



**SIÇAN KEMİK İLİĞİ KÖK HÜCRELERİNDEN
EKSOZOM İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU
İSMAİL FURKAN TURAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN
Mart - 2021
Her hakkı saklıdır**

**T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIÇAN KEMİK İLİĞİ KÖK HÜCRELERİNDEN
EKSOZOM İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

İSMAİL FURKAN TURAN

**TOKAT
Mart - 2021**

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**2019/82 proje numarasıyla Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.**

İsmail Furkan TURAN tarafından hazırlanan “Sıçan Kemik İliği Kök Hücrelerinden Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 10 ŞUBAT 2021 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Sağlık
Hizmetleri MYO, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri
Programı

.....

Üye

Doç. Dr. Yakup ULUSU

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

.....

ONAY

.....

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

---/---/20--

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

İsmail Furkan TURAN

10 Şubat 2021

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇAN KEMİK İLİĞİ KÖK HÜCRELERİNDEN EKSOZOM İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

İSMAİL FURKAN TURAN

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM
ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ SEÇİL ERDEN TAYHAN)

Eksozomlar, hücreler arası iletişim, antijen sunumu ve proteinlerin, RNA'nın ve diğer moleküllerin taşınması dahil olmak üzere birçok biyolojik işlemde önemli rol oynayan nano ($\approx 30-150$ nm) ölçekli hücre dışı veziküllerdir. RNA ve proteinleri hücrelere aktarır ve hücreden hücreye iletişimde önemli roller oynamaktadırlar. Çoğunlukla kan, idrar, anne sütü, amniotik sıvı, bronkoalveoler sıvı gibi hemen hemen bütün vücut sıvılarından izole edilebilmektedirler. Eksozomlar, kanser dahil birçok hastalığın tanı ve tedavisinde potansiyel belirteçler olma özelliği taşırlar. Eksozomların taşıdıkları kargo içeriklerinin (özellikle mRNA ve miRNA içeriği) hastalıkların tanısında önemli bir avantaj olacağı düşünülmektedir. Eksozomlar salgılandıkları hücrelerin membran ve sitoplazmik özelliklerini karakteristik olarak taşımaktadırlar. Yapılan son araştırmalarda kanser, nörodejeneratif hastalık, böbrek, karaciğer hastalıkları dahil olmak üzere hastalığının izlemesi ve teşhisinde büyük bir öneme sahiptirler. Tez kapsamında, eksozomlar ultrasantrifüj, PEG 6000 ve PEG 20000 yöntemleri ile mezenkimal kök hücrelerden elde edilmiştir. İzole edilen eksozomların Taramalı Elektron Mikroskopunda görüntüleri alınmıştır. Kullanılan yöntemlerde en iyi sonuçlar PEG 6000 ve ultrasantrifüj yöntemlerinden elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Eksozom, Kemik iliği, Mezenkimal Kök hücre, Sıçan

ABSTRACT

MASTER THESIS

EXOSOME ISOLATION FROM RAT BONE MARROW DERIVED STEM CELLS AND THEIR CHARACTERIZATION

İSMAİL FURKAN TURAN

TOKAT GAZİOSMANPASA UNIVERSITY

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

(SUPERVISOR:)ASST. PROF. DR. SEÇİL ERDEN TAYHAN

Exosomes are nanoscale (30-150 nm) extracellular vesicles that play an important role in many biological processes including intercellular communication, antigen presentation and transport of proteins, RNA and other molecules. It transfers RNA and proteins to cells and play important roles in cell-to-cell communication. Mostly, they can be isolated from almost all body fluids such as blood, urine, breast milk, amniotic fluid, bronchoalveolar fluid. Exosomes are potential markers in the diagnosis and treatment of many diseases, including cancer. It is thought that the cargo contents (especially mRNA and miRNA content) carried by the exosomes will be an important advantage in the diagnosis of diseases. Exosomes characteristically carry the membrane and cytoplasmic properties of the cells they are secreted from. In recent studies, they are of great importance in the monitoring and diagnosis of the disease, including cancer, neurodegenerative disease, kidney and liver diseases. Exosomes of stem cells were obtained by ultracentrifugation, PEG 6000 and PEG 20000 methods. Images of the isolated exosomes were taken by Scanning Electron Microscope. In the methods used, the best results were obtained from PEG 6000 and ultracentrifuge methods.

KEYWORDS: Exosome, Bone marrow, Mesenchymal Stem cell, Rat

ÖNSÖZ

Üniversite hayatım boyunca kendimi geliştirmem de her zaman desteğini esirgemeyen bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi SEÇİL ERDEN TAYHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek lisans çalışmalarında her zaman yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışma sürecimde bana yardımlarını esirgemeyen başta Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN'e, Arş. Gör. Rizvan İMAMOĞLU'na ve Duygu DÜZGÜN'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 2019/82 proje numarasıyla destekleyen Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, sevgili anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

İsmail Furkan TURAN

10 Şubat 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER.....	1
2.1. Kök Hücreler	1
2.1.1. Kök hücrelerin genel özellikleri	2
2.1.2. Kök hücre tipleri.....	4
2.3. Eksozomlar.....	8
2.3.1. Eksozomların yapı ve işlevleri.....	12
2.3.2. MKH türevli eksozomlar ve işlevleri	13
2.3.3. Eksozomların karakterizasyonu	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. Sıçan Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	16
3.2. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması.....	17
3.3. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurulması	18
3.4. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözdürülmesi	18
3.5. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Farklılaşması	19
3.5.1. Osteojenik farklılaşma	19
3.5.2. Adipojenik farklılaşma	21
3.6. Eksozom-Free Serum Hazırlanışı	24
3.7. Eksozom İzolasyonu	26
3.7.1. Ultrasontrifüj yöntemi	26
3.7.2. PEG 6000 ve PEG 20000 yardımıyla eksozom izolasyon yöntemi.....	27
3.8. Eksozom Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskopunda incelemeye hazırlanması(SEM).....	28
4. BULGULAR	29
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Görüntüleri.....	29
4.2. Elde Edilen Eksozomların SEM Takibi Yapıldığı Yüzeyler	30

4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	30
4.4. Eksozom-Free Serum İçerisinde Uzaklaştırılamayan Eksozomlar	34
4.5. Ultrasantrifüj Yöntemi ile İzole Edilen Eksozomlar.....	36
4.6. PEG 6000 Yöntemi ile İzole Edilen Eksozomlar	36
4.7. PEG 20000 Yöntemi ile İzole Edilen Eksozomlar	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR	40
7.ÖZGEÇMİŞ	46



SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
UPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler
EKH	Embriyonik Kök Hücreler
Kİ-MKH	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
Kİ	Kemik İliği
MVB	Multivesiküler Gövde
EV	Ekstraselüler Veziküller
IBMX	İzobütilmetilksantin
Dex	Deksametazon
ECM	Hücre Dışı Matriks
Asc	Askorbik Asit
ALP	Alkalın Fosfataz
PBS	Fosfat Tuz Solüsyonu
CM	Şartlandırılmış Ortam
HMDS	Hekzametildisilazan
FBS	Fetal Bovine Serum
UV	Ultraviyole
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
PEG	Polietilen Glikol

Semboller	Açıklama
Ca	Kalsiyum
P	Fosfor
Mg	Magnezyum
CO ₂	Karbondioksit

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kök Hücre Gelişimi.....	1
2.2. Simetrik ve Asimetrik Kök Hücre Bölünmeleri.....	3
2.3. Embriyonik Kök Hücre Kökeni.....	5
2.4. Mezenkimal Kök Hücre Gelişimi.....	6
2.5. Mikro-parçacıkların, eksozomların ve apoptotik cisimlerin oluşum mekanizmalarının şematik gösterimi.....	10
2.6. Eksozomların Moleküler Bileşenleri.....	11
2.7. Biyogenez ve EV'lerin salınımı.....	13
2.8. MKH Türevli Eksozomların Ana İşlevleri.....	14
3.1: Serumun α -MEM besi ortamı ile seyreltilmesi.....	20
3.2: Ultrasantrifüj sonunda Serum içeriğinden uzaklaştırılan eksozomlar.....	20
3.3: Ultrasantrifüj Yöntemi ile Eksozom izolasyonu.....	22
4.1: 7 günlük Kİ-MKH'lerinin (P/2) ters faz ışık mikroskop görüntüleri.....	31
4.2: Elde edilen eksozomların SEM takibi yapıldığı yüzeyler.....	31
4.3: Serum içerisindeki eksozomların uzaklaştırılması sonucu ortamda kalan eksozomların SEM görüntüleri.....	32
4.4: Ultrasantrifüj yöntemi ile elde edilmiş eksozomların SEM görüntüleri.....	33
4.5: PEG 6000 yöntemi ile elde edilmiş eksozomların SEM görüntüleri.....	33
4.6: PEG 20000 yöntemi ile elde edilmiş eksozomların SEM görüntüleri.....	34
4.7: Farklılaşma ortamları eklenmeden önce Kİ-MKH ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.....	34
4.8: Osteojenik farklılaşma boyama öncesi Kİ-MKH ters ışık mikroskobu görüntüleri.....	35
4.9: Kİ-MKH osteojenik farklılaşma Alizarin Red S boyama mikroskobu görüntüleri.....	35
4.10: Kİ-MKH osteojenik farklılaşma Von Kossa boyama mikroskobu görüntüleri.....	36
4.11: Kİ-MKH Adipojenik farklılaşma Oil Red O boyama mikroskobu görüntüleri.....	37

TABLO LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Eksozom-Free Serumlu α -MEM Besi Ortamı Hazırlanması.....	21
3.2. PEG 6000 ve PEG 20000 Eksozom İzolasyon Yöntemi	23
3.3. Osteojenik Farklılaşma Ortamı	27
3.4. Adipojenik Farklılaşma Ortamı	29



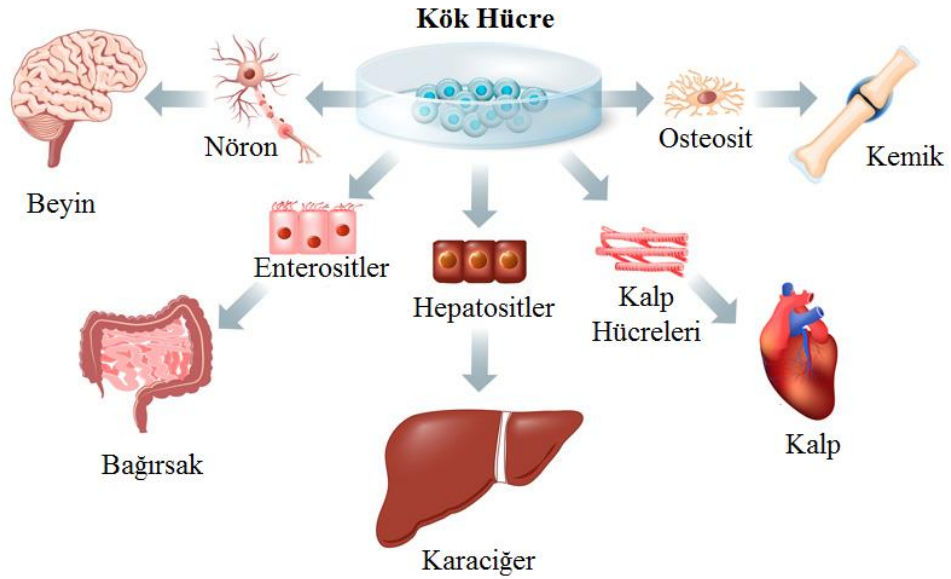
1. GİRİŞ

Eksozomlar, çok sayıda hücre tipinden salınan ve hücreler arası iletişim, antijen sunumu, mRNA ve miRNA dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonlarını gerçekleştiren, 40-150 nm boyutundaki hücre dışı veziküllerdir. Eksozomlar, hücresel nişin önemli düzenleyicileridir ve kanser gibi birçok hastalıkta değişmiş karakteristikleri, tanısal ve terapötik uygulamalar için ve ilaç verme aracı olarak önemini göstermektedir. Eksozomlar, biyolojik sıvılardan ve *in vitro* hücre kültürlerinden çeşitli strateji ve teknikler kullanılarak izole edilmektedir (Greening ve ark, 2015).

2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklılaşma yoluyla belirli bir dokudaki olgun hücreleri üretme yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanmaktadır (Reya ve ark., 2001).



Şekil 2.1: Kök Hücre Gelişimi

(<https://gowellness.com/stem-cell-revolution/> dan uyarlanmıştır)

Kök hücreler yıllar boyunca suskun kalabilen fakat hücrel farklılaşma, yaralanma veya onarım durumlarında aktif hale gelebilen hücrelerdir. Kendilerini yenileyebilmekte ve kendi hücre topluluklarının devamlılığını sağlayabilmektedirler (Ramalho-Santos ve ark. 2007; Can, 2013). Proliferasyonları ve farklılaşma kapasiteleri göz önüne alındığında, kök hücreler, hücre temelli yeni tedavilerin gelişimi için büyük potansiyele sahiptirler. Bu klinik uygulamalar, modern kök hücre araştırmalarının tarihsel anlamda ortaya çıkması ile birlikte popüler hale gelmiştir (Ramalho-Santos ve ark, 2007).

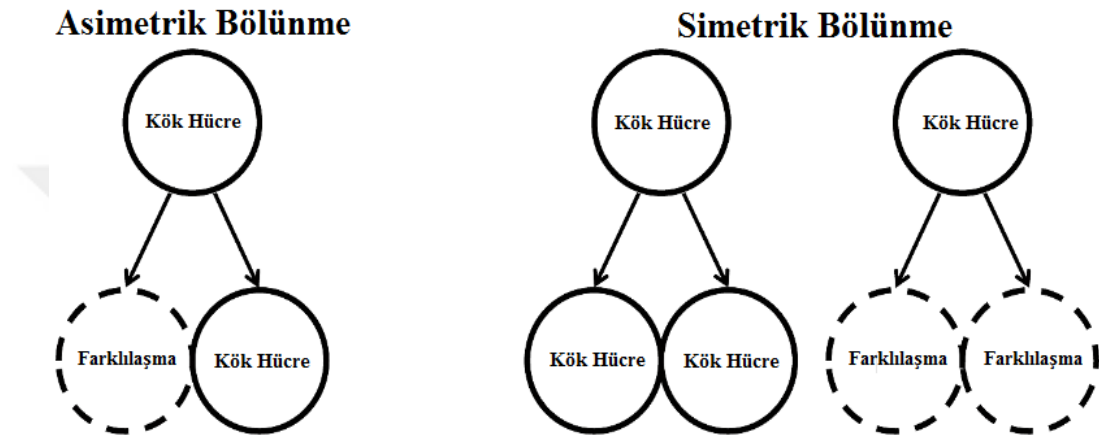
1960'larda Kanada'lı bilim adamları Ernest A. McCulloch ve James E. Till, fare kemik iliğinde koloni oluşturan hücrelerin (hematopoetik kök hücreler) varlığını kanıtlayarak kök hücre araştırmaları ile ilgili ilk temeli ortaya koymuşlardır (Girlovanu ve ark., 2015). Şimdiye kadar, çeşitli kök hücre tipleri izole edilmiş ve *in vitro* olarak kültürlenmiştir. Kökenleri ile ilgili olarak kök hücreler üç geniş kategoriye ayrılmıştır. Bunlar embriyonik, fetal ve yetişkin kök hücreler olarak sıralanmaktadır. Söz konusu hücrelere ek olarak, 2007 yılında Shinya Yamanaka tarafından insan derisi fibroblastlarının pluripotent hücrelere yeniden programlanması ile atılım yapan dördüncü bir kategori keşfedilmiştir. Bu hücreler uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH) olarak adlandırılmaktadır. Embriyonik kök hücrelere benzer şekilde bu hücreler de üç germ tabakasının hepsine farklılaşabilmektedir. Ayrıca, hastalığa özgü genetik özellikleri, insana en yakın modeller üzerinde inceleme olanağı sunarak hastalıkların modellenmesindeki önemli gelişmeleri de devamında getirmektedir (Girlovanu ve ark., 2015).

2.1.1. Kök hücrelerin genel özellikleri

Kendini Yenileyebilme

Kendini yenileme, bir kök hücrenin, ana hücreye benzer bir gelişim potansiyeline sahip bir veya birden fazla kök hücre oluşturmak için asimetric veya simetric (Şekil 2.2) olarak bölündüğü işlemdir. Kök hücrelerin yenilenme özelliği; kendini yenileyebilme yeteneği, kök hücrelerin gelişim süreci boyunca sayılarını arttırması ve yetişkin dokulara tutulması temeline dayanmaktadır. (Shenghui ve ark., 2009). Bu işlemin moleküler mekanizmalarında kilit rol oynayan transkripsiyon faktörleri, SOX2, NOTCH, WNT, PTEN, p53, Myc ve ayrıca HOX grubundan olanlardır (Girlovanu ve ark., 2015).

