





**TRİKALSİYUM FOSFATA BAĞLANMIŞ MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ KEMİK  
YENİLENMESİNE ETKİSİ**

**EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELL EXOSOMES  
BOUND TO TRICALCIUM PHOSPHATE ON BONE  
REGENERATION**

**EDA ÇİFTÇİ DEDE**

**PROF. DR PETEK KORKUSUZ**

**Tez Danışmanı**

**DOÇ. DR. FERAY BAKAN MISIRLIOĞLU**

**Yardımcı Danışman**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021



## ÖZET

# TRİKALSİYUM FOSFATA BAĞLANMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ KEMİK YENİLENMESİNE ETKİSİ

**Eda ÇİFTÇİ DEDE**

**Doktora, Biyomühendislik Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ**

**Yardımcı Danışman: Feray BAKAN MISIRLIOĞLU**

**Nisan 2021, 137 sayfa**

Kemik fizyolojik koşullarda kendini yenileyebilen bir doku olmasına rağmen metabolik hastalıkları, nekrotik ya da travmatik hasarlarında yapı ve işlevleri bozulabilir. Kritik kemik kayıplarının, kemik inorganik matriksinin ana bileşeni osteokondüktif kalsiyum fosfat bileşiklerinin yanında osteoindüktif büyüme faktörleri ya da bunlara kaynak sağlayan kök/öncül hücreler ile desteklenmesi gereklidir. Mezenkimal kök hücre eksozomları, kemikte rejeneratif etkili molekülleri içermeleri, hedef hücreye kolayca alınmaları ve immün yanıt oluşturmamaları nedeniyle, mezenkimal kök hücreler yerine tercih edilebilir. Bu çalışmada anneksin V ile kalsiyum eksik hidroksiapatite kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomları bağlanarak oluşturulan biyomühendislik temelli formülasyon ile osteoblastların çoğalma, matriks sentezi ve mineralizasyonunun uyarılabileceği varsayılmıştır. Bu hipotezi test etmek için, deney ve kontrol gruplarını içeren *in vitro* deney düzeneğinde (1) kalsiyum eksik hidroksiapatitin üretilmesi ve

karakterizasyonu, (2) insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının izolasyonu ve karakterizasyonu, (3) kalsiyum eksik hidroksiapatit ve insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının anneksin V aracılığı ile bağlanması, bağlanma ve salımın karakterizasyonu, (4) oluşan bu formülasyonun osteoblastların çoğalma ve mineralizasyonuna etkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Hedefler doğrultusunda kimyasal çöktürme yöntemiyle kalsiyum eksik hidroksiapatit sentezi gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin X-ışını difraksiyonuyla ve Raman spektroskopisiyle yapısal karakterizasyonu, geçirimli elektron mikroskobunda morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler morfoloji, kültür plağına tutunma, spesifik yüzey belirteçleri ve kondrojenik farklılaşma analizi yöntemleriyle karakterize edildikten sonra ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleriyle eksozomları izole edilmiştir. Eksozomlar transmisyon elektron mikroskobunda değerlendirilmiş; BCA analizi ile protein konsantrasyonları, NTA yöntemiyle partikül sayısının ve partikül boyutlarının analizi yapılmıştır. Akım sitometresiyle CD 9 ile yakalanan eksozomların CD63 ile ve CD81 ile işaretlendikleri, her üç belirtece de sahip oldukları gösterilmiştir. Kalsiyum eksik hidroksiapatite, anneksin V aracılığıyla insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının bağlanması; Raman spektroskopisi ve jel elektroforezi ile gösterilmiştir. Kalsiyum eksik hidroksiapatite bağlı eksozomların BCA analiz yöntemi ile ilk 12 saatte büyük çoğunluğunu kontrollü olarak saldığı gösterilmiştir. Kalsiyum eksik hidroksiapatit ve insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının insan fetal osteoblastlarındaki etkili proliferatif dozu gerçek zamanlı impedans temelli olarak 1. günden 3. güne ölçülmüş ve sırasıyla 0.1 µg/ml ve 25 µg/ml olarak belirlenmiştir. Belirlenen etkili dozlarda hazırlanan formülasyon osteoblastlara uygulandığında gerçek zamanlı olarak osteoblastların çoğaldıkları; matriks sentezi ve mineralizasyonu gösteren ALP aktivitesinin 0-7 gün zaman aralığında kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. Sonuç olarak bu tez çalışması ile ilk kez kalsiyum eksik hidroksiapatit, anneksin V ile kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarına bağlanarak orijinal ve yenilikçi, yüksek teknolojik, kişiye özel ve hedefli bir formülasyon geliştirilerek *in vitro* koşullarda insan osteoblastlarındaki yenileyici etkisi ortaya konmuştur. Bu yeni formülasyonun *in vivo* hastalık modellerindeki deneysel validasyonunu takiben klinikteki metabolik ya da travmatik kemik hasarlarının onarılmasında otojenik, kişiye özel ya da allojenik bir tedavi ajanı olarak yer alma potansiyeli bulunmaktadır. Tez kapsamındaki biyomühendislik temelli yeni tedavi ürününün ülkemizin ortopedik hastalıkların

