılmıştır.

Bu bölümde elde edilen bulgular Tablo 4.3.'te ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur. Tabloden de anlaşılacağı üzere tüm adsorbentler hem LS100 ile hem de P90G ile hazırlanan lipozomların tümüyle etkileştirilmiştir. Burada sadece demir oksit NP'lerin yalın halde adsorpsiyon işlemi için kullanılma düşüncesi özellikle demir oksit NP içeren HSA mikropartiküllerin yüzeyinde bulunması olasılığı olan demir oksit NP'in etkisini değerlendirebilmek adına uygulamaya dahil edilmiştir. Söz konusu değerlendirmeler yapılırken demir oksit NP içermeyen ve içeren HSA mikropartiküller ile elde edilen bulgular hep birlikte değerlendirilmiştir.

Tablo 4.3. LS100 ve P90G ile Hazırlanan Lipozomların Adsorbent Türüne Göre Değişen Adsorpsiyon Kapasiteleri

<i>Örnek No</i>	<i>Formülasyon</i>	<i>Serbest Lipozom Sayısı/mg Malzeme</i>
1	LS100	2.36e+11 +/- 7.06e+09 (Başlangıç, ml'de)
2	HSA MP+LS100	2.07e+9 +/- 6.98e+07
3	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+LS100	3.10e+9 +/-1.06e+08
4	Fe ₃ O ₄ NP+LS100	5.88e+10 +/- 4.34e+08
5	P90G	2.19e+11 +/- 2.09e+10 (Başlangıç, ml'de)
6	HSA MP+P90G	1.81e+9 +/- 2.86e+07
7	Fe ₃ O ₄ NP+HSA+P90G	2.22e+9 +/- 4.56e+07
8	Fe ₃ O ₄ NP+P90G	3.60e+10 +/- 1.47e+09

Elde edilen bulgulara göre en yüksek adsorpsiyon kapasitesi değerlerine demir oksit içermeyen HSA mikropartiküller ile ulaşıldığı manyetik özelliğe sahip (demir oksit NP içeren) HSA mikropartiküllerin adsorpsiyon kapasitesinin nispeten daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Son olarak her iki lipozom formülasyonu için de demir oksit NP'lerin en düşük adsorpsiyon kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir.

Ancak yapılan deneysel uygulamalarda demir oksit NP'leri içeren manyetik özellikli HSA mikropartiküllerin diğer mikropartiküllerden (demir oksit NP içermeyen) çok daha kolay bir şekilde manyetik alan etkisi ile ayırma saflaştırma işlemleri yapıldığından bu proses kolaylığı bu gruptaki yapıyı (manyetik özellikli HSA mikropartikülleri) daha üstün/avantajlı kılmaktadır.

4.5. Yapay Ekzozom (L-Histidin İçeren Lipozom) Çalışmaları

4.5.1. L-Histidine içeren lipozom formülasyonların karakterizasyonu

Yöntem bölümünde ayrıntılı bir şekilde açıklandığı gibi ince tabaka hidrasyon metodu kullanılarak hazırlanan L-Histidine içeren lipozomal yapılar hidrofilik yapıdaki etken maddelerin ve/veya bileşenlerin lipozom yapısına katılması için iki farklı yöntem kullanılarak hazırlanmıştır. Bunlardan birincisi; rehidrasyon adımıyla bileşenlerin sulu fazda çözülerek lipozomun hidrofilik çekirdek kısmına yüklenmesini sağlayan yöntem (Formülasyon 1 ve 2) ve diğeri ise lipozom yapısının etken madde bileşeni içermeyen, sulu faz ile oluşturulduğu boş lipozom formülasyonuna etken maddenin eklenip çalkalandığı (1 saat boyunca) ve etken maddenin adsorpsiyon ile lipozom yapısına katıldığı yöntem şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Söz konusu yöntemler ile hazırlanan farklı formülasyona sahip lipozomal yapılar (yapay ekzozom formunda) değişik fizikokimyasal yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu kapsamda hazırlanan lipozomal yapıların DLS yöntemi ile partikül büyüklüğü (PS, nm), partikül büyüklük dağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli (ZP, mV) değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler ortalama değerleri ve standart sapmaları ile Tablo 4.4.'de sunulmuştur.