Hücre bölünmesi, çok hücreli bir organizmada farklı dokuların üretilmesi için kritik öneme sahiptir. Simetrik bölünmeler genellikle homojen hücre popülasyonlarını artırırken, asimetrik hücre bölünmesi kök hücre popülasyonlarını korumakta ve çeşitli hücre tiplerinin üretilmesine izin vermektedir. Asimetrik olarak bölünen bir hücre, farklı hücresel alanlar oluşturmak için mRNA, proteinler, hücre yüzeyi belirteçleri veya organeller gibi moleküler bileşenleri polarize etmektedirler (Pillitteri ve ark, 2016).



Şekil 2.2: Simetrik ve Asimetrik Kök Hücre Bölünmeleri
(https://plos.figshare.com/articles/_Symmetric_and_asymmetric_stem_cell_divisions_/83473'
dan uyarlanmıştır)

Çoğu dokuda kök hücre yenilenmesi doku rejenerasyonu ile birleştirilmektedir. Dokular farklı gelişimsel ihtiyaçlara ve hücresel hiyerarşiye sahip olduklarından, yetişkin doku kök hücrelerinin *in vivo* kendi kendini yenileme frekansları farklılık gösterebilmektedir. Bununla birlikte, temel prensip aynıdır; kök hücreler, uzun süreli doku rejenerasyonunu sürdürmek için kendi kendini yenilemektedirler (Fuchs ve ark., 2012).

Farklılaşma (Plastisite)

Kök hücre fenotipini tanımlayan önemli bir özellik plastisitedir. Bu, nihayetinde spesifik bir hücre fenotipine yol açacak olan genetik bir ekspresyon profili benimseyerek hücrelerin farklılaşma kapasitesine atıfta bulunurlar. Sonuç olarak, özel hücrelerin daha geniş panellerine farklılaşma yeteneklerine göre, kök hücreler dört sınıfa ayrılırlar (Girlovanu ve ark., 2015):

Totipotent Kök Hücreler; Organizmadaki tüm hücelere dönüşebilme yeteneğine sahip zigot hücrelerine totipotent hücre denilmektedir (Oyar, 2016). Plakental hüceler de dahil olmak üzere her üç germ tabakasından kaynaklanan hücelere farklılaşabilmektedirler. Özelleştirilmemiş hüceler, simetrik ve asimetrik bir bölünmeye maruz kalabilmektedir. Ayrıca, Oct 3/4, Nanog, SSEA1 ve SSEA 3-4 gibi fenotipik ve moleküler spesifik belirteçler sergilemektedir (Girlovanu ve ark., 2015)

Pluripotent Kök Hüceler; blastosistin iç külesinden izole edilmektedir (Anonim, 2019, Girlovanu ve ark., 2015). Pluripotent kök hüceler üç germ katmanının hepsinden (endoderm, mesoderm ve ektoderm) farklılaşmamış hücre tipleri oluşturabilme yeteneğine sahiptirlerdir. Ancak plakental veya ekstra embriyonik hüceler oluşturma yeteneğinden yoksundurlar (Girlovanu ve ark., 2015, Oyar, 2016).

Multipotent kök hüceler; belli bir germinal tabaka ile sınırlı sayıda hücreye farklılaşabilme yeteneğine sahip hücelerdir (Girlovanu ve ark., 2015).

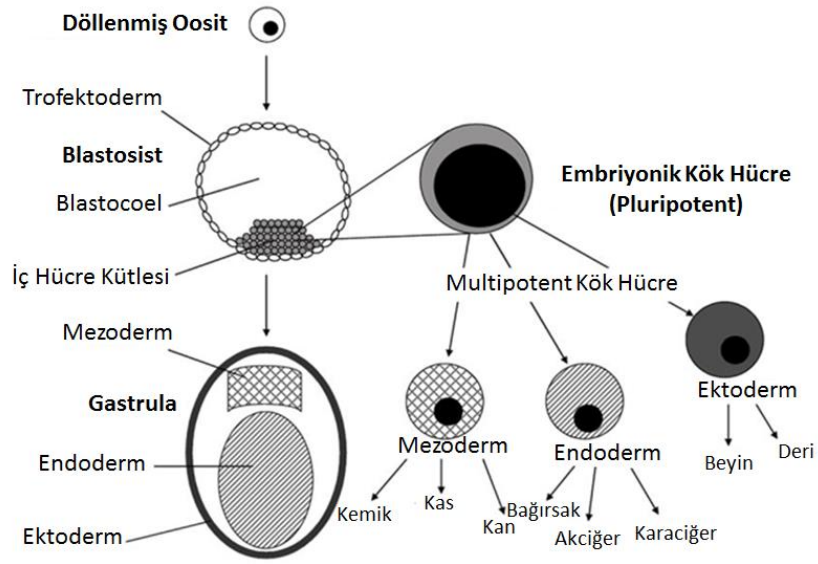
Mezenkimal kök hüceler birçok hücre tipine farklılaşabilen multipotent kök hüceler olarak bilinmektedir. Bu kök hüceler kemik, kas, kıkırdak, yağ ve diğer benzer dokulara farklılaşmaktadır. Multipotent kök hüceler spesifik hücre tiplerini üretebilmektedir (Anonim, 2019).

Unipotent kök hüceler; farklılaşarak tek bir hücre tipine dönüşmektedirler ve yetişkin organizmalarda bulunurlar (Girlovanu ve ark., 2015).

2.1.2. Kök hücre tipleri

Embriyonik Kök Hücre

İnsan embriyoları döllenmeden 4-5 gün sonra, blastosist aşamasına geldiklerinde oluşmaktadır. Embriyonik kök hüceler (EKH), blastosistin iç hücre külesinden türetilir. İki ayırt edici özellik sunarlar: üç germ katmanının tüm türevlerine farklılaşabilirler ve tanımlanmış koşullar altında kendilerini süresiz olarak çoğaltabilirler (Hui ve ark., 2011).



Şekil 2.3: Embriyonik Kök Hücre Kökeni (Biehl ve Ark., 2009)

Embriyonik kök hücreler moleküler düzeyde çok iyi karakterize edilmiştir. İlgili hücrelerde transkripsiyon faktörleri (Oct-4, NANOG ve Rex-1) hücre yüzeyi antijenleri (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 ve TRA-1-81) ve yüksek endojen alkali fosfataz aktivitesi ile ilgili genlerin ifade edildiği bilinmektedir. Ayrıca embriyonik kök hücreler yüksek telomeras aktivitesini korumakta ve süresiz olarak kendini yenilemeye devam edebilmektedirler (Klimanskaya, 2019).

Yetişkin Kök Hücre

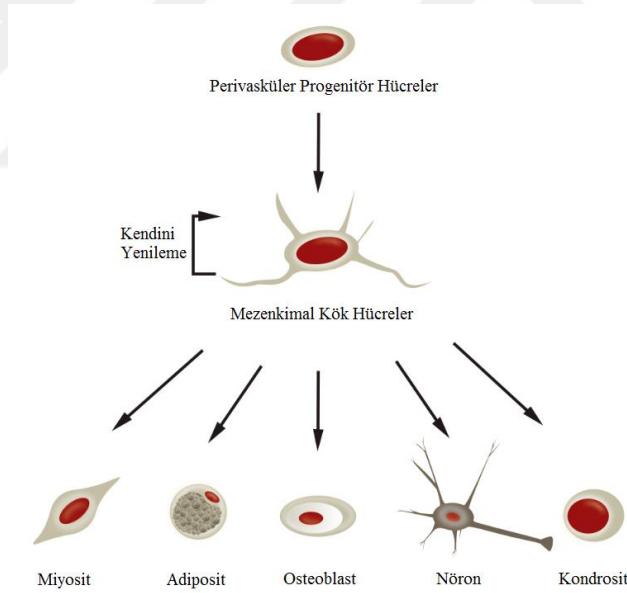
Yetişkin kök hücreler organizmadaki doku veya organlarda bulunan multipotent kök hücrelerdir. Farklılaşabilme ve kendini yenileyebilme yeteneklerine sahip olan bu hücreler farklılaşma özelliklerine göre alt sınıflarda (mezenkimal kök hücre, hematopoetik kök hücre) incelenmektedir (Erden, 2014).

Hematopoetik kök hücreler, klinikte, özellikle kan bozukluklarını tedavi etmek, radyasyon ve kemoterapiden sonra hematopoetik işlevi geri kazanmak için kullanılan ilk kök hücre tipleri arasındadır. Bu hücreler, birden fazla hematopoetik soylara farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve travmatik yaralanmalar gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Son olarak, bazı kanser kök hücrelerinin hematopoetik kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle onkoloji için yeni terapötik stratejiler geliştirmek

amacıyla bu hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden moleküler ve hücresel faktörleri anlamak çok önemlidir (Rızvanov ve ark., 2016).

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), çeşitli dokularda bulunan ve farklı mezodermal soylara farklılaşma kapasitelerine sahip olan multipotent hücrelerdir (Bruno ve ark., 2014). Farklılaşma potansiyeli ve kendini yenileme özelliklerine sahiptirler. Farklılaşma potansiyellerinin yanı sıra, MKH'ler büyüme faktörleri, sitokinler vb. bazı besleyici faktörleri salgılayabilme kabiliyetine sahiptir. MKH'ler adipoz doku, kemik iliği, kemik veya kas gibi mezoderm kaynaklı olanlar dahil birçok doku da bulunduğu gibi beyin, dalak, karaciğer, böbrek, akciğer, timüs ve pankreastan da izole edilmiştir (Keshtkar ve ark., 2018). Farklı doku kaynaklarından elde edilmelerine rağmen MKH'ler kendi dokularını yansıtan bazı özellikleri ile benzer bir karakteristik özellik göstermektedir.



Şekil 2.4: Mezenkimal Kök Hücre Gelişimi

(<https://www.promocell.com/cells-in-action/some-human-mesenchymal-stem-cells-are-more-equal-than-others-origins-and-differences>'dan uyarlanmıştır)

MKH'ler osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere ve diğer mezodermal kökenli hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. İltihaplanma ve doku onarımı, MKH'lerin rejeneratif tıptaki çalışmalarda önemli bir rol oynamaktadır (Lee ve ark., 2013).

Araştırma grupları tarafından MKH kaynaklı parakrin faktörlerinin, immün hastalıklarda kemik ve kıkırdak rejenerasyonu, nörolojik hastalıklar, karaciğer hasarı, akut böbrek yetmezliği ve kardiyovasküler hastalıklar gibi farklı bozukluklar üzerindeki terapötik etkilerine yönelik çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Merinos-Gonzalez ve ark., 2016; Keshtkar ve ark., 2018). Bu çalışmalar, MKH'ler tarafından salgılanan moleküllerin, hedef hücreleri doğrudan aktive eden veya komşu hücreleri aktif faktörleri salgılaması için uyaran araçlar olarak etkili bir rol oynadığını göstermiştir (Caplan ve ark., 2006; Keshtkar ve ark., 2018). Bununla birlikte, yakın zamanda, MKH'lerin, hasar görmüş hücrelere veya dokuya bilgi aktarımı yoluyla doku rejenerasyonuna katılan ve MKH'lere benzer biyolojik aktivite sergileyen çok sayıda hücre dışı vezikülleri (EV'ler) serbest bıraktığı kabul edilmiştir (Rani ve ark. 2015; Keshtkar ve ark., 2018).

2.2.1. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH)

Kemik iliği (Kİ) kemik homeostazisini düzenleyen önemli bir kemik kompartımanıdır. Kİ ayrıca çok sayıda sitokin ve immün modülatör faktörleri salgılayan birçok farklı hücre tipini içerdiği için bir immün organ olarak algılanabilir. Son olarak, Kİ'nin metabolik bir organ olduğu ve son zamanlarda tüm vücut enerji metabolizmasını düzenlediği gösterilmiştir (Tencerova ve ark., 2016).

Kİ'nin hücresel bileşimi, osteoklastlar ve lenfoid soylar dahil olmak üzere miyeloid soyuna ve bağışıklık hücrelerine yol açan karmaşık hematopoetik hücrelerdir. Aynı zamanda kemik iliği stromal kök hücreleri ve bunların farklılaştırılmış adiposit ve osteoblast soylarının yanı sıra endotel hücreleri, perisitler ve nöronal hücreleri içeren bir stroma bölmesi içerir. Kİ'nin hücresel bileşimi yaş, cinsiyet ve metabolik durumla birlikte değişmektedir (Justesen ve ark, 2001; Rosen ve ark, 2009)

Kİ-MKH'ler, fare, sıçan, tavşan ve insan denekleri dahil olmak üzere çeşitli türlerden izole edilmiştir. Farklı türlerden gelen MKH'ler kısmen benzer özelliklere sahip olsa da türler arasında bazı çeşitlilikler ortaya çıkmaktadır. İnsan kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin fareden izole edilen MKH'lere göre kültür içinde çoğalması daha kolaydır (Yoshimura ve ark., 2006).

Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotipi söz konusu olduğunda, kültür hücrelerinin CD44 (hiyalüronan reseptörü), CD73 (ekto 5 nükleotidaz), CD90 (thy- 1), CD105 (dönüştürücü büyüme faktörü-b reseptörü III), CD146 (melanom hücresi yapışma molekülü, Mel-CAM) dahil olmak üzere çeşitli spesifik olmayan hücre yüzey markörlerini eksprese ettiği, bununla birlikte hemopoietik markerler CD11b, CD14, CD45 ve CD34'ün ekspresyonundan yoksun oldukları gösterilmiştir. Ayrıca, MKH'ler ana histo-uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf I moleküllerinin orta düzeylerini ifade ederken, MHC sınıf II molekülleri sadece interferon- γ (IFN γ) ile kısa işlemiden sonra tespit edilebilmektedir (Pontikoglou, 2011).

2.3. Eksozomlar

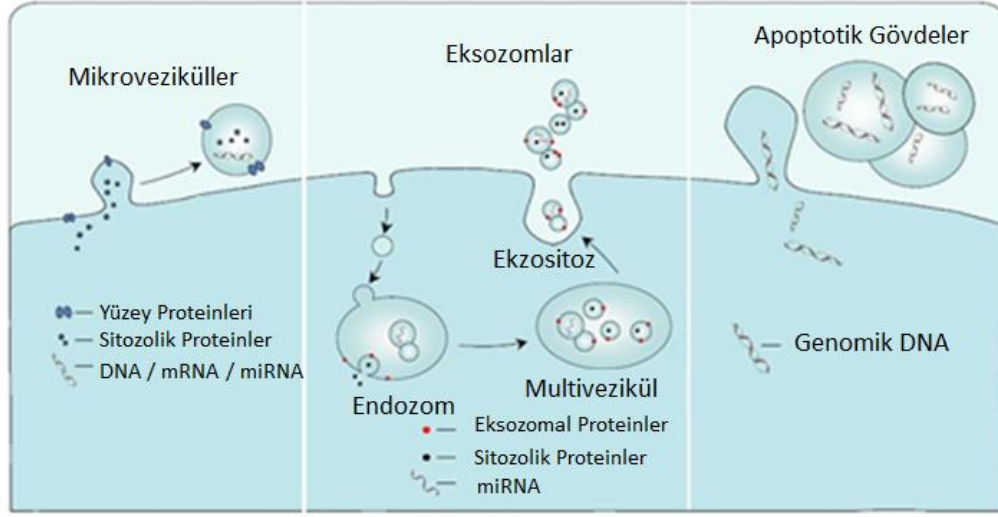
Eksozomların keşfi, 1980'lerin ortalarında R. Johnstone ve P. Stahl tarafından keşfedilmiştir. Olgunlaşmamış koyun retikülositleri, olgunlaşma işlemi sırasında retikülositin hücre yüzeyi ile multiviküler endozomun füzyonu üzerine salınan küçük membran vezikülleriyle bağlantılı olarak transferrin reseptörlerinin büyük kısmını serbest bıraktığı gözlemlenmiştir (Cicero ve ark, 2012). İlginç olan durum ise, etiketli transferrin reseptörlerinin retikülositler içinde içselleştirildiği ve daha sonra içinde küçük (≈ 50 nm) veziküllere yeniden paketlenildiği gözlemlenmiştir. Hücre dışı boşluğa salgılanan bu veziküller 1989 yılından sonra Johnstone ve arkadaşları tarafından eksozom olarak adlandırılmıştır (Li ve ark, 2017).