tedavisine ait uluslararası pazarda rekabet gücünü arttırma hedefini karşılaması önemlidir. Bu kapsamda, tezden elde edilen çıktılar ile Hacettepe Teknokent Teknoloji Transfer Merkezi Patent Ofisine patent başvurusu yapılmıştır (Başvuru no: 2021/002221).

**Anahtar Kelimeler:** İnsan mezenkimal kök hücresi, eksozom, trikalsiyum fosfat, kalsiyum eksik hidroksiapatit, anneksin V, osteoblast

## **ABSTRACT**

### **EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELL EXOSOMES BOUND TO TRICALCIUM PHOSPHATE ON BONE REGENERATION**

**Eda ÇİFTÇİ DEDE**

**Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ**

**Assistant- Supervisor: Assoc. Prof. Feray BAKAN MISIRLIOĞLU**

**April 2021, 137 pages**

The structure and functions of bone may be impaired with metabolic-diseases such as osteoporosis, necrotic or traumatic damages, although it is a dynamic tissue that can renew itself under physiological conditions. Critical bone losses need to be supported by osteoinductive growth factors, stem/precursor cells, as well as osteoconductive calcium phosphate compounds. Mesenchymal stem cell exosomes could be preferred instead of mesenchymal stem cells because they contain molecules that have regenerative effects in bone, be easily taken into the target cell and do not create an immune response. In this study, it was hypothesized that the proliferation, matrix synthesis and mineralization of osteoblasts can be stimulated with bioengineered formulation formed by binding annexin V to calcium deficient hydroxyapatite and human bone marrow derived mesenchymal stem cell exosomes. In order to test this hypothesis, an *in vitro* study consisting of an experiment and control group was designed. The objectives of the thesis are ; (1)



production and characterization of calcium deficient hydroxyapatite, (2) isolation and characterization of human bone marrow-derived mesenchymal stem cell exosomes, (3) production and characterization of new formulation that contain calcium deficient hydroxyapatite, human bone marrow-derived mesenchymal stem cell exosomes, and binding material annexin V, and (4) evaluating the effect of a newly formulated material on proliferation and mineralization potentials of osteoblasts. In line with these goals, calcium deficient hydroxyapatite was synthesized using a chemical precipitation method and characterized by X-ray diffraction, Raman spectroscopy, and transmission electron microscopy. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells were characterized by morphology, attachment to the culture plate, specific surface markers, osteogenic and chondrogenic differentiation analysis methods, and then exosome isolation was performed by ultracentrifugation and MACS methods. Exosomes were observed in the transmission electron microscope, protein concentrations were determined by BCA analysis and particle analysis with NTA. Exosomes have been shown by flow cytometry to specifically have all three markers (CD9, CD63, CD81). Calcium deficient hydroxyapatite has linked human bone marrow derived mesenchymal stem cell exosomes via annexin V and has been characterized by Raman spectroscopy and SDS-PAGE. The release study was carried out by BCA analysis. The exosomes are released from the hydroxyapatite in 12 hours. The proliferative dose of calcium-deficient hydroxyapatite and human bone marrow-derived mesenchymal stem cell exosomes were determined by real-time cell proliferation analysis 0.1 µg/ml, and 25 µg/ml respectively. The material prepared with effective doses was applied to the osteoblasts. The proliferative potential and matrix mineralization induction effect was reported by using real time cell proliferation and ALP activity analyzes, respectively. As a result, with this thesis study, an original and innovative, high-tech, personalized and targeted formulation was developed by a newly formulated material that contains calcium deficient hydroxyapatite and human bone marrow derived mesenchymal stem cell exosomes with annexinV binding molecule for the first time, and its regenerative effect on human osteoblasts *in vitro* was demonstrated. Following experimental validation of this new formulation in *in vivo* disease models, it has the potential to be involved in the repair of clinical metabolic or traumatic bone injuries as an allogeneic or autogenous personalized treatment agent. The new bioengineering-based treatment product produced within the scope of the thesis meets our country's goal of increasing the competitiveness in the international market in the treatment of orthopedic diseases. A patent application was made to Hacettepe