Tablo 4.4. Yapay Ekzozomların Bazı Fizikokimyasal Özellikleri

Formülasyon No	İçerik	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
Formülasyon 1 (Histidin Rehidrasyonda eklendi)	Lipoid S100: 50 mg Kolesterol: 6 mg HisTAG: 20 µg/mL	102.2 ± 0.9000	0.288 ± 0.002	8.01 ± 0.212
Formülasyon 2 (Histidin Rehidrasyonda eklendi)	Lipoid S100: 45 mg DSPE-PEG2000: 5 mg Kolesterol: 6 mg HisTAG: 20 µg/mL	75.07 ± 0.5774	0.262 ± 0.004	-12.8 ± 0.416
Formülasyon 3 (Histidin Adsorbsiyonla eklendi)	Lipoid S100: 50 mg Kolesterol: 6 mg HisTAG: 20 µg/mL	84.98 ± 0.4500	0.251 ± 0.012	8.65 ± 0.174

4.5.2. Yapay ekzozomların (L-Histidine içeren lipozomlar) ayrılması ve saflaştırılması

Yapılan çalışmalarda her üç farklı formülasyon ile hazırlanan yapay ekzozomal yapıların tez kapsamında geliştirilen ve demir oksit nanopartikülleri içeren HSA mikropartiküller önceki bölümlerde aktarılan çalışmalara benzer şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda hedefli ayırma prosesi ile (mikropartiküllere takılan bakır ile L-Histidin spesifik etkileşimi şeklinde) bulundukları ortamdan izole edilmesi ve saflaştırılması işlemlerinde stok çözelti formunda hazırlanan (ve içerisindeki yapay ekzozomların NTA ile sayıca belirlenmiş miktarları bilinen) örnekler sırasıyla belirli miktarlarda farklı içeriklere sahip HSA mikropartiküller ile etkileştirilmiştir. Bu işlemler esnasında tüm örnekler rotatörde uygun bir dönme hızında döndürülerek homojen etkileşimin sağlanması mümkün olmuştur. Yapılan çalışmalarda tasarlanan deney grupları ve örnek özelliklerinin yer aldığı değerler Tablo 4.5.'te verilmiştir. Tablodan da anlaşılacağı üzere ilk üç örnek (Örnek No: 1, 2 ve 3) ayırma işlemlerine tabi tutulması planlanan yapay ekzozomlar olup diğer iki grup (Örnek No: 4, 5, 6 ve Örnek No: 7, 8, 9 olan iki grup) sırasıyla bakır içermeyen ve bakır içeren HSA mikropartikülleri temsil etmektedir. Burada bu iki grubun kullanılmasının temel nedeni HSA mikropartiküllere ilave edilen bakır iyonlarının yapay ekzozom olarak değerlendirilen lipozomal yapıdaki yapılarda yer alan L-Histidin moleküllerine seçimli olarak bağlanıp bağlanmadıklarının araştırılması olmuştur.

Tablo 4.5. Yapay Ekzozom Ayırma Çalışmalarında Kullanılan Örneklerin İçerikleri

Örnek No	Formülasyon içeriği
1	<i>LS100/His(R)</i>
2	<i>LS100+PEG/His(R)</i>
3	<i>LS100/His(Adsorption)</i>
4	<i>LS100/His(R)+HSA/Fe₃O₄NP</i>
5	<i>LS100+PEG/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>
6	<i>LS100/His(Adsorption)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>
7	<i>LS100/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>
8	<i>LS100+PEG/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>
9	<i>LS100/His(Adsorption)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>

Belirtilen yönteme göre başlangıçta ortamda yer alan ve L-Histidin içeren lipozomal yapılar bir başka deyimle yapay ekzozomlar ile yapılan deneysel çalışmalar sonunda elde edilen veriler Tablo 4.6.'da sunulmuştur.

Tablo 4.6. Yapay Ekzozom Ayırma Çalışmalarında Elde Edilen Veriler

Örnek No	Formülasyon içeriği	Yapay Ekzozom Sayısı
1	<i>LS100/His(R)</i>	10.4e+10±2.56e+09
2	<i>LS100+PEG/His(R)</i>	7.53e+10±4.83e+09
3	<i>LS100/His(Adsorption)</i>	10.90+10±5.945e+09
4	<i>LS100/His(R)+HSA/Fe₃O₄NP</i>	8.23e+10±6.47e+09
5	<i>LS100+PEG/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	7.23+10±2.33e+09
6	<i>LS100/His(Adsorption)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	10.54+10±5.47e+9
7	<i>LS100/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>	2.29e+10±2.18e+09
8	<i>LS100+PEG/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>	1.719+10±1.81e+09
9	<i>LS100/His(Adsorption)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>	4.68+9±3.197e+8