Eksozomlar normal veya hastalıklı hücrelerden interstisyel boşluklara ve bazı durumlarda vücut sıvılarına salınan iki tabakalı zara bağlı nanovesiküllerin bir alt kategorisidir. Kültüre edilmiş hücreler tarafından ortama salınırlar. Kaynaklarına, izolasyon metodlarına, boyutlarına ve yüzey markörlerine bağlı olarak diğer veziküllerden ayrılırlar. Eksozomların fizyolojik ve patolojik süreçler için işlevleri,

boyutlarından dolayı bilinmemektedir. Küçük boyutları nedeniyle sıvılarda asılı halde bulunurlar; bu nedenle etkileri, içerikleri ve fonksiyonları, tanımlanamamıştır (Zhang ve ark, 2014).

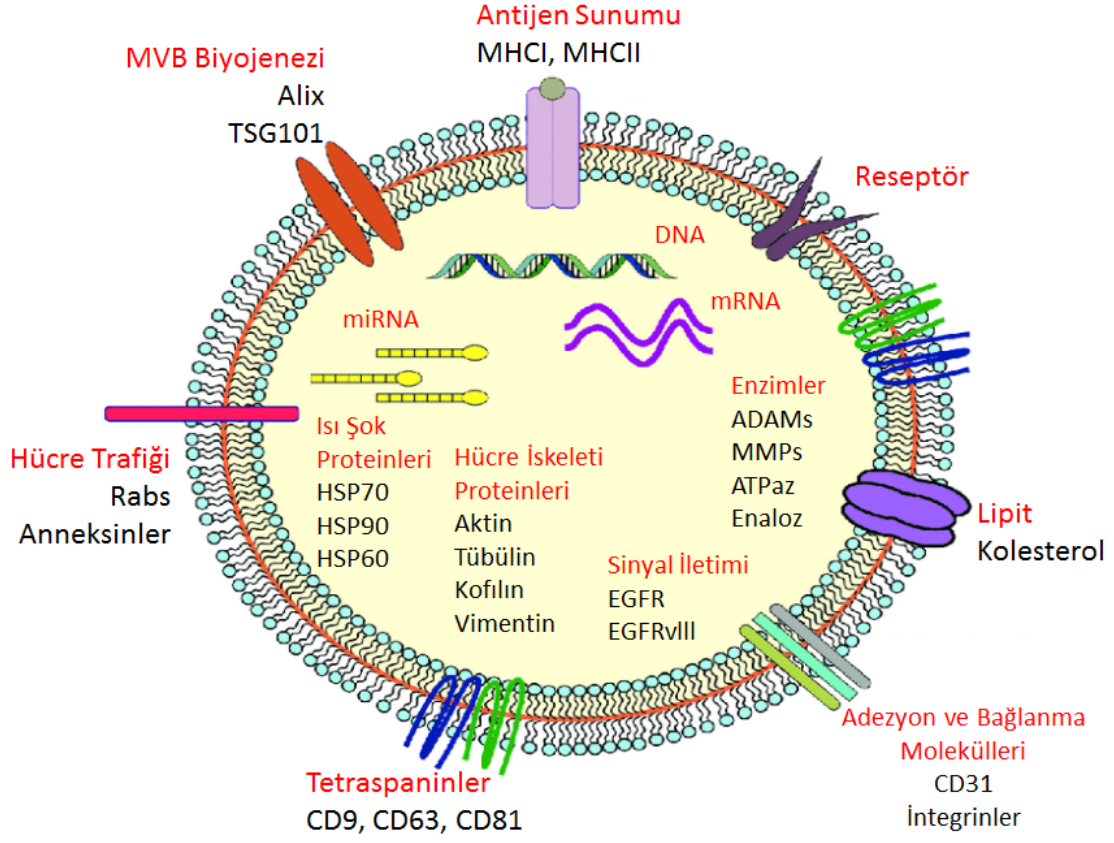
Eksozomlar ve ilişkili mikro-parçacıkların bir zamanlar hücrel atık olduğu düşünülmekteydi, fakat günümüzde eksozomlar, hedef hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyebilen yeni tanımlanmış hücreler arası iletişim sisteminin bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. Eksozomların ve ilgili mikro-parçacıkların otokrin (kanser hücreleri gibi aynı hücre tipi arasındaki lokal sinyaller), parakrin (epitelyal kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki gibi farklı hücre tipleri arasındaki lokal sinyaller) temininde yer alması ve endokrin (genellikle kan gibi vücut sıvılarında taşınan herhangi bir hücre tipi arasındaki uzak sinyaller) sinyalleri, bu yapılara uygulanan sinyalozomların sıkça kullanılmasına neden olmuştur (Zhang ve ark, 2014).

Eksozomlar boyutlarına ve bileşimlerine göre sınıflandırılmıştır; Mikroveziküller (50-300 nanometre), plazma zarının kabarcıklarından kaynaklanmaktadır (Aswad ve ark., 2016). Plazma zarının dışa doğru dökülmesinden oluşan, boyutları 0.2-1.0 μm olarak tanımlanan plazma türevli veziküllerdir. Eksozomlar, çapı 40 ila 150 nm arasında olan en küçük membranöz veziküllerdir. İlk olarak endozom kaynaklı türetilmiş multiveziküler gövdelere salgılanmakta ve daha sonra multiveziküler gövdenin plazma membranı ile füzyonu ile serbest bırakılmaktadır. Apoptotik gövdeler, 1-4 μm boyut aralığındaki en büyük EV'lerdir. Apoptozun geç dönemlerinde bütün hücre tipleri tarafından salınırlar (Lázaro-Ibáñez ve ark, 2014). Bazı lipid kombinasyonları, yapışma ve hücreler arası sinyal moleküllerinin yanı sıra RNA'ları içeren EV'ler, hücreler arası iletişime katılırlar (Aswad ve ark., 2016).



Şekil 2.5: Mikro-parçacıkların, eksozomların ve apoptotik cisimlerin oluşum mekanizmalarının şematik gösterimi (Anonim, 2018)

Eksozomlar, hücreler arası iletişim, antijen sunumu ve proteinlerin, RNA'nın ve diğer moleküllerin taşınması dahil olmak üzere birçok biyolojik işlemde önemli rol oynayan nano ($\approx 30-150$ nm) ölçekli hücre dışı veziküllerdir (Wu ve ark., 2017). RNA ve proteinleri hücrelere aktarır ve hücreden hücreye iletişimde önemli roller oynamaktadırlar. Aynı zamanda eksozomlar ile ilgili yapılan son araştırmalarda kanser, nörodejeneratif hastalık, böbrek, karaciğer hastalıkları dahil olmak üzere hastalığının izlemesi ve teşhisinde büyük bir öneme sahiptirler. Eksozomlar geniş bir araştırma fırsatı sunmaktadır; bunun nedeni ise kan, tükürük, idrar, semen, balgam, anne sütü ve omurilik sıvısı dahil olmak üzere hemen hemen tüm biyolojik sıvılarda bulunulmasıdır. (Kim ve Ark, Wu ve Ark.).



Şekil 2.6: Eksozomların Moleküler Bileşenleri (Whitehead ve Ark., 2017'den uyarlanmıştır)

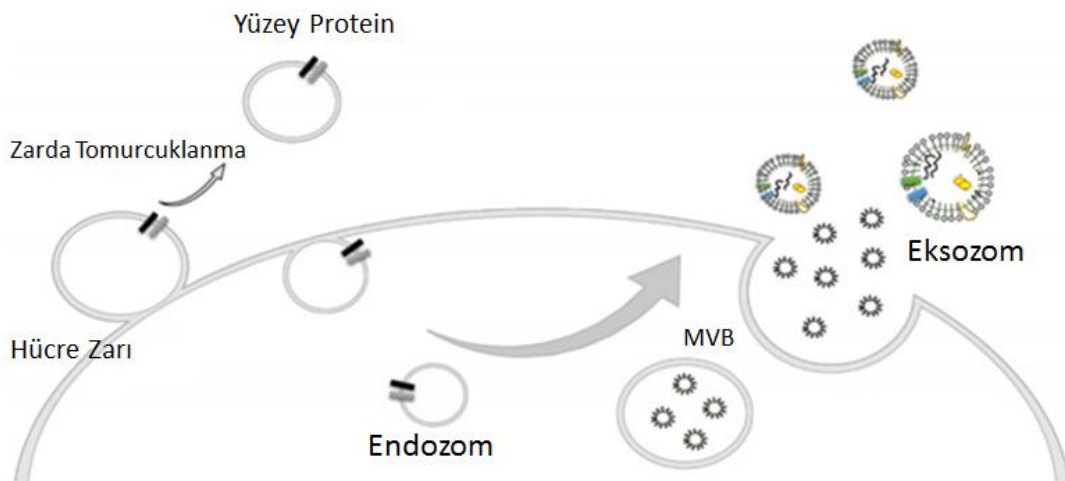
Farklı hücreSEL yapılardan kaynaklanan eksozomlar, tetraspaninler (CD81, CD63, CD9), Alix ve Tsg101 dahil evrimsel olarak korunan bir dizi protein molekülünü taşır, fakat aynı zamanda hücre kaynaklarına ve hücre kaynağının patofizyolojik durumlarına özgü proteinler ve RNA'lar da taşımaktadırlar. Eksozomların kargo bileşimi aynı zamanda mikro ortamı ile de modüle edilir. Hipoksi sırasında tümör hücreleri tarafından salgılanan eksozomlar, anjiyogenez ve metastazı kolaylaştıran proteinleri taşımaktadırlar (Yeh Yeo ve ark, 2017).

MKH'den türetilen eksozomlar, hücreSİZ tedavi için yeni bir işaret olarak görünmektedir. Bu nedenle biyolojik aktivitelerini koruyan ekzomların izolasyonu, küçük boyutları ve değişken yapıları nedeniyle büyük bir sorun haline gelmektedir. Eksozomlar, diferansiyel ultrasentrifüjleme, kromatografi, immün afinite ve benzer izolasyon yöntemleri içermektedir. Ancak, eksozomların izolasyonu için en yaygın

kullanılan yöntem diferansiyel ultrasantrifüj yöntemidir. Verimin artırılması ve büyük hacimli şartlandırılmış ortamların kullanım kolaylığı sebebi ile diğer yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte, saflık, membran bütünlüğü kaybı ve diğer bazı parametreler için ultrasantrifügasyon temelli eksozom izolasyonu için risk teşkil etmektedir (Gupta ve Ark., 2018).

2.3.1. Eksozomların yapı ve işlevleri

Eksozomlar, multivesiküler gövdeler (MVG) olarak adlandırılan zarın içe tomurcuklanması yoluyla oluşan nano boyutlu hücre dışı veziküllerdir. Multivesiküler gövdelerin plazma zarı ile füzyonu üzerine, eksozomlar hücre dışı ortama bırakılır ve mikro ortamda bulunan hedef hücreler tarafından alınabilir veya biyolojik sıvılar yoluyla uzak bölgelere taşınabilir (Lou ve Ark., 2017). Eksozomlar ve mikroveziküller, EV'ler ile bağlantılıdır. Hücrelerden türetilen EV'ler hücre iletişimi ve hücre sinyalleşmesine katkıda bulunmaktadır (Kang ve Ark., 2017). Eksozom membranları kolesterol, sfingomiyelin, seramid ve lipid proteinlerince zenginleştirilmiştir. Eksozomların, hem proteinleri hem de RNAları içerdiği araştırmalar ile kanıtlanmıştır (Braicu ve Ark., 2014, Lou ve Ark., 2017). Çoğu eksozom, tetraspaninlere (CD81, CD63 ve CD9), ısı şok proteinlerine (HSP60, HSP70 ve HSP90), ALIX'e ve TSG101'e sahiptir. Bununla birlikte, hücre kaynaklarını yansıtan eşsiz doku / hücre tipine özgü proteinlere de sahiptirler (Lou ve Ark., 2017).



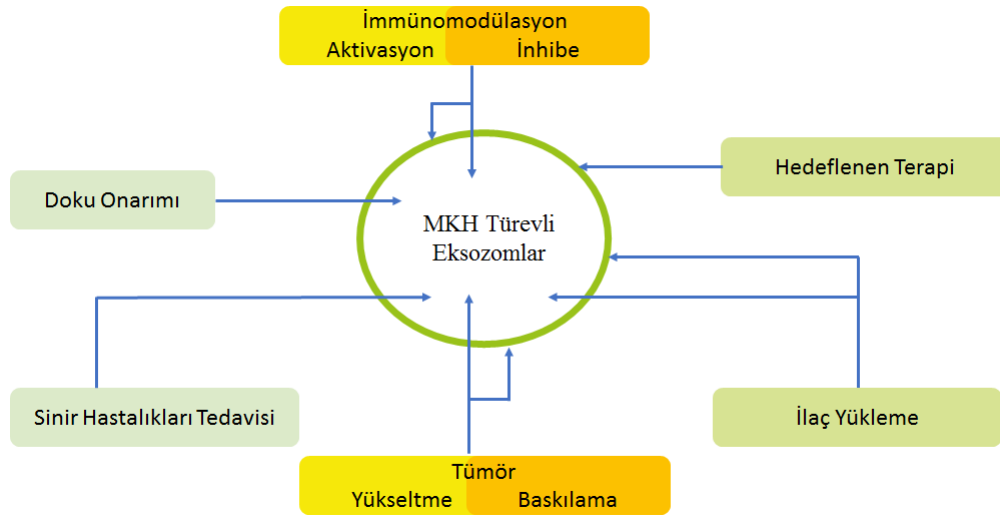
Şekil 2.7: Biyogenez ve EV'lerin salınımı. (Kang ve Ark., 2017'den uyarlanmıştır)

Viral veya bakteriyel olarak enfekte olmuş hücreler, hastalığı yaymak için araç olarak eksozomları kullanmaktadırlar. İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1, Epstein-Barr virüsü, Herpes simplex virüsü-1 ve hepatit C virüsü tarafından enfekte edilen hücrelerden elde edilen eksozomlar kan dolaşımında ve hedef hücrelere doğru ilerlemede görev almaktadırlar. Eksozomlar tarafından verilen virüsler, salınım yapar ve bunlar arasında çoğalır ayrıca konakçı immün hücrelerini etkileyen sistematik bir viral ajan dağılımına yol açmaktadırlar. Viral olarak enfekte olmuş hücrelere benzer şekilde, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*-veya *Mycobacterium avium* ile enfekte makrofajlar gibi bakteriyel olarak enfekte olmuş hücreler, hücre içi bakteriyel enfeksiyonlar sırasında immün yetmezlikte önemli bir role sahip olan, patojen türevli antijenleri içeren eksozomları salgılamaktadırlar (Lou ve Ark., 2017).

Kanser hücreleri ayrıca tümör ilerlemesinde ve metastazında eksozomları kullanmaktadırlar. Eksozomlar ayrıca doku yenilenmesinde aracı olarak ortaya çıkmaktadır. Hasar sırasında, kardiyomiyosit progenitör hücreleri endotel hücrelerinin göçünü uyarmak ve kalp rejeneratif aktivitesini teşvik etmek için eksozom salgılamaktadırlar. Eksozomların, periferik sinirlerin yenilenmesinde ve nöronal yaralanmaların onarımında da rol oynadığı gösterilmiştir (Lou ve Ark., 2017).

2.3.2. MKH türevli eksozomlar ve işlevleri

MKH türevli ekzomlar ilk olarak 2010 yılında, bir miyokard iskemisi / reperfüzyon hasarı fare modelinde incelenmiştir (Lai ve Ark., 2010, Yu ve Ark., 2014) ve daha sonra çeşitli hastalık modellerinde test edilmiştir. MKH'lerin, myoblast, insan akut monositik lösemi hücre hattı (THP-1) ve insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK), vb. diğer hücrelere göre daha fazla miktarda eksozom üretebildiği test edilmiştir (Yeo ve ark, 2013). MKH'lerden elde edilen eksozomlar ve diğer kaynaklar arasında morfolojik özellikleri ve izolasyon yöntemleri açısından fark yoktur. Tanımlamaya gelince, MKH türevli eksozomlar, sadece CD9 ve CD81 gibi eksozomların ortak yüzey işaretleyicilerini değil, aynı zamanda MKH'lerin zarı üzerinde ifade edilen CD29, CD44 ve CD73 gibi bazı adezyon moleküllerini ifade etmektedir (Yu ve Ark., 2014).