Technopolis Technology Transfer Center Patent Office with the new formulation obtained from the thesis. (Application number: 2021/002221).

**Keywords:** Human mesenchymal stem cell, exosome, tricalcium phosphate, calcium deficient hydroxyapatite, annexin V, osteoblast

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde bana üstün bilgi birikimi, öğretici kimliği ve tecrübeleriyle ışık tutan, çalışmalarım için imkanlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma prensibi ve iş ahlakını her zaman kendime örnek aldığım değerli akademik danışmanım Prof. Dr. Petek Korkusuz'a; çalışmalarımın emeği ve yardımlarıyla her zaman yanımda hissettiğim, aynı zamanda tezimde kullandığım malzemenin geliştirilmesinde özveriyle destek olan yardımcı danışmanım Doç. Dr. Feray Bakan Mısırlıoğlu'na; bilime bakış açımı genişleten, bilgisi ve tecrübeleriyle beni her zaman bir sonraki adıma hazırlayan, sayın hocam Prof. Dr. Feza Korkusuz'a; Tayvan'daki eğitim sürecimde benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, kendimi geliştirmem için beni teşvik eden Prof. Dr. Feng-Huei Lin'e; sadece çalışmalarımın değil her konuda yanımda olduklarını hissettiğim çalışma arkadaşlarım Sefa Burak Çam, Merve Gizer, Selin Önen ve Özge Boyacıoğlu'na; her zaman destekleriyle arkamda olan kıdemli ekip arkadaşlarım Berna Kankılıç, Sevil Köse, Çağla Köprü ve Zeynep Bal'a; Tayvan'daki tanışmamız sonrası bana çok şey katan, akademik bakış açısına sonsuz güvendiğim canım dostum ve meslektaşım Deniz Atilla'ya; hep yanımda ve bana destek olan kadim arkadaşlarım Beril Özdal, Burcu Selçuk Kanat, Esra Önder İnal, Ayça Taşbaş, Didar İsmailoğlu, Can Çerçi ve Gizem Çerçi'ye; bu süreçte yanımda olan ve beni her durumda sakinleştirebilen fahri psikologum Şükran Öz'e; bilimsel çalışmalarımın ve hayatımın gizli kahramanı amcam Fikret Çiftci'ye; hayatın pek çok alanında bana yardım elini her zaman uzatan Semra Dede, Fikret Dede, Defne Dede ve Selma Gürle'ye; uzun çalışma gecelerimin yılmaz savunucuları Salem ve Mia'ya; yoğun tempoda çalışmama, çoğu zaman ikinci planda kaldığını düşünmesine rağmen sızlanmayan, sevgisi ve desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Gökçe Dede'ye; her daim sevgileri, destekleri, güvenleri ve inançlarıyla yanımda olan, anlattıklarımı yılmadan dinleyen, doğal şifalarım canım annem ve babama sonsuz teşekkür ediyorum. Bu tez çalışmamın yapılmasına maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (#TDK-2018-17530, #THD-2018-17659), tezim süresince Doktora Öncelikli Alanlar TÜBİTAK 2211-C ve YÖK 100/2000 bursiyeri olarak 2018-2021 yılları arasında beni destekleyen TÜBİTAK ve YÖK'e teşekkür ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik dokusunun hastalıkları ve travmaları .....	3
2.1.1. Kemikğin travma ve hastalıkları: .....	3
2.1.2. Kemikğin Histolojik Yapısı: .....	6
2.2. Kemik için kalsiyum ortofosfat temelli biyomalzemeler:.....	10
2.2.1. Kalsiyum fosfat bileşiklerinin biyolojik olarak bağlanma molekülleri ile modifiye edilmeleri:.....	13
2.3. Mezenkimal kök hücreler ve mezenkimal kök hücre eksozomları: .....	14
2.3.1 Kemik ve mezenkimal kök hücreler: .....	14
2.3.2. Kemik ve mezenkimal kök hücre eksozomları: .....	15
2.4. Eksozom zarına spesifik bağlanabilen moleküller ve Anneksin V .....	19
2.4.1. Eksozom zarına spesifik bağlanabilen moleküller .....	20
2.4.2. Anneksin V yapısı ve işlevi.....	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	23
3.1. Deney Tasarımı: .....	23
3.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin üretilmesi ve karakterizasyonu.....	25
3.2.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit (KEHA) üretimi: .....	25
3.2.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin karakterizasyonu: .....	26