Sunulan verilerin değerlendirilmesinde öncelikle başlangıç yapay ekzozom değerleri (Örnek No: 1, 2, ve 3) dikkate alınarak bu miktardan eksilerek HSA mikropartiküllere tutunanların sayılarından alınan farklar hesaplanarak toplam bağlanan sayıları hesaplanmıştır. Bu bağlamda ilk etapta L-Histidin moleküllerinin rehidrasyonda eklenmiş olduğu yapılar ele alınmış ve bakır katkılanmamış olanlar ile bakır katkılananlar arasındaki farklar değerlendirilerek sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Yapay Ekzozom (L-Histidin Rehidrasyonda eklenmiş) Ayırma Verileri

Örnek No	Formülasyon içeriği	Yapay Ekzozom Sayısı
1	<i>LS100/His(R)</i>	10.4e+10±2.56e+09
4	<i>LS100/His(R)+HSA/Fe₃O₄NP</i>	8.23e+10±6.47e+09
7	<i>LS100/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>	2.29e+10±2.18e+09

Elde edilen verilerden çok net olarak görünen bakır içeren formülasyonun en yüksek bağlanma verimi sağladığı ve böylece ortamdaki yapay ekzozom sayısını minimum değere indirdiği anlaşılmıştır. Öte yandan bakır içermeyen HSA mikropartiküllerin tezin daha önceki bölümlerinde aktarılan (seçici olmayan bir başka deyimle L-Histidin vb bir yapı içermeyen lipozomlar ile yapılan) çalışmalara benzer şekilde tamamıyla elektrokimyasal etkileşimlerle az da olsa bir miktar yapay ekzozomun mikropartiküllere tutunmuş olduğu belirlenmiştir.

Diğer yapay ekzozom hazırlama yöntemleri (PEG içeren ve L-Histidin'in rehidrasyonda eklenmiş olduğu ile L-Histidin'in adsorpsiyonla eklenmiş olduğu) ile hazırlanan formülasyonlar ile yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen veriler de sırasıyla Tablo 4.8. ve Tablo 4.9.'da sunulmuştur.

Tablo 4.8. Yapay Ekzozom (PEG'li ve L-Histidin Rehidrasyonda eklenmiş) Ayırma Verileri

Örnek No	Formülasyon içeriği	Yapay Ekzozom Sayısı
2	<i>LS100+PEG/His(R)</i>	7.53e+10±4.83e+09
5	<i>LS100+PEG/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	7.23+10±2.33e+09
8	<i>LS100+PEG/His(R)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>	1.719+10±1.81e+09

Tablo 4.9. Yapay Ekzozom (L-Histidin Adsorpsiyonla eklenmiş) Ayırma Verileri

Örnek No	Formülasyon içeriği	Yapay Ekzozom Sayısı
3	<i>LS100/His(Adsorption)</i>	10.90+10±5.945e+09
6	<i>LS100/His(Adsorption)+HSA/ Fe₃O₄NP</i>	10.54+10±5.47e+9
9	<i>LS100/His(Adsorption)+HSA/ Fe₃O₄NP (Bakır Kaplı)</i>	4.68+9±3.197e+8

Söz konusu diğer iki yöntem ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler de değerlendirildiğinde bakır içeren yapıların son derece etkin bir şekilde bağlanma verimini arttırdığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmalarda da bakır içermeyen HAS mikropartiküllerin de seçici olmayan bağlanmalar sayesinde ortamda bulunan ve L-Hisitidin içeren yapay ekzozom yapılarını ortamdaki uzaklaştırdığı belirlenmiştir.

Son olarak yapay ekzozom yapılarının hazırlanmasında kullanılan üç farklı yöntemin ayırma/saflaştırma prosesi üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlara göre en düşük bağlanma veriminin L-Histidin'in adsorpsiyon ile lipozomal yapıya ilave edildiği formülasyon için elde edilmiştir. Öte yandan rehdrasyonda yapılan katkılama durumunda prosese PEG ilave edilmesi durumunda daha yüksek bağlanma veriminin elde edilmiş olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak her üç formülasyon bir arada değerlendirildiğinde söz konusu ayırma verimliliğinin en yüksek olduğu formülasyon PEG'ün yer aldığı ve rehidrasyonda gerçekleştirilen L-Histidin ilavesi şeklinde elde edilen formülasyon ile sağlanmıştır.



5. SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında, elde edilen bulguların genel bir değerlendirmesi yapılmış ve bu bulguların literatürle karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın genel sonuçları, demir oksit nanopartiküllerin ve HSA mikropartiküllerin başarılı bir şekilde hazırlandığını ve karakterize edildiğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda ekzozom ayırma ve saflaştırma proseslerinde kullanılmak üzere geliştirilen manyetik özellikli HSA mikropartiküllerin bu amaçla kullanılabilirliğinin araştırıldığı ilk bölümde farklı organik yapılar kullanılarak lipozomal yapılar hazırlanmış ve geliştirilen mikropartiküller ile bu yapıların bulundukları ortamdan uzaklaştırılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde manyetik özellikli HSA mikropartiküllerin verimli bir şekilde lipozomal yapıları ortamdan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Buradaki bağlanma ve ayrıştırmaların tamamıyla bileşenlerin elektrokimyasal etkileşimleri ile gerçekleştiği sonucuna varılmıştır, bir başka deyimle geliştirilen mikropartiküller ile seçici olmayan bir ayırma prosesi gerçekleştirilebilmiştir. Öte yandan gerçek ekzozom ayırma saflaştırma proseslerinde seçimli/hedefli ayırma saflaştırma proseslerine ihtiyaç duyulacağından çalışmaların sonraki bölümünde yapay ekzozom modeli olarak bünyesinde biyolojik molekül (L-Histidin) bulunduran lipozomal yapıların geliştirilmesi sağlanmıştır. Geliştirilen yapay ekzozom modelinde yer alan yapıların seçimli/hedefli ayırma/saflaştırma proseslerinde kullanılabilmeleri için metal/şelat afinite kromatografisi kullanılmasına karar verilmiş ve manyetik özellikli HSA mikropartiküller bakır iyonları ile dekore edilmiştir.

Çalışmaların son bölümünde hazırlanan yapay ekzozomların bakır içeren ve içermeyen manyetik özellikli HSA mikropartiküller ile ayırma/saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde yapılan çalışmalarda da bakır içeren HSA mikropartiküllerin son derece etkin bir şekilde L-Histidin içeren yapay ekzozomların bulundukları ortamdan uzaklaştırılmasının mümkün olduğu ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak manyetik özelliklere sahip HSA mikropartiküllerin doğal ekzozomların ayrıştırılmasında etkili bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Böylelikle doğal ekzozomlar seçimli/hedefli olarak izole edilebilecek ve özellikle tezin asıl amacını oluşturan kanser teşhis ve tedavi işlemlerinde kullanılabileceği öngörülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Liu, W. zhao, Ma, Z. jun, & Kang, X. wen. (2022). Current status and outlook of advances in exosome isolation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(24), 7123–7141. <https://doi.org/10.1007/S00216-022-04253-7/FIGURES/6>
- [2] Wang, Y., Wang, W., Kong, F., Zhang, Q., Xiao, J., Zhang, Y., & Yan, B. (2022). Tango of dual nanoparticles: Interplays between exosomes and nanomedicine. *Bioengineering & Translational Medicine*, 7(2), e10269. <https://doi.org/10.1002/BTM2.10269>
- [3] Back, S. J., Kim, W., Kim, D. Y., Kim, S.-J., Hwang, S. R., & Jung, G. B. (2023). Rapid and simple isolation and detection of exosomes using CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ multifunctional nanocomposites. *Analytical Biochemistry*, 673, 115161. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115161>
- [4] Zhang, M., Jin, K., Gao, L., Zhang, Z., Li, F., Zhou, F., & Zhang, L. (2018). Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods*, 2(9), 1800021. <https://doi.org/10.1002/SMTD.201800021>
- [5] Bée, A., Talbot, D., Abramson, S., & Dupuis, V. (2011). Magnetic alginate beads for Pb(II) ions removal from wastewater. *Journal of Colloid and Interface Science*, 362(2), 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.06.036>
- [6] Grishaev, N. A., Moiseeva, E. O., Chernyshev, V. S., Komlev, A. S., Novoselov, A. M., & Yashchenok, A. M. (2024). Studying the small extracellular vesicle capture efficiency of magnetic beads coated with tannic acid. *Journal of Materials Chemistry B*, 12(27), 6678–6689. <https://doi.org/10.1039/D4TB00127C>
- [7] Huang, D., Yu, J., Tian, J., Cai, H., & Zhang, W. (2025). Aptamer-Coupled Polymer-Grafted Fe₃O₄ Nanoparticles for Highly Efficient Isolation of Exosomes. *Macromolecular Rapid Communications*, 2400819. <https://doi.org/10.1002/MARC.202400819>
- [8] Chen, Y., & Hou, S. (2023). Recent progress in the effect of magnetic iron oxide nanoparticles on cells and extracellular vesicles. *Cell Death Discovery* 2023 9:1, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01490-2>