Şekil 2.8: MKH Türevli Eksozomların Ana İşlevleri (Cheng ve Ark., 2017'den uyarlanmıştır)

MKH kaynaklı eksozomlarda kardiyovasküler hastalık, doku (böbrek, karaciğer, cilt ve kornea) onarımı, immün hastalık, tümör inhibisyonu ve nörolojik hastalıktaki terapötik potansiyelleri nedeniyle büyük dikkat çekmektedir (Şekil 8). miRNA'ların ve proteinlerin transferinde büyük ölçüde işlev görürler, bu da hedef hücrelerdeki çeşitli aktivitelerin değişmesine neden olmaktadır (Cheng ve Ark., 2017).

Tümör mikro-ortamında MKH'ler tarafından üretilen eksozomlar büyük ölçüde pro-tümör etkilerine aracılık ederken, MKH türevli EV'lerin anti-tümör aktivitesi gösterdiğine dair kanıtlar vardır. Normal insan Kİ-MKH'lerinden türetilen eksozomların, çeşitli insan tümör hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Bruno ve Ark., 2013, Whiteside, 2017).

MKH türevli eksozomların tümörü inhibe edici potansiyelinin meme kanseri veya hepatoselüler karsinom hücreleri üzerinde tespit edildiği çalışmalar da mevcuttur (Lee ve ark, 2013; Pakravan ve ark, 2017). Ayrıca normal MKH'lerden gelen eksozomların, tümör hücresi progenitörlerinin, (örneğin radyasyonla tahribattan korunması ile) tümörü inhibe edici etkisi olabilmektedir. Örneğin, miR-100 ve bu eksozomların, VEGF üretimini ve dolayısıyla mTOR / HIF-1 a sinyal eksenini modüle ederek meme kanseri hücrelerinde anjiyogenezi baskılayabilmesi, doğrudan aracılık ettikleri anti-tümör etkileri ile ilgilidir. Gliomanın büyümesinin miR-146b bakımından kök hücre kaynaklı

eksozomlar tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir(Katakowski ve Ark., 2013, Whiteside, 2017). Bu nedenle, MKH'den türetilmiş vasküler yanıtlar veya tümör büyümesi eksozomlarında taşınan miRNA'lar ile modülasyon, anti-tümör aktivitelerinden sorumlu olabilmektedir. Bununla birlikte, MKH'ler tarafından tümör mikro-ortamlarda üretilen eksozomlar, *in vitro* veya *in vivo* olarak anti-tümör immün tepkilerini inhibe etmekte ve tümör büyümesini teşvik etmektedirler (Whiteside, 2017).

2.3.3. Eksozomların karakterizasyonu

Eksozomlar, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler, trombositler, nöronlar ve epitel hücreleri gibi birçok hücre tipi tarafından salınan endositik kökenli küçük membran kesecikleridir. Membran füzyonu veya ligand reseptörü etkileşimleri yoluyla diğer hücreler tarafından alınırlar. Eksozomlar, immün sistem, kan pıhtılaşması, nöronal iletişim, kök hücre ve doku onarımı dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerde yer almaktadır (Anonim, 2015).

Eksozomları tanımlamak için kullanılan yöntemler arasında taramalı elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu, nanoparçacık izleme analizi, transmisyon elektron mikroskobu, akış sitometrik analizi, western blot ve ELISA yöntemleri bulunmaktadır.

Eksozomların protein ve lipid kompozisyonlarında tanımlama için bazı özellikler sağladığı düşünülmektedir. İlk olarak, hücre zarlarında eksprese edildiği bilinen birkaç yapışma molekülü içerirler; örneğin, CD80 ve CD86, dendritik hücre kaynaklı eksozomlarda eksprese edilmekte ve CD19, B hücre kaynaklı eksozomlarda eksprese edilirler. Ek olarak, endozomal kökenlerinden ötürü, tüm eksozomlar membran taşıma ve füzyon proteinleri (GTPazlar, ekler ve flotilin), tetraspaninler (CD9, CD63, CD81 ve CD82), multivesiküler vücut biyogenezinde yer alan proteinlerin yanı sıra lipid ile ilgili proteinler (Alix ve TSG101) ve fosfolipazlar içermektedir. Bu proteinler akış sitometri analizi, western blot ve ELISA ile tespit edilmektedir (Yu ve Ark., 2014).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Sıçan Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Bu tez kapsamında Sıçan kemik iliğinden mezenkimal kök hücre izolasyonu için gerekli çalışmalar Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Etik Kurulu'nun 22.06.2018 tarihli yönetim kurul toplantısı ve 28 nolu kararı ile başlanmıştır. Deneysel çalışmalar, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Doğa Bilimleri ve Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

1. Çalışmalar laminar akışlı kabinde gerçekleştirildi. Çalışma öncesinde kabin UV ışığı ile 15 dakika sterilizasyon yapıldı.
2. Çalışma esnasında kullanılacak araç ve gereçler 121°C 45 dakika otoklavlandıktan sonra %70'lik alkol ile temizlenerek kabin içerisine alındı. İki adet 250 ml stok şişeye malzemelerin sterilizasyonunu koruması için %70'lik alkol ilave edildi. 2 adet petri kabına dokuların fizyolojik özelliklerinin korunması için PBS tamponu koyuldu.
3. Çalışmada kullanılacak 2 ergin sıçan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Biriminden temin edildi. Etik kurul tarafından alınan karara göre araştırma biriminde ötenazi işleminin ardından sıçanlar, %70'lik alkol içerisinde kemik iliği mezenkimal kök hücre izolasyonu için Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hücre Kültürü ve Hayvan Doku Kültürü laboratuvarına getirildi ve izolasyon işlemine ilgili laboratuvarında devam edildi.
4. Alkol içerisinde dış yüzey sterilizasyonu sağlanan sıçan, kabin içerisine alındı ve kabin içerisinde kemik iliği mezenkimal kök hücre izolasyonuna devam edildi.
5. Sırt üstü petri kabının içerisinde yatırılan sıçan arka bacakların iç kısmından üst deri ayrıldı.
6. Arka bacaklar vücuda bağlandığı bölgeden kesilerek femur ve tibia kemikleri çıkarıldı.
7. Çıkarılan bacaklar PBS (Fosfat Tuz Solüsyonu (L1835 Biochrom GmbH, Almanya) içeren petriye aktarıldı.
8. PBS tamponundan çıkarılan bacak tekrardan PBS tamponu içeren başka bir petri kabına alınarak yıkama işlemi yapıldı.

9. Femur ve tibia kemikleri ayrıldı.
10. Olabildiğince kas tabakasından temizlenen kemikler PBS tamponu içeren başka bir petri kabına alındı.
11. İnsülin enjektörleri hücre kültürü ortamları ile doldurularak hazırlandı.
12. Kas tabakasından ayrılan kemiklerin epifiz uçları kesildi.
13. Epifiz ucu kesilen kemikten iç boşluktan insülin enjektörü içerisindeki hücre kültür ortamı basınçla bir tüp içerisine akıtıldı.
14. Bu işleme tüm kemik iliğinin alınmış olduğundan emin olununcaya kadar devam edildi.
15. Tüm kemik ilikleri aynı tüp içerisine toplandı.
16. 1000 rpm'de +4°C de 5 dakika santrifüj (NÜVE, NF 800R) edildi.
17. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant döküldü ve hücreler 15 ml hücre kültür ortamı ile süspanse edilerek tekrar 1000 rpm'de +4° C'de 5 dakika santrifüj edildi.
18. Süpernatant döküldü ve üst basamaktaki işlem tekrarlandı.
19. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant döküldü. Hücreler 37,5 ml α -MEM (F0915, Biochrom, Almanya), %15 FBS (Capricorn), %1 L-Glutamin (200mM (100x), Gibco), %3 Penisilin/Streptomisin (Capricorn), %0,3 Gentamisin (biological industries(Bİ)), %0,3 Amfoterisin (Capricorn) içeren hücre kültürü ortamı içerisinde süspanse edildi.
20. 6 gözlü pleyt kültür kabına, süspanse edilen hücreler aktarıldı.
21. 37°C'de %5 CO₂'li %99 oranında nem sağlayan inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı. İlk kültür ortamı kültürasyon işleminin üç gün sonrasında yapıldı. Hücrelerin üremesine göre kültür kabının %80'i kaplandıktan sonra pasajlama işlemi yapıldı.

3.2. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması

1. Kullanılmış hücre kültürü ortamı çekildi.
2. Hücre yüzeyi 37°C'deki Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS (L1835 Biochrom GmbH, Almanya) ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin-EDTA (%0.05 tripsin, %0.02 EDTA in DPBS, biological industries) eklenerek 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 3-4 dakika hücrelerin kalkması beklendi.

4. İverted mikroskop ile tüm yüzeydeki hücrelerin kalktığı gözlemlendiğinde %15 FBS'li α -MEM içeren hücre kültürü ortamı ile kalkan hücreler toplanarak 800 rpm de +4 ° C'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonunda süpernatant döküldü. Tüpün pellet kısmına hafif bir şekilde vurularak süspanse hale gelmesi sağlandı.
6. Hücre süspansiyonu 1:3 oranında yeni bir flaska alındı ve taze hücre kültürü ortamı koyularak kültüre devam edildi.

3.3. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurulması

1. Kullanılmış hücre kültürü ortamı çekildi.
2. Hücre yüzeyi 37°C'deki Ca^{+2} , Mg^{+2} , içermeyen PBS (L1835 Biochrom GmbH, Almanya) ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA eklenerek 37 °C' de %5 CO₂'li ortamda 3-4 dakika hücrelerin kalkması beklendi.
4. İverted mikroskop ile tüm yüzeydeki hücrelerin kalktığı gözlemlendiğinde %15 FBS'li α -MEM içeren hücre kültürü ortamı ile kalkan hücreler toplanarak 800 rpm de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonunda süpernatant döküldü. Tüpün pellet kısmına hafif bir şekilde vurularak süspanse hale gelmesi sağlandı.
6. Hücreler (%90 FBS + %10 dimetilsülfoksit (DMSO, (A3672-0250, AppliChem) içeren ortam ile süspanse hale getirilip her tüpe 1 ml olacak şekilde kriyo tüpe aktarılarak -86 °C'de köpük kutuya kaldırıldı.

3.4. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözdürülmesi

1. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri P/1 hücreleri -80 ° C'den çıkarıldı.
2. 37°C de su banyosunda bekletildi.
3. %15 FBS α -MEM hücre kültürü ortamı ile hücreler 3 ayrı santrifüj tüpüne toplandı.
4. Toplanan hücreler 800 rpm'de 5 dakika +4 °C 'de santrifüjlendi.
5. Toplanan hücrelerin süpernatantı döküldü.
6. Süspanse hale gelen hücreler 3 ayrı T75 cm²'lik flaslara alındı.
7. Etiketleme işleminin ardından flask 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.5. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Farklılaşması

MKH'lerin *in vitro* farklılaşması büyük ölçüde kültür koşullarına bağlıdır. Deksametazon, insülin, izobütil metil ksantin ve indometasin ile kültürlenmiş MKH'ler adipojenik farklılaşırken, *in vitro* osteojenik farklılaşması, deksametazon, askorbik asit ve β -gliserol fosfatın varlığı ile indüklenir (Jaiswal ve Ark., 1997, Birmingham ve Ark., 2012).

Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasını değerlendirmek ve karakterize etmek için farklılaşma deney prosedürü tasarlanmıştır.

3.5.1. Osteojenik farklılaşma

MKH'ler osteojenik ortamda kültürlendiklerinde, *in vivo* yeni kemik oluşumu sırasında matris ve minerallerin yayılmalarından sorumlu hücreler olan kemik oluşturu osteoblastlar tarafından bilinen markerleri ifade ederler. MKH'lerin *in vitro* osteojenik farklılaşması üç aşamaya ayrılmıştır. İlk aşama, 1-4 gün hücre sayısında artış gözlemlenmesidir. Bunu, alkaline fosfatazın (ALP) transkripsiyonu ve protein ekspresyonu ile karakterize edilen 5 ila 14 günden erken hücre farklılaşması takip etmektedir. ALP'nin bu ilk artışından sonra seviyesi düşmeye başlar. Ayrıca erken bir aşamada, üzerinde mineralin biriktirildiği kollajen tip I matrisinin ifadesi bulunur. 14 ila 28 gün arasındaki son aşama, yüksek bir osteokalsin ve osteopontin ekspresyonu ile sonuçlanır, bunu takiben kalsiyum ve fosfat birikimi gözlemlenir (Birmingham ve Ark., 2012).

İşlem Basamakları:

1. Kültür kabının yüzeyi pasaj 2 seviyesindeki kemik iliği mezenkimal kök hücreler %80 konfluensiye geldiğinde besiy ortamı ortamdaki uzaklaştırıldı.
2. Hücre yüzeyi 37°C'deki Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS (L1835 Biochrom GmbH, Almanya) ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin-EDTA (%0.05 tripsin, %0.02 EDTA in DPBS, biological industries(Bİ)) eklenerek 37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda 3-4 dakika hücrelerin kalkması beklendi.
4. İnverted mikroskop ile tüm yüzeydeki hücrelerin kalktığı gözlemlendiğinde % 15 FBS'li α -MEM içeren hücre kültürü ortamı ile kalkan hücreler toplandı.

Homojen hale getirildikten sonra hücre sayımı için 200 µl hücre sayımı için endorf tüpe alındı. Kalan hücreler 800 rpm’de +4 °C de 5 dakika santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonunda süpernatant döküldü. Hücre peleti büyüme ortamı α -MEM (F0915, Biochrom, Almanya), %15 FBS (Capricorn), %1 L-Glutamin (200mM Gibco), %3 Penisilin/Streptomisin (Capricorn), %0,3 Gentamisin, %0,3 Amfoterisin (Capricorn) ile süspanse edildi.
6. 2 adet 6 gözlü pleyte $3,5 \times 10^4$ h/ml konsantrasyonda hücre ekimi yapıldı.
7. Hücre ekimini takiben 48 saat sonra hücre kültürü yüzeyinden büyüme ortamı çekildi. Osteojenik farklılaşma ortamı eklendi (Tablo 3).
8. 3 günde bir osteojenik farklılaşma ortamı değiştirildi, bu işlem 4 hafta devam ettirildi.
9. Deney süresi sonunda osteojenik farklılaşmanın tespiti için Von Kossa ve Alizarin red S boyama protokolleri uygulandı.

Tablo 3.3: Osteojenik Farklılaşma Ortamı

Ortam Bileşeni	Konsantrasyon	Firma Bilgisi
DMEM – Low glucose	-	01-050-1A, Biological Industries
FBS	%10	Capricorn
Deksametazon	10^{-8} M	18660, SERVA
β-Gliserofosfat	10^{-2} mM	23330, SERVA
L-askorbik asit 2-fosfat	283,89µM	14030, SERVA
L-Glutamin	%1	200mM (100x), Gibco
Penisilin-Streptomisin	%3	(100x), Capricorn
Amfoterisin	%0,3	(100x), Capricorn
Gentamisin	%0.3	Biological Industries

Alizarin Red S Boyama;

1. Kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk (+4°C) PBS ile iki kez yıkama yapıldı (6 gözlü pleyt için her göze 1 ml).
3. Soğuk (+4°C) %4 paraformaldehit (SC-281692, Chem Cruz) ile 300 rpm’de çalkalanarak 30 dakika fiksasyon yapıldı.

4. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk ($+4^{\circ}\text{C}$) PBS ile iki kez yıkama yapıldı.
5. Alizarin Red S (A5533, SİGMA-ALDRICH) solusyonu ile 2-3 dakika inkübe edildi. (Alizarin Red S solusyonu distile su içerisinde %2 (w/v) oranında hazırlandı ve pH'ı 4.1- 4.3 aralığına ayarlandı.)
6. İnkübasyon sonrasında distile su ile üç defa yıkama yapıldı.
7. Örnekler ters faz ışık mikroskopunda incelendi.

Von Kossa Boyama;

1. Kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk ($+4^{\circ}\text{C}$) PBS ile iki kez yıkama yapıldı (6 gözlü pleyt için her göze 1 ml).
3. Soğuk ($+4^{\circ}\text{C}$) PFA çözeltisi (%4) ile 30 dakika, 300 rpm' de çalkalanarak fiksasyon yapıldı.
4. Hücreler %5 gümüş nitrat çözeltisi ile karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
5. Distile su ile üç kez yıkama yapıldı.
6. Kuyucukların kurumasını engellemek için az miktarda PBS eklenerek 1 saat boyunca UV altında, kapağı açık bir şekilde bekletildi.
7. Distile su ile üç kez yıkama yapıldı.
8. Distile su içerisinde %5 (w/v) sodyum tiyosülfat (Kimetsan) çözeltisi hazırlandı.
9. Kuyucuklara %5 sodyum tiyosülfat çözeltisi eklenerek 2-5 dakika inkübe edildi. Sodyum tiyosülfat ile inkübasyonun amacı arka planın giderilmesi, kalsiyum depozitlerinin daha belirgin hale getirilmesidir.
10. Distile su ile üç kez yıkama yapıldı.
11. Örnekler ters faz ışık mikroskopunda incelendi.