3.3. İnsan kemik iliği kaynaklı ticari mezenkimal kök hücrelerden eksozomların eldesi ve karakterize edilmesi.....	28
3.3.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu: .....	28
3.3.2. Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu:.....	31
3.4. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin anneksin V molekülü ile eksozomları bağlaması .....	34
3.4.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom bağlanmasının karakterizasyonu ve görüntülenmesi .....	35
3.4.2. Eksozomların Kalsiyum eksik hidroksiapatit'den salımı .....	36
3.5. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom formülasyonunun osteoblastların çoğalma, matriks sentezi ve mineralizasyonuna etkisinin değerlendirilmesi .....	36
3.5.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit ve eksozomların osteoblast çoğalmasında etkili dozunun belirlenmesi .....	36
3.5.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom formülasyonunun osteoblastların mineralizasyonuna etkisinin ALP analizi ile değerlendirilmesi: ..	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit'in karakterizasyonu:.....	38
4.1.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit'in X-ışını difraksiyonu ve Raman spektroskopisi ile karakterizasyonu: .....	38
4.1.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatit'in geçirimli elektron mikroskobu ile morfolojik analizi: .....	39
4.2. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden eksozomların eldesi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi .....	40
4.2.1. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürü ve karakterizasyonu:.....	40
4.2.2. Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu:.....	41
4.2.3. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu:.....	43
4.3. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- eksozom formülasyonunun karakterizasyonu ...	47
4.3.1. Raman Spektroskopisi ile KEHA-AnV-Eksozom formülasyonunun içerdiği komponentlerin bağlanma analizi: .....	47
4.3.2. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile KEHA-AnV-Eksozom formülasyonunun içerdiği komponentlerin bağlanma analizi: .....	49