- [9] Nosrati, H., Salehiabar, M., Manjili, H. K., Danafar, H., & Davaran, S. (2018). Preparation of magnetic albumin nanoparticles via a simple and one-pot desolvation and co-precipitation method for medical and pharmaceutical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 909–915. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.10.180>
- [10] Chubarov, A. S. (2022). Serum Albumin for Magnetic Nanoparticles Coating. *Magnetochemistry* 2022, Vol. 8, Page 13, 8(2), 13. <https://doi.org/10.3390/MAGNETOCHEMISTRY8020013>
- [11] Chang, M., Chang, Y. J., Chao, P. Y., & Yu, Q. (2018). Exosome purification based on PEG-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *PloS One*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0199438>
- [12] Harding C., Heuser J., Stahl P., Cell Biol. 1983, 97, 329–339.
- [13] Pan B.T., Johnstone R. M., Cell 1983, 33, 967 – 978.
- [14] Johnstone R. M., Adam M., Hammond J. R., Orr L., Turbide C., J. Biol. Chem. 1987, 262, 9412 – 9420).
- [15] Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., ... & Jiang, Y. (2020). Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 145.
- [16] Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9, 1-18.
- [17] Chen, J., Li, P., Zhang, T., Xu, Z., Huang, X., Wang, R., & Du, L. (2022). Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 811971
- [18] Trott, M. Why Exosomes Are Being Explored as Diagnostic and Therapeutic Tools
Article Published: February 3, 2021.
- [19] Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), eaau6977.

- [20] Bano, R., Ahmad, F., & Mohsin, M. (2021). A perspective on the isolation and characterization of extracellular vesicles from different biofluids. *RSC advances*, 11(32), 19598-19615.
- [21] Gu, Y., Chen, C., Mao, Z., Bachman, H., Becker, R., Rufo, J., et al. (2021). Acoustofluidic Centrifuge for Nanoparticle Enrichment and Separation. *Sci. Adv.* 7, eabc0467
- [22] Guo, S., Xu, J., Estell, A. P., Ivory, C. F., Du, D., Lin, Y., et al. (2020). Paper-based ITP Technology: An Application to Specific Cancer-Derived Exosome Detection and Analysis. *Biosens. Bioelectron.* 164, 112292
- [23] Tay, H. M., Leong, S. Y., Xu, X., Kong, F., Upadya, M., Dalan, R., et al. (2021). Direct Isolation of Circulating Extracellular Vesicles from Blood for Vascular Risk Profiling in Type 2 Diabetes Mellitus. *Lab. Chip* 21, 2511–2523
- [24] Suwatthanarak, T., Thiodorus, I. A., Tanaka, M., Shimada, T., Takeshita, D., Yasui, T., et al. (2021). Microfluidic-based Capture and Release of Cancer-Derived Exosomes via Peptide-Nanowire Hybrid Interface. *Lab. Chip* 21, 597–607
- [25] Lin, S., Yu, Z., Chen, D., Wang, Z., Miao, J., Li, Q., et al. (2020). Progress in Microfluidics-Based Exosome Separation and Detection Technologies for Diagnostic Applications. *Small* 16, 1903916
- [26] Iliescu, F., Vrtačnik, D., Neuzil, P., and Iliescu, C. (2019). Microfluidic Technology for Clinical Applications of Exosomes. *Micromachines* 10, 392
- [27] Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9, 1-18
- [28] Li, G., Tang, W., and Yang, F. (2020). Cancer Liquid Biopsy Using Integrated Microfluidic Exosome Analysis Platforms. *Biotechnol. J.* 15, 1900225
- [29] Jiawei, S., Zhi, C., Kewei, T., & Xiaoping, L. (2022). Magnetic bead-based adsorption strategy for exosome isolation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 942077
- [30] Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *Annu Rev Biochem.* 2019;88:487–514