3.5.2. Adipojenik farklılaşma

Adipojenik farklılaşma için, MKH'ler genellikle izobütilmetilksantin (IBMX), indometasin, deksametazon (Dex) ve insülin ile desteklenmiş ortamda kültürlenir. IBMX ve Dex, adipogenik farklılaşmanın başlatılması için önemlidir. IBMX'in, hücre içi cAMP yükselmesine neden olan fosfodiesterazları inhibe edebileceği bildirilmektedir. Daha sonra yükseltilmiş cAMP, protein kinaz A yoluyla transkripsiyon faktörlerinde değişikliklere neden olur. Aynı zamanda, IBMX de doğrudan C / EBPβ ekspresyonunu indükleyebilir. Benzer şekilde, Dex, hücre içi glukokortikoid

reseptörüne bağlanma yoluyla C / EBP_y ekspresyonunu aktive etmektedir. İndometasin, bilinen bir COX1 / 2 inhibitörüdür, ancak adipogenik aktivitesi, COX'in inhibisyonundan değil, PPAR PP'nin aktivasyonundan kaynaklanır. İnsülin, adipositlerde trigliseritlerin sentezi için glukoz alımını teşvik etmektedir (Chen ve Ark., 2016).

İşlem Basamakları:

1. Kültür kabının yüzeyi pasaj 2 seviyesindeki kemik iliği mezenkimal kök hücreler %80 konfluensiye geldiğinde besi ortamı ortamdaki uzaklaştırıldı.
2. Hücre yüzeyi 37°C'deki Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS (L1835 Biochrom GmbH, Almanya) ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin-EDTA (% 0.05 tripsin, % 0.02 EDTA in DPBS, biological industries(Bİ)) eklenerek 37 °C' de % 5 CO₂'li ortamda 3-4 dakika hücrelerin kalkması beklendi.
4. İnverted mikroskop ile tüm yüzeydeki hücrelerin kalktığı gözlemlendiğinde %15 FBS'li α-MEM içeren hücre kültürü ortamı ile kalkan hücreler toplandı. Homojen hale getirildikten sonra hücre sayımı için 200 µl hücre sayımı için enderford tüpe alındı. Kalan hücreler 800 rpm' de +4 ° C' de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonunda süpernatant döküldü. Hücre peleti büyüme ortamı α-MEM (F0915, Biochrom, Almanya), %15 FBS (Capricorn), %1 L-Glutamin (200mM (100x), Gibco), %3 Penisilin/Streptomisin (100x), Capricorn), % 0,3 Gentamisin, % 0,3 Amfoterisin ((100x), Capricorn) ile süspanse edildi.
6. 2 adet 6 gözlü pleyte 3,5 x 10⁴ h/ml konsantrasyonda hücre ekimi yapıldı.
7. Hücre ekimini takiben 48 saat sonra hücre kültürü yüzeyinden büyüme ortamı çekildi. Adipojenik farklılaşma ortamı eklendi (Tablo 3.4).
8. 3 günde bir osteojenik farklılaşma ortamı değiştirildi, bu işlem 4 hafta devam ettirildi.
9. Deney süresi sonunda osteojenik farklılaşmanın tespiti için Oil Red boyama protokolleri uygulandı.

Tablo 3.4: Adipojenik Farklılaşma Ortamı

Ortam Bileşeni	Konsantrasyon	Firma Bilgisi
DMEM – Low glucose	-	01-050-1A, Biological Industies
FBS	%10	Capricorn
İzobütilmetilksantin (IBMX)	0,5 mM	26445, SERVA
İndometasin	200 µM	I7378, SİGMA
Deksametazon	10 ⁻⁶ M	I7378, SİGMA
İnsülin	10 µg/ml	26360, SERVA
L-Glutamin	%1	200mM (100x), Gibco
Penisilin-Streptomisin	%3	(100x), Capricorn
Amfoterisin	%0,3	(100x), Capricorn
Gentamisin	%0.3	Biological Industies

Oil Red O Boyama;

Oil Red O, trigliseridleri boyamak için kullanılan, yağda çözünen bir boya olan lizokromdur. Stok solüsyonu, 0,7 g Oil Red O (O0625, Sigma) 200 ml isopropanol (1.09634.2511, Merck, Almanya) içinde, 1 gece karıştırıcıda bekletilerek hazırlandı. Tamamen çözüldükten sonra 0,2 µm filtreden geçirilerek +4°C'ye kaldırıldı.

1. Kullanılmış ortam tamamen çekildi.
2. Hücre yüzeyi PBS ile yıkandı.
3. %10 formalin eklenerek (1,5 ml/10 cm², önemli olan yüzeyin PBS içinde kaplanması) 5-10 dakika arası oda sıcaklığında bekletildi.
4. %10'luk formalin çekildi ve taze formalin (SC-281692, Chem Cruz) eklendi. En az 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Süre sonunda formalin ortamdan pipet ile çekildi.
6. Hücreler %60 isopropanol (1.09634.2511, Merck, Almanya) ile (distile su içinde) yıkandı. Tamamen kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletildi.
7. Oil red O çalışma solüsyonu eklendi (6 ml Oil red O stok solüsyonu + 4 ml distile su, oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi ve kullanmadan önce 0.2 µm filtreden geçirildi) 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 10 dakika sonunda Oil red O çalışma solüsyonu pipet ile çekildi ve distile su ile hücreler 4 kez yıkandı. Fotoğraflama yapıldı.

3.6. Eksozom-Free Serum Hazırlanışı

Kullanılmış olan serumun hayvansal kaynaklı olması ile birlikte ortama salınmış olan eksozom bulunmaktadır. Kemik iliği hücrelerinden elde edilmek istenilen eksozomların serumdan gelen eksozomlardan ayırt edilmesi zor olması nedeniyle sonucu etkilemektedir. Bu nedenle eksozom-free serum içerisindeki eksozom miktarı ultrasantrifüj yöntemi ile minimum seviyeye indirilerek hazırlanması amaçlanmıştır.

- 50 mL’lik 2 tüpe 10 ml serum eklendi. Üzerine 20 ml α -MEM ilave edildi (Toplam Hacim 30 ml). Bu basamakta kullanılan serumun yoğun olması nedeniyle α -MEM besi ortamı ile seyreltilerek işleme devam edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Serumun α -MEM besi ortamı ile seyreltilmesi

- Her iki tüp 2000 g’de 10 dakika + 4 °C’de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda süpernatant ultrasantrifüj tüpüne alındı. Ultrasantrifüj tüpüne alınan süpernatant dengeleri ayarlandıktan sonra cihaz (Super Speed Vacuum Centrifuge, VS-30000i) 10.000 g’de 40 dakika + 4 °C’de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda süpernatant temiz bir ultrasantrifüj tüpüne alındı. Dengeler ayarlandıktan sonra 100.000 g’de 4 saat + 4 °C’de santrifüj edildi.



Şekil 3.2: Ultrasantrifüj sonunda Serum içeriğinden uzaklaştırılan eksozomlar

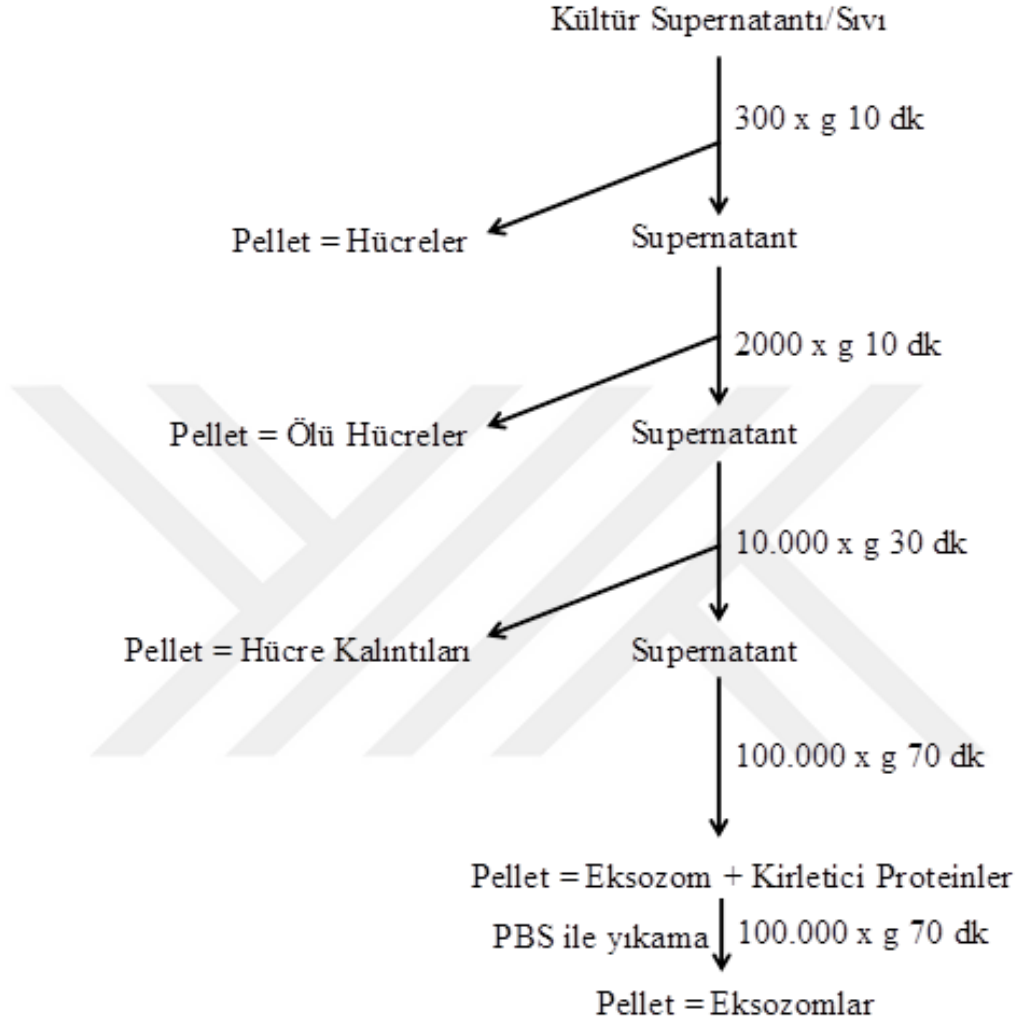
- Santrifüj sonunda ultrasantrifüj tüpleri laminar akışlı kabinde 0.2 μm 'lik filtreden geçirilerek %15 serum içeren besi ortamı hazırlandı.
- Hazırlanan besi ortamı + 4 °C dolaba kaldırıldı.

Tablo 3.1: Eksozom-Free Serumlu α -MEM Besi Ortamı Hazırlanması

	Miktar
Eksozom-Free serum içeren besi ortamı	45 ml
L-Glutamin	1 ml
Penisilin-Streptomisin	3 ml
Gentamisin	300 μl
Amfoterisin	300 μl
Serum içermeyen α-MEM besi ortamı	50,4 ml

3.7. Eksozom İzolasyonu

3.7.1. Ultrasantrifüj yöntemi



Şekil 3.3: Ultrasantrifüj Yöntemi ile Eksozom izolasyonu (Théry ve ark, 2006)

1. %80 konfluensiye gelen hücrelerin besiy ortamı çekildi.
2. Hücre yüzeyi 37°C'deki Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.
3. Eksozom-Free serum içeren besiy ortamı eklendi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı.
4. Flask içerisindeki şartlandırılmış ortam (Eksozomlarından arındırılmış serum ile hazırlanan ortam, CM) çekilerek tüpe toplandı.
5. CM ortamı 300 g' de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.

6. Süpernatant farklı bir tüpe alınarak 2,000 g'de, + 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant ultra-santrifüj rotoruna uygun ultrasantrifüj tüplerine aktarıldı.
8. Ultrasantrifüj tüpünün karşı tarafına aynı hacimde denge oluşturularak 30 dakika $10,000 \times g$, 4°C'de santrifüjleme işlemi yapıldı.
9. Süpernatant, 4. basamaktakiyle aynı büyüklükteki yeni bir tüpe veya şişeye aktarıldı.
10. 70 dakika $100.000 \times g$, 4°C'de santrifüjleme (VS-30000i) işlemi yapıldı.
11. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
12. Bir mikropipet kullanarak, 1 ml PBS içinde tüpteki pellet yeniden süspanse edildi.
13. $100.000 \times g$, 4 ° C'de 1 saat santrifüjleme işlemi yapıldı.
14. Süpernatant olabildiğince toplandı ve 70 dakika $100.000 \times g$, 4°C'de santrifüjleme işlemi yapıldı.
15. Santrifüj sonunda süpernatant 900 µl çekildi. Kalan 100 µl eppendorf tüpüne alındı.
16. Örnek SEM için hazırlandı.

3.7.2. PEG 6000 ve PEG 20000 yardımıyla eksozom izolasyon yöntemi

Yüksek oranda hidrofilik polimerler, eksozomları çevreleyen su molekülleri ile etkileşime girerek hidrofobik bir mikro ortam oluşturur ve sonuçta eksozom çökmesine neden olurlar. Çeşitli hidrofilik polimerler arasında, suda çözünürlüğü, yeniden şekillendirme kabiliyeti ve toksik olmayan bir polimer olması ile birlikte polietilen glikol (PEG) yaygın olarak kullanılmaktadır (Yang ve ark, 2020).

Vlassov ve arkadaşları çöktürme yöntemi ile eksozom izolasyonunda yaptıkları araştırmalar sonucunda en etkili %8 – 12'lik PEG miktarının düşük yoğunlukta az verimlilik gözlemlenirken yoğunluk arttıkça eksozom verimliliğinde artış olduğunu kanıtlanmışlardır (Vlassov ve ark, 2017). Bu çalışmada PEG 6000 ve PEG 20000 yöntemlerini kıyaslayarak izole edilen eksozomların miktarı arasında bir inceleme yapılmıştır. Bu incelemenin sonucunda %10'luk PEG 6000 kullanımında eksozom verimliliğinin düşük olması beklenirken % 10'luk PEG 20000 kullanımında eksozom verimliliğinin yüksek olması beklenmektedir.

Tablo 3.2: PEG 6000 ve PEG 20000 Eksozom İzolasyon Yöntemi

PEG 6000	PEG 20000
Hücreler %80 konfluensi'ye kadar %15 FBS'li ortamda inkübe edildi. Daha sonra yüzey PBS ile yıkandı. FBS eksozom-free %15 ortam ile değiştirildi. 48 saat hücreler büyümeye bırakıldı.	Hücreler %80 konfluensi'ye kadar %15 FBS'li ortamda inkübe edildi. Daha sonra yüzey PBS ile yıkandı. FBS eksozom-free %15 ortam ile değiştirildi. 48 saat hücreler büyümeye bırakıldı.
Süpernatant 2000 g de 15 dakika +4 C de santrifüjlendi. Süpernatant alındı.	Süpernatant 2000 g de 15 dakika +4 C de santrifüjlendi. Süpernatant alındı.
Süpernatant gece boyu + 4 °C ve 2 saat oda sıcaklığına bırakıldı.	Süpernatant gece boyu + 4 °C ve 2 saat oda sıcaklığına bırakıldı.
Süpernatant yeni santrifüj tüpüne alındı ve 6800 g de 45 dakika +4 C'de santrifüj edildi.	Süpernatant yeni santrifüj tüpüne alındı ve 6800 g de 45 dakika +4 C'de santrifüj edildi.
Süpernatant 0.22µM filtreden geçirildi.	Süpernatant 0.22µM filtreden geçirildi.
%1 NaCl %10 PEG 6000 (TK.201806.01002, TEKKİM) (39ml Süpernatant + 10 ml PEG 6000 + 1 ml NaCl) + 4 C de gece boyu (8-16) inkübasyona bırakıldı.	%1 NaCl %10 PEG 20000 (8188971000, Sigma) (39ml Süpernatant + 10 ml PEG 20000 + 1 ml NaCl) + 4 C de gece boyu (8-16) inkübasyona bırakıldı.
Süpernatant 1500 g de 30 dakika +4 C de santrifüj edildi. Pellet tamamen kuru hale getirildi.	Süpernatant 1500 g de 30 dakika +4 C de santrifüj edildi. Pellet tamamen kuru hale getirildi.
Pellet 10 ml %0,9 NaCl ile süspanse hale getirildi.	Pellet 10 ml %0,9 NaCl ile süspanse hale getirildi.
100.000 g'de + 4 C 2:10 saat ultrasantrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde alındı. (Pelet mümkün olduğunca kuru kalmalıdır.)	100.000 g'de + 4 C 2:10 saat ultrasantrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde alındı. (Pelet mümkün olduğunca kuru kalmalıdır.)
Pellet 10mm HEPES / NaCl süspanse hale getirildi. (1U / mL)	Pellet 10mm HEPES / NaCl süspanse hale getirildi. (1U / mL)

3.8. Eksozom Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskopunda incelemeye hazırlanması(SEM)

Ultrasantrifüj, PEG 6000, PEG 20000, Eksozom-Free %10 Serum içeren besi ortamı için örneklerle SEM takibi yapıldı.