4.3.3. Anneksin V ile modifiye edilmiş kalsiyum eksik hidroksiapatit ile insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının bağlanması .....	50
4.5. Eksozomların kalsiyum eksik hidroksiapatit-eksozom formülasyonundan salımı .....	51
4.6. Kalsiyum eksik hidroksiapatit-eksozom formülasyonunun osteoblastların çoğlama, matriks sentezi ve mineralizasyonuna etkisinin değerlendirilmesi .....	51
4.6.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit ve eksozomların osteoblastların çoğalmasında etkili dozlarının belirlenmesi .....	51
4.6.2.Kalsiyum eksik hidroksiapatit-eksozom formülasyonunun osteoblastların mineralizasyonuna etkilerinin ALP analizi ile değerlendirilmesi.....	55
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇLAR.....	66
7. KAYNAKLAR.....	67
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK BEYANI VE RAPORU .....	92
ÖZGEÇMİŞ .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. Kemik yapısı ve yapım-yıkım dengesini bozan kemik hastalık ve travmaları özetlenmiştir. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.* ..... 4
- Şekil 2.2. Osteoporozun (A)morbidite ve mortalite oranları ve (B)diğer sık görülen hastalıklara göre dağılımı grafiklerle gösterilmiştir [34]. *Makaleden esinlenilerek yeniden şekillendirilmiştir. Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.* ..... 5
- Şekil 2.3. Femur başı osteonekrozunun temel sebepleri dilim grafikte özetlenmiştir [35]. *Makaleden esinlenilerek yeniden şekillendirilmiştir. Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.* ..... 5
- Şekil 2.4. Kemik hücreleri ve kompakt kemiğin osteon yapısı görülmektedir. (A) Osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar, osteoblastların matür hali olan osteositler ve osteoklastlar şematize edilmiştir. (B) Bir osteondaki yapısal düzen şematize edilmiştir. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.* ..... 7
- Şekil 2.5. Uzun kemik şematize edilmiştir. Kemiğin kısımları, uzun kemiklerde trabeküler kemik ve kompakt kemiğin konumları, kan damarları ve medulla boşluğunun yanı sıra kemik kavitelerini örten bağ dokusu tabakası endosteum ve kemiği dıştan saran periosteum şekilde gösterilmektedir. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.* ..... 8
- Şekil 2.6. İntramembranöz kemikleşme sürecinde mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara ve osteositlere farklılaşmasında etkili belirteçler şematize edilmiştir. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.* ..... 9
- Şekil 2.7. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve osteoblastlarda kalsiyum ve fosfatın hücre içine alınma mekanizmaları gösterilmiştir. MKH: Mezenkimal kök hücre, CaP: Kalsiyum fosfat, MGP: Matiks Gla Proteini, OPN: Osteopontin, SLC20 $\alpha$ 1: Sodyum bağımlı fosfat taşıyıcı 1, CaSR: Kalsiyuma duyarlı reseptör, PKC: Protein kinaz C, BMP-2: Kemik morfojenik proteini 2, ERK1/2: Ekstrasellüler sinyallerle düzenlenen kinaz 1/2, CREB: cAMP cevap elemanı bağlama proteini,

CaMK2a/CAM: Kalsiyum/ kalmodulin bağımlı protein kinaz tip II alt birim alfa. <i>Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.</i> .....	12
Şekil 3.1. Tez çalışmasının iş akışı şematize edilmiştir. <i>Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.</i> .....	24
Şekil 4.1. Şekilde (A) sentezlenen KEHA'ya ve $\beta$ -TCP'ye ait X-ışını difraktogramı, (B) referans numunelere ait X-ışını difraktogramları, (C) hesaplanan ortalama kristal boyutu ve kristallik derecesi görülmektedir. D: ortalama kristalit boyutu, Xc: kristalit derecesini ifade etmektedir.....	38
Şekil 4.2. Sentezlenen KEHA'ya ve KEHA'nın ısı işleme tabi tutulması sonucu elde edilen $\beta$ -TCP'ye ait Raman spektrumları A) 400-1200 $\text{cm}^{-1}$ B) 900-1000 $\text{cm}^{-1}$ . Spektrumlarda fosfat grubuna ait tam simetrik $\nu_1$ titreşim modu KEHA'de 962 $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenirken, faz dönüşümü sonrası $\beta$ -TCP'de 947 ve 969 $\text{cm}^{-1}$ 'de iki ayrı pik olarak görülmektedir. ....	39
Şekil 4.3. Kurutulmuş (A) KEHA ve (B) sinterleme sonrası elde edilen $\beta$ -TCP örneklerine ait aydınlık alan elektron mikrografları görülmektedir. ....	40
Şekil 4.4. İnverte ışık mikroskopunda iğsi şekilli insan Kİ-MKH'lerin kültür plağına tutundukları görülmektedir. x100.....	40
Şekil 4.5. İnsan Kİ-MKH'lerinin spesifik yüzey belirteçlerinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi. (A) Pozitif CD29 ve negatif CD45, (B) pozitif CD 44 ve negatif CD38 işaretlemelerinin yüzdeleri akım sitometrisi grafiklerinde gösterilmiştir. Buna göre insan Kİ-MKH'lerinin %98.45 oranında CD29 ve%99.49 oranında CD44 ile işaretlendiği, hematopoietik kök hücre belirteçlerinin ise çok düşük oranda işaretlendiği görülmektedir. ....	41
Şekil 4.6. İnsan Ki-MKH'lerinin 21. günde ELISA tekniği ile gerçekleştirilen osteojenik farklılaştırma analizi görülmektedir. Kontrol grubuna göre Ki-MKH'lerin ALP aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür. (*) istatistiksel olarak anlamlı farklılık $p=0.001$ ifade etmektedir.....	42
Şekil 4.7. Büyüme besiyeri ve kondrojenik farklılaşma besiyerlerinde kültüre edilen MKH'lerin 3. ve 7. gün (A)SOX9 ve (B)COMP ekspresyon verilerine ait grafikler gösterilmektedir. Sox9 ve COMP genlerinin 3. ve 7. günlerde kontrole göre yüksek oranda ifade edilmiştir. (*) $p < 0.05$ ifade etmektedir.....	42
Şekil 4.8. Ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının protein konsantrasyonları görülmektedir. Gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktur.....	43