- [31] Zhao, J., Yang, J., Jiao, J., Wang, X., Zhao, Y., & Zhang, L. (2023). Biomedical applications of artificial exosomes for intranasal drug delivery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1271489
- [32] Li, Y. J., Wu, J. Y., Liu, J., Xu, W., Qiu, X., Huang, S., ... & Xiang, D. X. (2021). Artificial exosomes for translational nanomedicine. *Journal of nanobiotechnology*, 19, 1-20
- [33] Garcia-Manrique P, Gutierrez G, Blanco-Lopez MC. Fully artificial exosomes: towards new theranostic biomaterials. *Trends Biotechnol.* 2018; 36:10–4
- [34] Li, P., Li, L., Zhao, Y., Sun, L., & Zhang, Y. (2016). Selective binding and magnetic separation of histidine-tagged proteins using Fe₃O₄/Cu-apatite nanoparticles. *Journal of inorganic biochemistry*, 156, 49-54.
- [35] Ali, A., Zafar, H., Zia, M., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., & Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, science and applications*, 49-67.
- [36] Cornell R.M., Schwertmann U., *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2006.
- [37] Kang, Y. S., Risbud, S., Rabolt, J. F., & Stroeve, P. (1996). Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ particles. *Chemistry of materials*, 8(9), 2209-2211.
- [38] Aslan, M., Ozturk, S., Shahbazi, R., Bozdemir, Ö., Zeybek, N. D., Vargel, İ., ... & Ulubayram, K. (2024). Therapeutic targeting of siRNA/anti-cancer drug delivery system for non-melanoma skin cancer. Part I: Development and gene silencing of JAK1siRNA/5-FU loaded liposome nanocomplexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 203, 114432.
- [39] Li, P., Li, L., Zhao, Y., Sun, L., & Zhang, Y. (2016). Selective binding and magnetic separation of histidine-tagged proteins using Fe₃O₄/Cu-apatite nanoparticles. *Journal of inorganic biochemistry*, 156, 49-54.

- [40] Kumar, A., Kamihira, M., Galaev, I. Y., Iijima, S., & Mattiasson, B. (2003). Binding of Cu (II)-poly (N-isopropylacrylamide/vinylimidazole) copolymer to histidine-tagged protein: a surface plasmon resonance study. *Langmuir*, 19(3), 865-871.
- [41] Ekici, R., Bozdoğan, B., & Denkbaş, E. B. (2022). Development of electrochemical biosensor platforms for determination of environmental viral structures. *Applied Sciences*, 12(24), 12971.
- [42] Selimovic, A., Kara, G., & Denkbaz, E. B. (2022). Magnetic gelatin nanoparticles as a biocompatible carrier system for small interfering RNA in human colorectal cancer: Synthesis, optimization, characterization, and cell viability studies. *Materials Today Communications*, 33, 104616.
- [43] Kavaz, D., Odabaş, S., Güven, E., Demirbilek, M., & Denkbaş, E. B. (2010). Bleomycin loaded magnetic chitosan nanoparticles as multifunctional nanocarriers. *Journal of Bioactive and compatible polymers*, 25(3), 305-318.
- [44] Gülsu, A., Ayhan, H., & Ayhan, F. (2012). Preparation and characterization of ketoprofen loaded albumin microspheres. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 37(2).
- [45] Thakkar, H., Sharma, R. K., Mishra, A. K., Chuttani, K., & Murthy, R. R. (2005). Albumin microspheres as carriers for the antiarthritic drug celecoxib. *Aaps Pharmscitech*, 6, E65-E73.
- [46] Arshady, R. (1990). Albumin microspheres and microcapsules: methodology of manufacturing techniques. *Journal of Controlled Release*, 14(2), 111-131.
- [47] Zorba, B. I., Boyacıoğlu, Ö., Çağlayan, T., Reçber, T., Nemutlu, E., Eroğlu, İ., & Korkusuz, P. (2024). CB65 and novel CB65 liposomal system suppress MG63 and Saos-2 osteosarcoma cell growth in vitro. *Journal of Liposome Research*, 34(2), 274-287.
- [48] Arshinova, O. Y., Sanarova, E. V., Lantsova, A. V., & Oborotova, N. A. (2012). Lyophilization of liposomal drug forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 46, 228-233.

- [49] Dékány, G., Csóka, I., & Erös, I. (2001). Interaction between liposomes and neutral polymers: Effect of adsorption on drug release. *Journal of dispersion science and technology*, 22(5), 461-472.