- Tampon A: %5 Gluteraldehit (23115.01, SERVA) (Ph: 7,2) (0,1 M sodyum kakodilat (15540, SERVA) içinde)
- Tampon B: %7 Sükroz (0963C474, AMRESCO) (7g / 100ml) (0,1 M sodyum kakodilat (15540, SERVA) içinde)
- Tampon C: %2 Ozmiyum tetroksit (31253.03, SERVA) (0,1 M sodyum kakodilat (15540, SERVA) içinde)

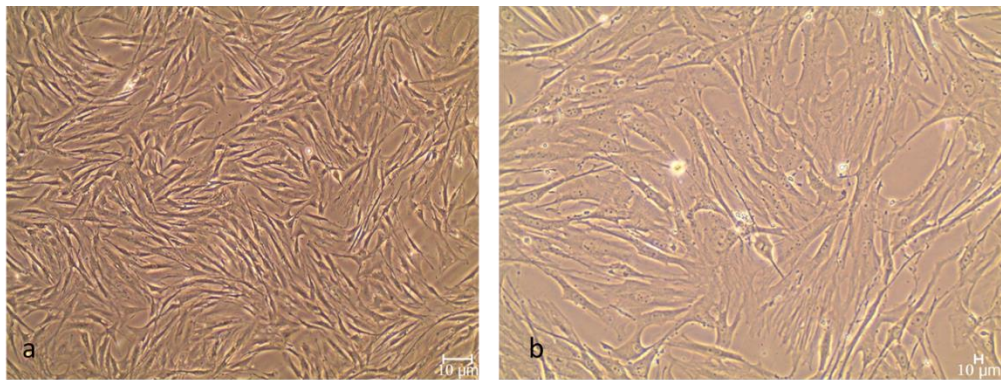
Örnekler için nemli bir oda oluşturuldu. Örneklerin sabit kalması için yüzey olarak parafilm kullanıldı. Parafilm üzerine 50 µl örnekler mikro pipet ile eklendi. Üzerine SEM takibi için Formvar Grid (Agar scientific) yüzeyin parlak tarafı (Film parlak yüzey tarafında) örnek üzerine gelecek şekilde konuldu. 1 saat hücrelerin tutunması için beklendi.

Uygulamalar, 1'den 3'e kadar + 4°C (buz üstünde), 4'den 7'ye kadar oda sıcaklığında yapıldı.

1. Tampon A'ya alınarak 30 dakika bekletildi.
2. Başka bir solüsyonda yıkama yapmadan Tampon B'ye alınarak 30 dakika bekletildi.
3. Başka bir solüsyonla yıkama yapmadan Tampon C'ye alınarak 30 dakika bekletildi.
4. Örnekler 5 dakika distile su ile iki kere yıkama işlemi yapıldı.
5. Örnekler artan derecelerdeki alkol serileri (%35, %50, %70, %85, %95, %100, %100) içerisinde her bir basamak 5 dakika olacak şekilde dehidrate edildi.
6. Örnekler hekzametildisilazan (HMDS) (8.04324.0050, MERCK), solüsyonda 5 dakika bekletildi (Bu işlem çeker ocakta yapıldı).
7. Oda sıcaklığında 30 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler SEM takibi için hazır hale getirildi.

4. BULGULAR

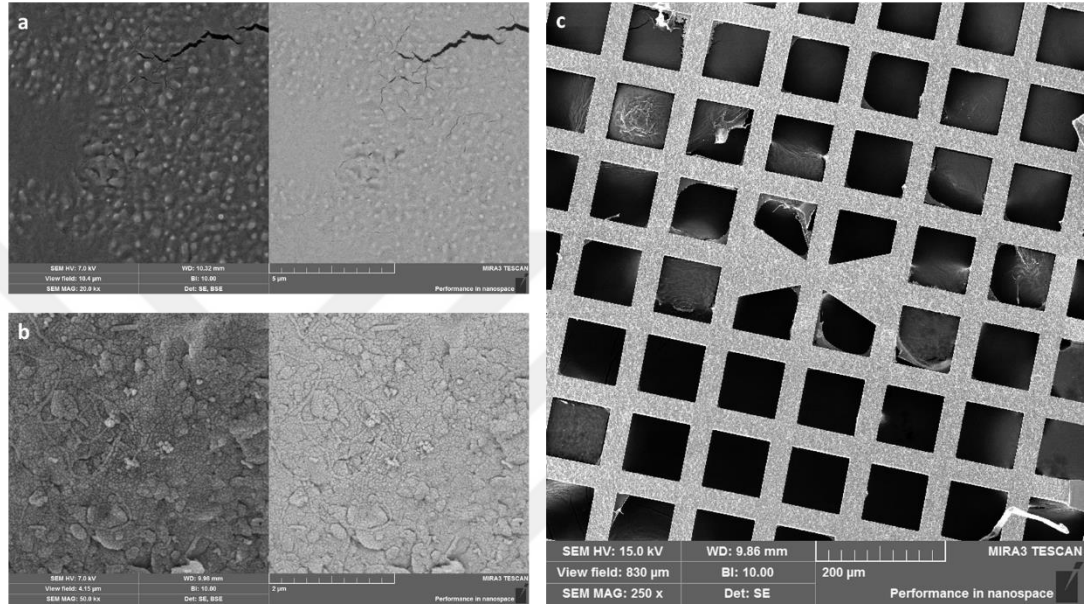
4.1.Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Görüntüleri



Şekil 4.1: 7 günlük Kİ-MKH'lerinin (P/2) ters faz ışık mikroskop görüntüleri **a.** Kİ-MKH 4X **b.** Kİ-MKH 10X

4.2. Elde Edilen Eksozomların SEM Takibi Yapıldığı Yüzeyler

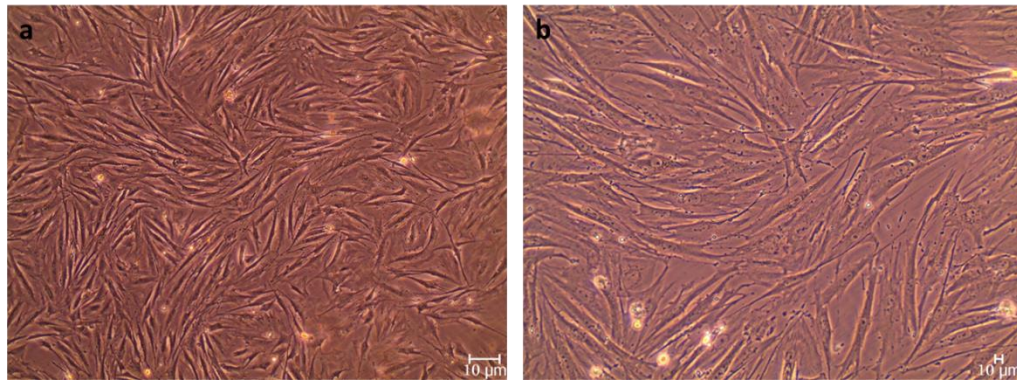
Tez kapsamında ilk olarak ultrasantrifüj yöntemi ile eksozom izolasyonu çalışmalarına başlanmıştır. Elde edilen eksozomlar agaroz, poliakrilamid jel ve formvar grid yüzeyleri üzerinde görüntülenmiştir. Alınan görüntülere göre formvar grid yüzey üzerinde eksozomların görüntüsü daha iyi gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2: Elde edilen eksozomların SEM takibi yapıldığı yüzeyler **a.** Agaroz **b.** Poliakrilamid Jel **c.** Formvar Grid

4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

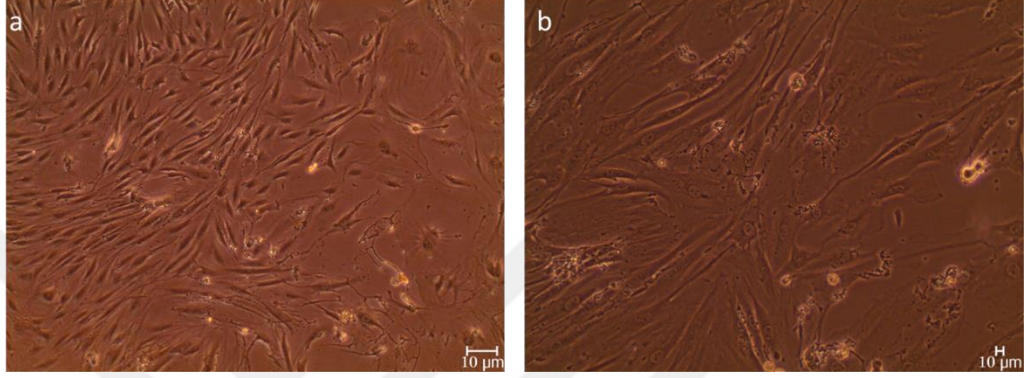
Kİ-MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma ortamları eklenmeden önce hücrelerin canlılığında ve morfolojik özelliklerinde bir sorun olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3: Farklılaşma ortamları eklenmeden önce Kİ-MKH ters faz ışık mikroskobu görüntüleri **a.** 4X **b.** 10X

Osteojenik farklılaşma

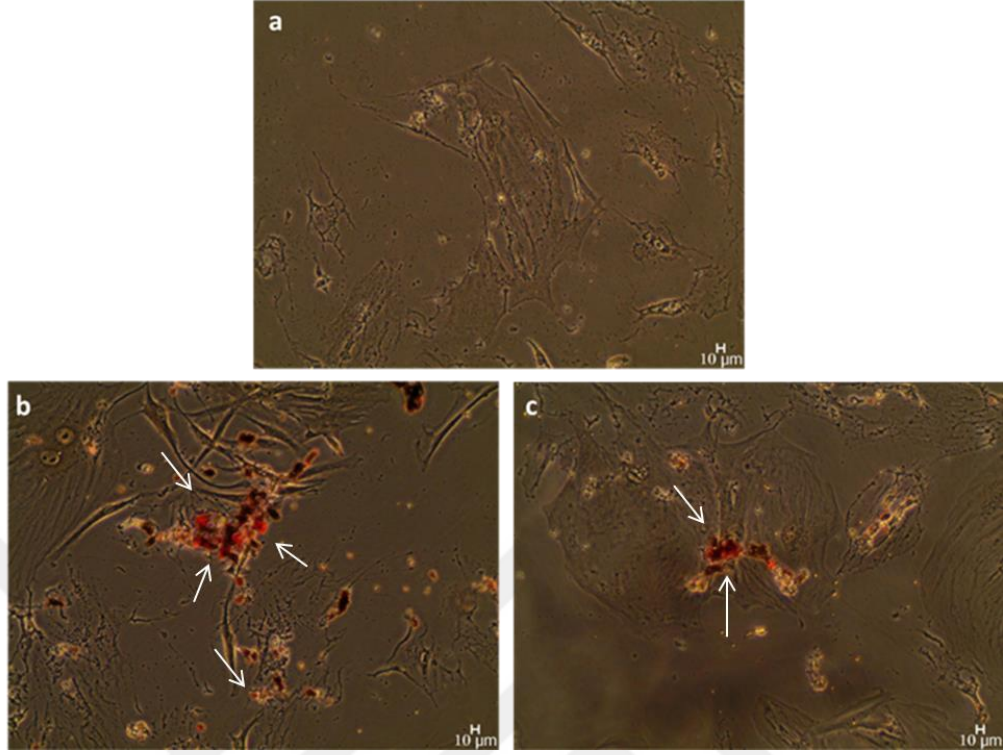
1 ay boyunca farklılaşma ortamında bırakılan Kİ-MKH'ler düzenli bir şekilde besi ortamları değiştirilmeden önce mikroskop altında inceleme yapılmıştır. Bu incelemelere göre hücrelerin morfolojisinde değişme ve hücrelerin minerilizasyona bağlı depozitlerin yoğunlaştığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4: Osteojenik farklılaşma boyama öncesi Kİ-MKH ters ışık mikroskobu görüntüleri **a.** 4X **b.** 10X

Alizarin Red S

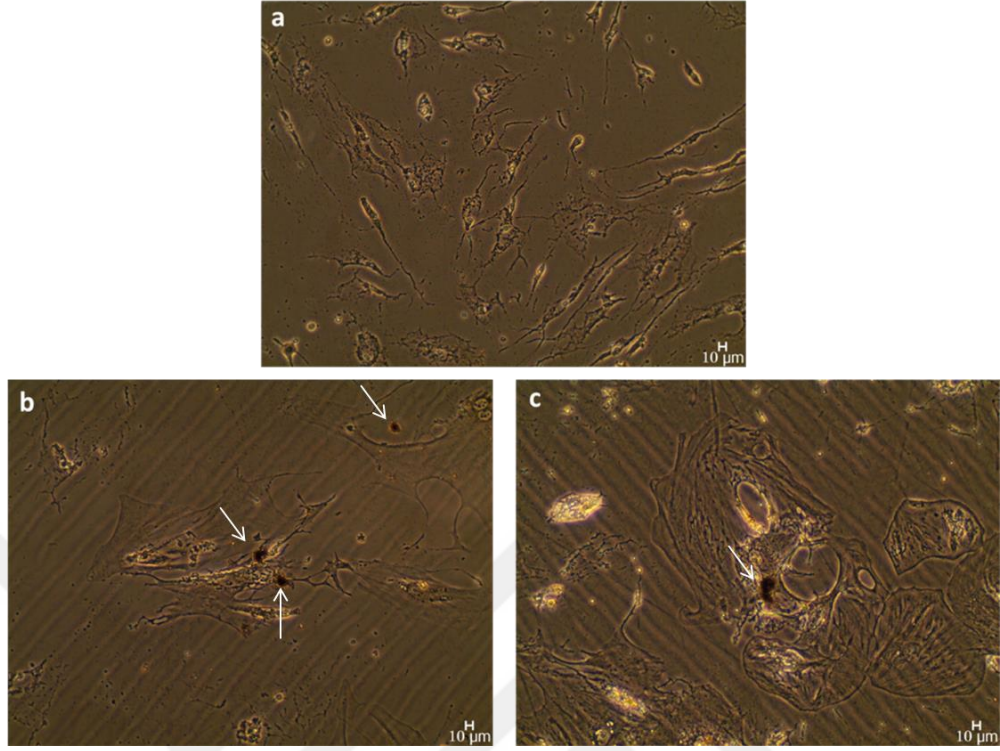
1 ay sonunda Kİ-MKH'lerin minerilizasyon tespiti için Alizarin Red S ile boyama yapıldı. Alizarin red S boyamasında negatif kontrol grubunda herhangi bir boyamaya rastlanmazken osteojenik ortam ile muamele edilmiş deney gruplarında Alizarin Red S ile kırmızıya boyandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5: Kİ-MKH osteojenik farklılaşma Alizarin Red S boyama mikroskobu görüntüleri **a.** Kontrol 10X **b.** Farklılaşma grubu 10X **c.** Farklılaşma grubu 10X

Von Kossa

K-İ-MKH'ler kalsiyum – fosfat depozitlerinin boyanması için Von Kossa ile boyama işlemi yapılır. Boyama sonucunda deney grupları siyaha boyanırken kontrol grubunda bir boyama gözlenmemiştir.