- Şekil 4.9. Grafiklerde (A) Ultrasantrifüjleme ve (B) MACS yöntemleri ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının partikül konsantrasyonlarının partikül çapına göre değerleri grafiklerde görülmektedir. .... 44
- Şekil 4.10. Ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının ml başına düşen partikül sayısı grafikte gösterilmektedir. MACS ile izole edilen grubun normalize edilmiş ml başına düşen partikül sayısı verileri ultrasantrifüjlemeye göre yüksektir. (\*)  $p=0.011$ . .... 44
- Şekil 4.11. Ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının saflık oranı (mg protein başına düşen partikül sayısı) grafikte gösterilmektedir. Normalize edilmiş saflık oranı verilerine göre MACS ile izole edilen grup ultrasantrifüjleme ile izole edilenlere göre yüksek saflıktadır. (\*)  $p=0.006$ . .... 45
- Şekil 4.12. Ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile izole edilmiş insan Kİ-MKH eksozomlarının yüzey belirteçlerinin akım sitometrik değerlendirmesi sonucunda elde edilen ortalama floresan intansite değerleri görülmektedir. (A) Ultrasantrifüjleme, (B) ise MACS yöntemi ile izole edilen eksozomları göstermektedir. .... 46
- Şekil 4.13. Geçirimli elektron mikrograflarında (A)ultrasantrifüjleme ve (B)MACS ile izole edilmiş negatif işaretli küresel yapıları insan Kİ-MKH eksozomları görülmektedir. Beyaz çemberler eksozom kümelerini göstermektedir. MACS ile izole edilen eksozomların manyetik boncukları okla işaretlenmiştir. UA, PTA x50.000 ..... 46
- Şekil 4.14. Tespit edilen 200-2000  $cm^{-1}$  bölgesindeki eksozom bantları ve ait oldukları biyomoleküller görülmektedir. .... 48
- Şekil 4.15. KEHA, AnV, Eksozom ve formülasyona ait mukayeseli Raman spektrumları. (A) 100-3000  $cm^{-1}$ , (B) 100-900  $cm^{-1}$ , (C) 900-2000  $cm^{-1}$  ve (D) 2000-3000  $cm^{-1}$  arasındaki bölgelerdeki mukayeseli Raman spektrumları verilmektedir..... 49
- Şekil 4.16. KEHA-AnV-Eksozom formülasyonunun ve kontrol gruplarının SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile elde edilen bantları görülmektedir. Soldan sağa sırasıyla KEHA-AnV-Eksozom formülasyonu, KEHA-AnV karışımı, AnV ve eksozom grupları yer almaktadır. (a) KEHA-AnV-Eksozom içeren formülasyon bandı, (b) serbest eksozom bandı, (c) KEHA-AnV bandı, (d) serbest AnV bandını göstermektedir. .... 50

- Şekil 4.17. İnsan Kİ-MKH eksozomları ve oluşturulan formülasyona ait elektron mikrografları görülmektedir. (A) İnsan Kİ-MKH eksozom grubunda eksozomlar seçilmektedir. (B) Tek başına KEHA partikülünün çubuksu yapısı izlenmektedir. (C) Formülasyon: KEHA, Anneksin V ve eksozom grubunda ise formülasyon bileşenlerinin etkileşimi görülmüştür. x150.000.....50
- Şekil 4.18. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının KEHA'dan zamana göre salım grafiği ve zamana göre ayrıntılı salım verileri gösterilmektedir. Başlangıçta 24.3µg/ml konsantrasyonlu eksozom ile başlanan salım çalışmasında ilk yarım sa içinde eksozomların KEHA ile AnV aracılı bağlandığı, sonrasında salımının ilk 24 sa gerçekleştiği görülmektedir.....51
- Şekil 4.19. Ticari olarak elde edilen hFOB 1.19 hücre hattının deneylerde kullanılacak optimal hücre miktarının impedans temelli gerçek zamanlı hücre çoğalma analizi gösterilmektedir. Grafiğe göre 3.000 ve 2.000 adet hücre içeren grupların hücre indeksleri ilk 20 sa içinde 1.0 değerine ulaşmakta ve deney için en ideal hücre yoğunluğunu oluşturmaktadır. ....52
- Şekil 4.20. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının osteoblastlardaki etkili doz değerlendirmesi şekilde görülmektedir. (A) Gerçek zamanlı hücre çoğalma verileri, (B) etkili doz değerlendirmesi, (C) zamana bağlı etkili doz değerlendirmesi gösterilmiştir. Osteoblastlar için çoğalma etkili eksozom dozu 27.8 µg/ml olduğu, zamana bağlı etkili dozun ise 21. sa 24.2 µg/ml olduğu ve 36. sa kadar devam ettiği belirlenmiştir. ....53
- Şekil 4.21. KEHA'nın osteoblastlardaki etkili doz değerlendirmesi şekilde görülmektedir. (A) Gerçek zamanlı hücre çoğalma verileri, (B) etkili doz değerlendirmesi, (C) zamana bağlı etkili doz değerlendirmesi gösterilmiştir. Osteoblastlar için etkili KEHA dozu 0.37 µg/ml olduğu, zamana bağlı etkili dozun ise 21. sa 0.1 µg/ml olduğu belirlenmiştir. ....54
- Şekil 4.22. KEHA, AnV ve insan Kİ-MKH eksozomu içeren malzemenin osteoblastların mineralizasyonu üzerine etkilerinin değerlendirildiği grafikler görülmektedir. Gruplara göre (A) 3. Gün ALP aktivitesi değişimleri, (B) 7. Gün ALP aktivitesi değişimleri gösterilmiştir. Kontrol: sadece besiyeri içeren, KEHA: Etkili dozda KEHA içeren, Eksozom: Etkili dozda insan Kİ-MKH eksozomu içeren, AnV: sadece AnV içeren grupları ifade etmektedir.....55

Şekil 4.23. KEHA, AnV ve insan Kİ-MKH eksozomu içeren malzemenin osteoblastların mineralizasyonu üzerine zamana göre değişen etkilerinin değerlendirildiği grafik görülmektedir..... 56