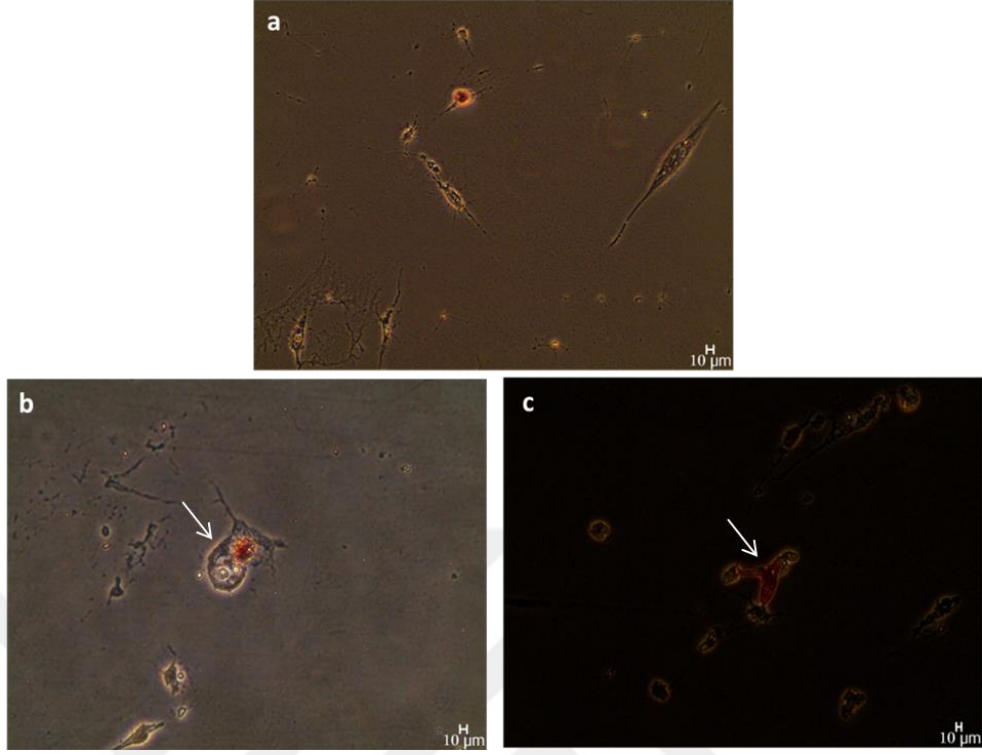


Şekil 4.6: Kİ-MKH osteojenik farklılaşma Von Kossa boyama mikroskobu görüntüleri
a. Kontrol 10X b. Farklılaşma grubu 10X c. Farklılaşma grubu 10X

Adipojenik Farklılaşma

Oil Red O

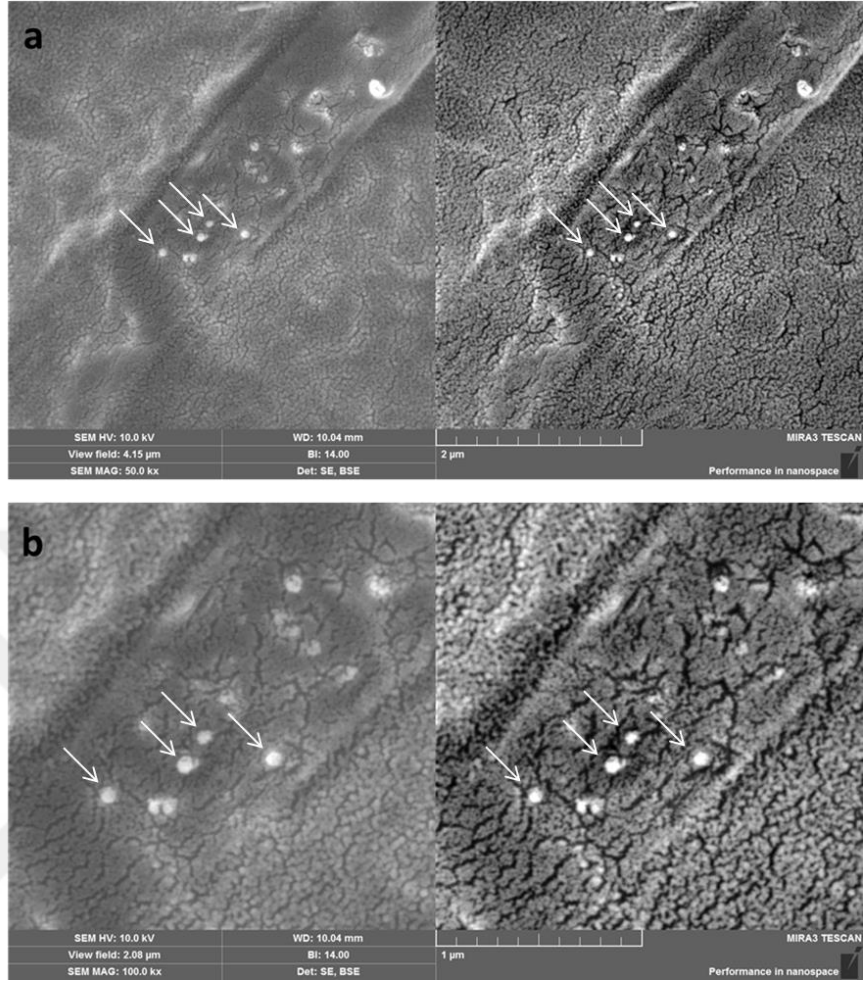
MKH'leri hücrelerin kültürde uzun süre beklemesi sonucu yağ hücrelerine farklılaşıp farklılaşmadığının incelenmesi için Oil Red O boyama kullanılır. Oil Red O, trigliseridleri boyamak için kullanılan, yağda çözünen bir boyadır. Bu nedenle kültürde uzun süre beklemesi sonucu yağ hücrelerine farklılaşıp farklılaşmadığını incelemek için Oil red O kullanılmıştır.



Şekil 4.7: KI-MKH Adipojenik farklılaşma Oil Red O boyama mikroskobu görüntüleri
a. Kontrol 10X b. Farklılaşma grubu 10X c. Farklılaşma grubu 20X

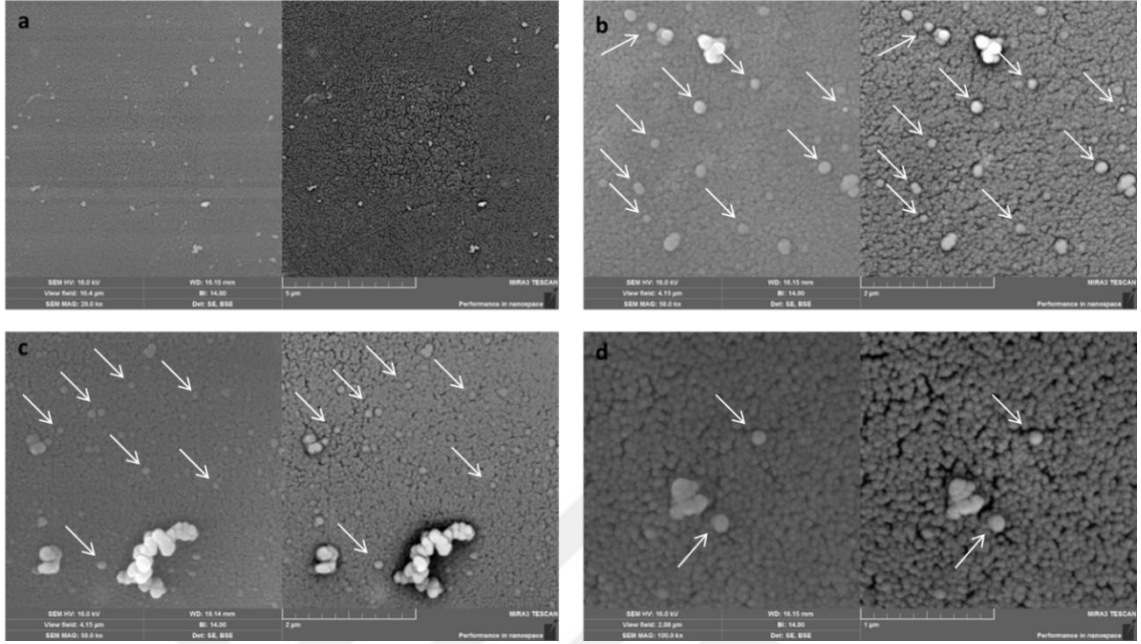
4.4.Eksozom-Free Serum İçerisinde Uzaklaştırılamayan Eksozomlar

Hayvansal kaynaklı serum içerisindeki eksozomların ultrasantrifüj yöntemi ile uzaklaştırılarak ortamda kalan eksozom miktarının incelenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) takibi yapılmıştır.



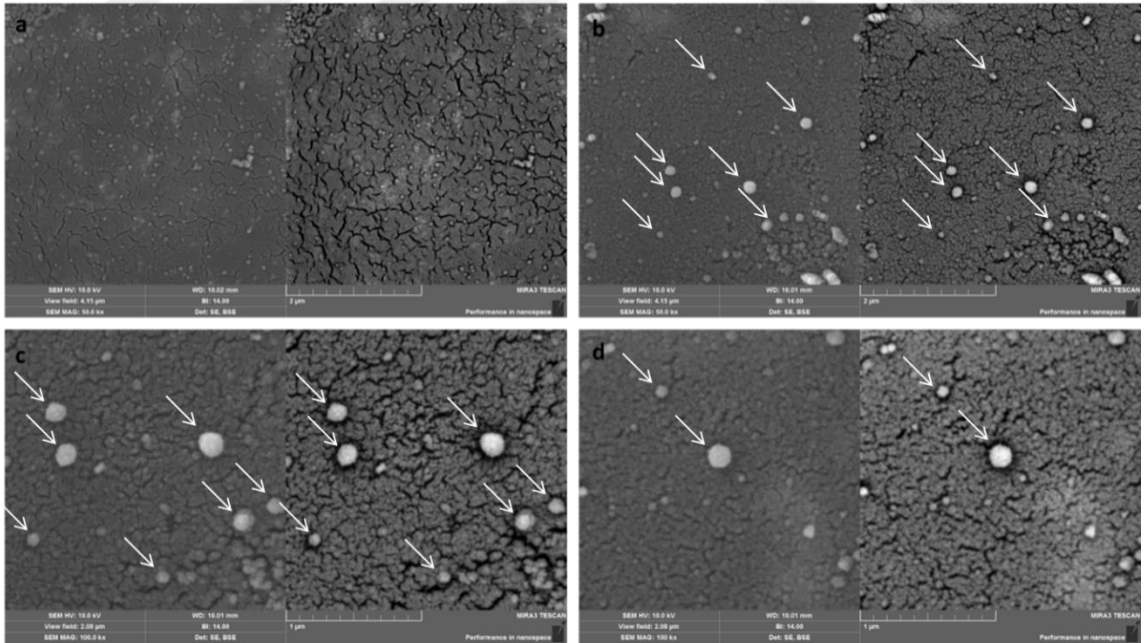
Şekil 4.8: Serum içerisindeki eksozomların uzaklaştırılması sonucu ortamda kalan eksozomların SEM görüntüleri **a.** 50.0 kX **b.** 100.0 kX

4.5.Ultrasantrifüj Yöntemi İle İzole Edilen Eksozomlar



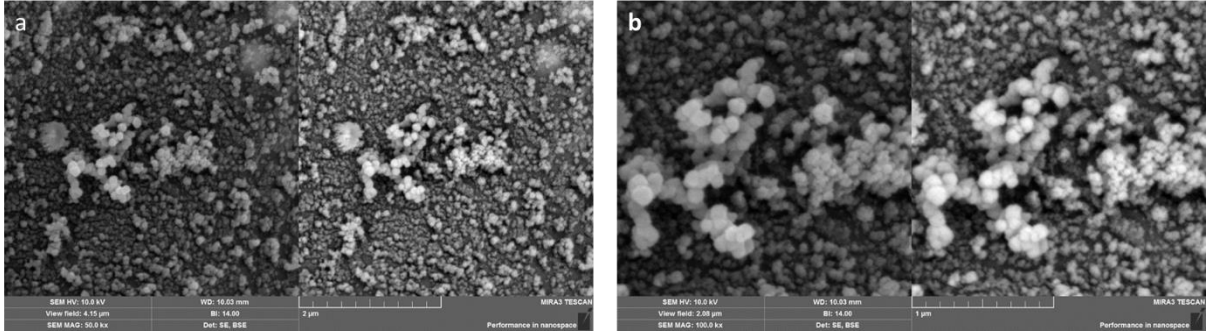
Şekil 4.9: Ultrasantrifüj yöntemi ile elde edilmiş eksozomların SEM görüntüleri **a.** 20.0 kx **b.** 50.0 kx **c.** 50.0 kx **d.** 100.0 kx

4.6.PEG 6000 Yöntemi İle İzole Edilen Eksozomlar



Şekil 4.10: PEG 6000 yöntemi ile elde edilmiş eksozomların SEM görüntüleri **a.** 50.0 kx **b.** 50.0 kx **c.** 100.0 kx **d.** 100.0 kx

4.7.PEG 20000 Yöntemi İle İzole Edilen Eksozomlar



Şekil 4.11: PEG 20000 yöntemi ile elde edilmiş eksozomların SEM görüntüleri

a. 50.0 kx b. 100.0 kx

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaşamın temel birimi olan hücreler, biyolojik araştırmalarda önemli bir yere sahiptir. Tıbbi tedavilerde kullanılmak üzere toksik veya terapötik bileşiklerin fizyolojik süreçlerini anlamak ve taramak için zorunlu bir model sistem olarak hizmet ederler. Ayrıca, hücreler fonksiyonel enzim, büyüme faktörleri ve aşı üretiminde önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu uygulamaları başarmak için, hücrelerin öncelikle ait olduğu organizmanın dışındaki bir ortamda kültürlenmesi gerekir. Bu süreç hücre kültürü olarak adlandırılır. Hücre kültürü, hücrelerin canlı bir organizmanın dışında *in vitro* koşullar altında (örneğin sıcaklık, pH, besin değerleri) yetiştirildiği bir teknik olarak kabul edilmektedir (Lin ve ark, 2019).

Hücre kültürü çalışmalarında kök hücre biyolojisi yaygın olarak kullanılmaktadır (Sanden ve ark, 2010). Kök hücreler, hücre tedavisi, doku mühendisliği, rejeneratif tıp ile farmasötik ve biyoteknolojik uygulamalar için büyük umutlar vaat etmektedirler. Kendi kendini yenileme kapasitesine ve izolasyon kaynaklarına bağlı olarak özel hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Mckee ve ark, 2017).

MKH'ler kendini yenileme ve osteoblastlar, kondrositler, adipositler ve nöronlar gibi çeşitli özel hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip çok potansiyelli kök hücrelerdir. MKH'ler kolayca erişilebilir ve ani immün yanıtlara neden olmazlar. Bu nedenle, MKH'ler doku mühendisliği ve hücre tedavisi araçları için çekici bir hücre kaynağıdır(Huang ve ark, 2015). MKH'ler, yağ dokusu, tendon, periferik kan ve kordon kanı gibi çeşitli kaynaklardan izole edilebilir. Kİ, MKH'lerin en yaygın kaynağıdır (Huang ve ark, 2015).

Tez kapsamında, Kİ-MKH'inden ultrasantrifüj ile çöktürme yöntemi, PEG 6000 ve PEG 20000 yöntemleri kullanılarak eksozomların izolasyonu yapılmıştır. Kullanılan yöntemlere göre elde edilen eksozomlar SEM'de görüntülenmiştir.

Kullanılan serum içeriği hayvansal kaynaklı olması dolayısıyla içeriğinde eksozomlar yer almaktadır. Ticari eksozom-free serumların (Thermo Fisher Scientific, A2720801) içerisindeki eksozomlar %90 oranında uzaklaştırılarak satışı yapılmaktadır. Ancak ticari olarak satılan eksozom-free serumların yüksek maliyeti sebebiyle çalışmalara ilk olarak hayvansal kaynaklı serumlardan eksozomların uzaklaştırılması ile başlanmıştır. Serumdan uzaklaştırılan eksozomların SEM'de görüntüleri alınmıştır. Formvar yüzey üzerinde alınan görüntülerde eksozomların ticari olarak satılan serumlar gibi büyük ölçüde eksozomların uzaklaştırıldığı görülmüştür (Şekil 4.3). Serum içeriğinde kalan eksozomların küçük boyutlarda olmasıyla beraber sıvılarda asılı kalmasından dolayı bir kısmı uzaklaştırılamamıştır. Şartlandırılmış ortam olarak eksozom-free serum içeriği bulunun besi ortamı ile kültüre devam edilmiştir. Kİ-MKH'leri tarafından salgılanan eksozomlar, bu besi ortamına salınmıştır. Salınım yapılan besi ortamından izolasyon aşamasına geçilmiştir.

Vlassov ve arkadaşlarına göre PEG miktarı arttıkça verimlilikte artış olması beklenmektedir. Fakat Ludvig ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre de PEG miktarı azaldıkça eksozom miktarında artış beklenmektedir. Ludvig ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda %10-12 oranında PEG 6000 ve % 8-10 oranında PEG 20000 yöntemi ile eksozomları elde etmişlerdir (Ludvig ve ark, 2018). Tez kapsamında yaptığımız literatür araştırmalarına göre çalışmalarda eksozom izolasyonuna ilişkin en

iyi sonuçlar, ultrasantrifüj ve PEG 6000 yöntemleriyle elde edilmiştir. SEM sonuçlarına göre PEG 20000’de elde edilen eksozomların morfolojilerinde bozuklukluklar gözlemlenmiştir. PEG 20000’nin vizkozitesinin yüksek olması nedeniyle Formvar Grid üzerinde polimerleşmeler meydana gelmektedir. Bu polimerleşmeler eksozom varlığını etkileyerek ortamdaki eksozomlardan sağlıklı bir görüntü elde edilememesine neden olmuştur. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar Ludvig ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Elde edilen eksozomların SEM takibi için agaroz, poliakrilamid ve formvar grid yüzeyleri kullanılmıştır. Yapılan literatür araştırmalarına göre eksozomların takibi Formvar yüzeyler üzerinde alınmıştır. Öncelikle izole edilen eksozomların görüntüleri agaroz ve poliakrilamid yüzey üzerinde alınmıştır. Alınan görüntülerde yüzeyde polimerleşmeler olması sebebi ile eksozomların morfolojilerinde bozukluklar gözlemlenmiştir. Ardından formvar yüzeyler üzerinde görüntü alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre eksozomların morfolojilerinin en iyi görüntülandığı yüzeyin formvar grid olduğu tespit edilmiştir. Formvar yüzeyler, yüksek termal stabilitesi ve elektron saçılmasını minimuma indirmeyi olanak sağlaması dolayısıyla eksozomlar için görüntü almada diğer yüzeylere oranla avantaj sağlamaktadır (Anonim, 2020).

Kemik iliğinde ilk olarak keşfedilen hematopoetik olmayan bir kök hücre popülasyonu olan mezenkimal kök hücreler, yağ ve kemik gibi çeşitli mezenkimal dokuların olgun hücrelerine farklılaşabilen multipotent hücrelerdir. Adipositlerin ve osteoblastların ortak progenitör hücreleri olarak MKH’ler, farklılaşma oranları için hassas bir şekilde dengelenmiştir. Çok sayıda *in vitro* araştırmalar, yağ indüksiyon faktörlerinin osteogenezi inhibe ettiğini ve tersine kemik indüksiyon faktörlerinin adipogenezi engellediğini göstermiştir(Chen ve ark., 2016).

Kİ-MKH’lerin osteojenik ve adipojenik farklılaşması çalışmaları için literatür taramaları yapılmıştır. Yapılan araştırmalara göre (Erden ve ark.,2016), (Çapkın, 2010), Davies ve ark., 2019), (Aliborzi ve ark., 2016) yayınları göz önüne alınarak çalışmalara başlanmıştır.

Osteojenik farklılaşma için referans alınan yayınlar doğrultusunda belirlenen askorbik asit, β -gliserofosfat ve deksametazon varlığına göre Çapkın'ın yapmış olduğu çalışma protokolü uygulandığında farklılaşma gözlemlenmiştir. Literatür bilgisi ışığında oluşturulan diğer protokollerde osteojenik farklılaşmada ortamdaki deksametazon varlığının fazla olması Kİ-MKH'ler üzerinde olumsuz etki yaratması sebebi ile hücreler yüzeyden kalkmıştır.

Adipojenik farklılaşma için referans alınan Aliborzi ve arkadaşlarının çalışmaları doğrultusunda oluşturularak uygulanan protokol sonucu farklılaşma gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil.4.9, Şekil.4.10, Şekil.4.11 de yer almaktadır

6. KAYNAKLAR

Aliborzi, G., Vahdat, A., Mehrabani, D., Hosseini, S., Tamadon, A., 2016. "Int J Stem Cells. 2016 May; 9(1): 115–123.

Anonim, 2015: <https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0021617.PDF> (16.03.2019)

Anonim, 2018: <https://www.endocrinology.org/media/1987/p8-extracellular-vesicles-website.jpg> (27.12.18)

Anonim, 2019: <https://stephyboo96.weebly.com/unipotent-multipotentpluripotent--totipotent-stem-cells.html#> (19.02.2019)

Anonim, 2020: <https://www.agarscientific.com/tem/carbon-formvar-support-films> (16.01.2020)

Aswad, H., Jalabert, A., Rome, S., 2016, "Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells *in vitro*", BMC Biotechnology 16:32.

Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E., 1963. "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." Nature ;197:452–454.

Biehl, J. K., Russell, B., 2009. "Introduction to Stem Cell Therapy." The Journal of Cardiovascular Nursing, 24(2), 98–103.

Birmingham, E., Niebur, G. L., McHugh, P. E., Shaw, G., Barry, F. P., McNamara, L. M., 2012. "Osteogenic Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells Is Regulated By Osteocyte And Osteoblast Cells In A Simplified Bone Niche." European Cells and Materials Vol. 23 (pages 13-27).

Börger, V., Bremer, M., Ferrer-Tur, R., Gockeln, L., Stambouli, O., Becic, A., & Giebel, B., 2017. "Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and

Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents.” *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1450.

Braicu, C., Tomuleasa, C., Monroig, P., Cucuianu, A., Berindan-Neagoe, I., Calin, G. A., 2014. “Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology” *Cell Death & Differentiation*, 22(1), 34–45.

Bruno, S., Collino, F., Deregibus, M. C., Grange, C., Tetta C., , Camussi G., 2013. “Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth.” *Stem Cells Dev.*, 22 (5), pp. 758-771.

Bruno, S., Collino, F., Iavello, A., & Camussi, G., 2014. “Effects of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles on Tumor Growth.” *Frontiers in Immunology*, 5.

Can, A., 2013. “Kök Hücre”, Akademisyen Kitabevi, ISBN: 9786054649433.

Capkın, M., 2010, Sıçan Kemik İliğinden Ve Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Pcl, Pcl-Kollajen Nanofibröz Yüzeylerde Sinir Hücrelerine Farklılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi.

Caplan A.I., Dennis J.E., 2006 “Mesenchymal stem cells as trophic mediators.” *J Cell Biochem*; 98:1076–1084.

Chagastelles, P. C., Nardi, N. B., 2011. “Biology of stem cells: an overview. *Kidney International Supplements*,” 1(3), 63–67.

Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T., Zhang, X., Xu, C., Zhang, L., Yang, H., Hou, J., Wang, Y., Shi, Y., 2016. “Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts” *Cell Death and Differentiation* (2016) 23, 1128–1139.

Cicero, A. L., Raposo, G., 2012. “The Cell Biology of Exosomes: Historical and Perspectives. Emerging Concepts of Tumor Exosome-Mediated Cell-Cell Communication”, 1–32. doi:10.1007/978-1-4614-3697-3_1

Davies, O. G., Cox, S. C., Azoidis, I., McGuinness, A., Cooke, M., Heaney, L. M., Davis E. T., Jones, S. W., 2019. “Grover, L. M., Osteoblast-Derived Vesicle Protein Content Is Temporally Regulated During Osteogenesis: Implications for Regenerative Therapies”. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 01 May 2019

Eitan, E., Zhang, S., Witwer, K. W., Mattson, M. P., 2015. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 26373. doi:10.3402/jev.v4.26373.

Erden, S., 2014. “Kök Hücreler Ve Klinikte Kullanımları” *Journal of New Results in Engineering and Natural Science*, Number: 3, 1-8. European Patent Office; EP2839278B1.

Erden. S., Taşdemir, Ş., Deliloglu Gürhan, I., 2016. “Comparison of the osteogenic differentiation capacity of adipose tissue derived mesenchymal stem cells from humans and rats ”, *Article in Turkish Journal of Biology* · January 2016

- Filip, S., Mokřý, J., English, D., Vojáček, J., 2005. "Stem cell plasticity and issues of stem cell therapy." *Folia Biologica (Praha)*;51(6):180-7.
- Fuchs, E., Chen, T., 2012. "A matter of life and death: self-renewal in stem cells." *EMBO Reports*, 14(1), 39–48.
- Girlovanu, M., Susman, S., Soritau, O., Rus-Ciucă, D., Melincovici, C., Constantin, A.-M., Miha, C. M., 2015. "Stem Cells - biological update and cell therapy progress." *Clujul Medical*, 88(3), 265.
- Greening, D. W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B. J., Simpson, R. J., 2015. "A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. Proteomic Profiling, 179–209. doi:10.1007/978-1-4939-2550-6_15.
- Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav, P. K., Nayak, B., Mohanty, S. 2018. "An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells." *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1).
- Hui, H., Tang, Y., Hu, M., Zhao, X., 2011. "Stem Cells: General Features and Characteristics"
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., Bruder, S. P., 1997. "Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*." *J. Cell Biochem* 64: 295-312.
- Justesen J., Stenderup K., Ebbesen E.N., Mosekilde L., Steiniche T., Kassem M., 2001. "Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis", *Biogerontology*; 2(3):165-71.
- Kang, H., Kim, J., Park, J., 2017. "Methods to isolate extracellular vesicles for diagnosis." *Micro and Nano Systems Letters*, 5(1).
- Katakowski, M., Buller, B., Zheng, X., Lu, Y., Rogers, T., Osobamiro, O., Shu, W., Jiang, F., Chopp M., 2013. "Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth." *Cancer Lett.*, 335 (1), pp. 201-204,
- Keshtkar, S., Azarpira, N., & Ghahremani, M. H. 2018. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1).
- Kim, J., Tan, Z., Lubman, D. M., 2015, "Exosome Enrichment of Human Serum using Multiple Cycles of Centrifugation".
- Kim, N., & Cho, S.-G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 28(4), 387. doi:10.3904/kjim.2013.28.4.387
- Klimanskaya, I., 2019. "Embryonic Stem Cells. Principles of Regenerative Medicine", 113–123. doi:10.1016/b978-0-12-809880-6.00007-2.
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P., Lim, S.

K. 2010. "Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury." *Stem Cell Research*, 4(3), 214–222.

Langenbach, F., & Handschel, J., 2013. "Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells *in vitro*." *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5), 117.

Lázaro-Ibáñez, E., Sanz-Garcia, A., Visakorpi, T., Escobedo-Lucea, C., Siljander, P., Ayuso-Sacido, Á., Yliperttula, M., 2014. "Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *The Prostate*", 74(14), 1379–1390. doi:10.1002/pros.22853.

Lee J.K., Park S.R., Jung B.K., Jeon Y.K., Lee Y.S., Kim M.K., Kim Y.G., Jang J.Y., Kim C.W., 2013. "Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells." *PLoS One*. 8(12):e84256.

Lee, J.-K., Park, S.-R., Jung, B.-K., Jeon, Y.-K., Lee, Y.-S., Kim, M.-K., Kim, Y.-G., Jang, J.-Y., Kim, C.-W., 2013. "Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells." *PLoS ONE*, 8(12), e84256.

Li, P., Kaslan, M., Lee, S.H., Yao, J., Gao, Z., 2017, "Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostic*, Vol. 7, Issue, 3.

Lou, G., Chen, Z., Zheng, M., & Liu, Y., 2017. "Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases." *Experimental & Molecular Medicine*, 49(6), e346.

Ludwig, A.-K., De Miroschedji, K., Doeppner, T. R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., ... Giebel, B. (2018). Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1528109. doi:10.1080/20013078.2018.1528109

McKee, C., & Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 62–77. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.051

Merinos-Gonzalez C., Zuniga F.A., Escudero C., Ormazabal V., Reyes C., Nova-Lamperti E., Salomon C., Aguayo C., 2016. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potential clinical application. *Front Physiol*; 7:24.

Oyar, P., 2016. "Dental Kök Hücre Kaynakları Ve Kemik Doku Rejenerasyonunda Kullanılma Potansiyelleri", Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. OYAR J Dent Fac Atatürk Uni 15, Sayfa : 96-101.

Pakravan K., Babashah S., Sadeghizadeh M., Mowla S.J., Mossahebi-Mohammadi M., Ataie F., Dana N., Javan M. 2017. "MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-

1alpha/VEGF signaling axis in breast cancer cells.” *Cell Oncol (Dordr)* doi: 10.1007/s13402-017-0335-7.

Pillitteri, L. J., Guo, X., Dong, J., 2016. “Asymmetric cell division in plants: mechanisms of symmetry breaking and cell fate determination.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(22), 4213–4229. doi:10.1007/s00018-016-2290-2.

Pontikoglou, C., Deschaseaux, F., Sensebé, L., Papadaki, H. A., 2011. “Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation.” *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(3), 569–589.

Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H., 2007. “On the Origin of the Term “Stem Cell.”” *Cell Stem Cell*, 1(1), 35–38.

Rani S., Ryan A.E., Griffin M.D., Ritter T., 2015. “Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications.” *Mol Ther*; 23:812–823.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L., 2001. “Stem cells, cancer and cancer stem cells.” *Nature*, 414(6859), 105–111.

Rizvanov, A. A., Persson, J., Şahin, F., Bellusci, S., & Oliveira, P. J. (2016). Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells in Biomedical and Clinical Applications. *Stem Cells International*, 2016, 1–3

Rosen C.J., Ackert-Bicknell C., Rodriguez J.P., Pino A.M., 2009. “Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications”, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009; 19(2):109-24.

Shenghui, H., Nakada, D., Morrison, S. J., 2009. “Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 377–406.

Siminovitch L., McCulloch E.A., Till J.E., 1963. “The distribution of colony-forming cells among spleen colonies.” *J Cell Physiol*; 62:327–336.

Tencerova, M., Kassem, M., 2016. “The Bone Marrow-Derived Stromal Cells: Commitment and Regulation of Adipogenesis.” *Frontiers in Endocrinology*, 7.

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., 2006. “Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids”, *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 3.22.1–3.22.29. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30

Vlassov, A., Li M., Zeringer, E., Conrad, R., 2017, “Methods for exosome isolation”,

Whitehead, C. A., Luwor, R. B., Morokoff, A. P., Kaye, A. H., Stylli, S. S., 2017. “Cancer exosomes in cerebrospinal fluid” *Transl Cancer Res*;6(Suppl 8):S1352-S1370

Whiteside, T. L., (2017). “Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment.” *Seminars in Immunology*, 35, 69–79.

Wu, M., Ouyang, Y., Wang, Z., Zhang, R., Huang, P., Chen, C., Li, H., Li, P., Quinn, D., Dao, M., Suresh, S., Sadovsky, Y., Huang, T. J., 2017, “Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics”,

Xiao, G., Gopalakrishnan, R., Jiang, D., Reith, E., Benson, M.D., Franceschi, R.T., 2002. "Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells." *J Bone Miner Res.* 2002;17:101–110.

Yang, D., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, F., Chen, L., Ma, L., Larcner, L. M., Chen, S., Liu, N., Zhao, Q., Tran, P. H. L., Chen, C., Veedu, R., Wang, T., 2020 "Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation – efforts for efficient exosome-based theranostics", *Theranostics* 2020, Vol. 10, Issue 8

Yeo R.W, Lai R.C., Zhang B., Tan S.S., Yin Y., Teh B.J., Lim S.K., 2013. "Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery", *Adv Drug Deliv Rev.* 65(3):336-41.

Yeo, R.W.Y., Lai, R.C., Tan, K.H., Lim, S.K., 2013, "Exosome: A Novel and Safer Therapeutic Refinement of Mesenchymal Stem Cells", *Exosomes microvesicles*, Vol. 1, 7.

Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., Sekiya, I., 2006. "Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle." *Cell and Tissue Research*, 327(3), 449–462.

Yu, B., Zhang, X., & Li, X., 2014. "Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells." *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4142–4157.

Yuasa, M., Yamada, T., Taniyama, T., Masaoka, T., Xuetao, W., Yoshii, T., Horie, M., Yasuda, H., Uemura, T., Okawa, A., Sotome, S., 2015. "Dexamethasone Enhances Osteogenic Differentiation of Bone Marrow- and Muscle-Derived Stromal Cells and Augments Ectopic Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2." *PLOS ONE*, 10(2), e0116462.

Zhang, H.-G., Grizzle, W. E., 2014. "Exosomes. *The American Journal of Pathology*", 184(1), 28–41. doi:10.1016/j.ajpath.2013.09.027.

Zhou, M., Weber, S. R., Zhao, Y., Chen, H., Sundstrom, J. M., 2020. "Methods for exosome isolation and characterization. *Exosomes*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816053-4.00002-X>.