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kalsiyum fosfat temelli bileşikler, bunların kısaltmaları, Ca/P oranları ve kimyasal formülleri listelenmektedir. ....	11
Çizelge 2.2. Kalsiyum fosfat bileşikleri bağlanma molekülleri ile modifiye edildiklerinde kemikleşmedeki etkileri listelenmiştir. ....	13
Çizelge 2.3. Mezenkimal kök hücre eksozomlarının içerikleri listelenmiştir.....	17
Çizelge 2.4. Kemik hücreleri ve mezenkimal kök hücrelerin içerdiği, kemik onarımında etkili moleküller listelenmiştir. ....	18
Çizelge 2.5. Eksozom zarında bulunan olası tutunma bölgelerine göre bağlayıcı moleküller listelenmiştir.....	21
Çizelge 3.1. Bağımlı ve bağımsız değişkenleri gösteren deney planı. Deney ve kontrol gruplarıyla gerçekleştirilen iş paketlerindeki tekrar (n) sayıları gösterilmektedir. AnV: Anneksin V, KEHA: Kalsiyum eksik hidroksiapatit.....	23
Çizelge 3.2 Deneyde kullanılan antikorlar ve izotip kontrolleri tabloda özetlenmiştir. .	29
Çizelge 3.3. Elektron mikroskobu analizleri için örnek hazırlama ve konsantrasyon bilgileri özetlenmiştir. ....	34
Çizelge 4.1. MACS ve Ultrasantrifüjleme yöntemleri ile izole edilen eksozomların karşılaştırmalı tablosu görülmektedir.....	47

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\lambda$ : Lamda

$^{\circ}\text{C}$ : Derece santigrat

$\mu$ : Mikron

$\text{Å}$ : Angström

ACP: Amorf kalsiyum fosfat

AFM: Atomik kuvvet mikroskobu

ALP: Alkalen fosfataz

AnV: Anneksin V

APC: Allofikosiyenin

BCA: Bikinkoninik asit

BMP-2: Kemik morfojenik proteini 2

BP: Bağlama peptidi

BSA: Bovin serum albumin

CaMK2a/CAM: Kalsiyum / kalmodulin bağımlı protein kinaz tip II alt birim alfa

CaP: Kalsiyum fosfat

CaSR: Kalsiyuma duyarlı reseptör

cDNA: Tamamlayıcı DNA

Col1a1: Tip 1 kollajen alfa 1

CREB: cAMP cevap elemanı bağlama proteini

DCP: Dikalsiyum fosfat anhidrat

DCPD: Dikalsiyum fosfat dihidrat

dk: Dakika

DMEM-LG: Düşük glikozlu Dubelco'nun modifiye Eagle besiyeri

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EGF: Endotel büyüme faktörü

ERK1/2: Ekstrasellüler sinyallerle düzenlenen kinaz ½

ESM: Ekstraselüler matriks

EV: Ekstraselüler vezikül

FACS: Floresan aktive edilmiş hücre ayırma

FBS: Fetal bovin serum

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FITC: Floresan izotiyosiyanat

GK-MKH: Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücre

HAp: Hidroksiapatit

HEPES: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit

hFOB: İnsan- fetal osteoblast

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

HSP: *Heat shock* proteinler

ICAM-1: İntrasellüler adezyon molekülü-1

IL: İnterlökin

IP-KH: İndüklenmiş pluripotent kök hücre

ITS: İnsülin, insan kaynaklı transferrin ve selenöz asit

KEHA: Kalsiyum eksik hidroksiapatit

Kİ-MKH: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre

L-AA: L-askorbik asit

MACS: Manyetik olarak aktive edilmiş hücre ayırma

MARKS-ED: Miristile edilmiş alaninden zengin C kinaz efektör ucu

MCP: Monosit kemotaktik protein

MCPA/M: Monokalsiyum fosfat anhidrat/monohidrat

MEM: Eagle'ın minimal temel besiyeri

MEPE: Matriks ekstraselüler fosfoglikoprotein peptidi

MGP: Matriks gla proteini,  
MKH: Mezenkimal kök hücre  
MVC: Multiveziküler cisim  
NGF: Sinir büyüme faktörü  
nm: Nanometre  
NMR: Nükleer manyetik rezonans  
NTA: Nanopartikül Takip Analizi  
Θ: Teta  
OCN: Osteokalsin  
OCP: Okta-kalsiyum fosfat  
OGP: Osteojenik büyüme peptidi  
OPN: Osteopontin  
PBN: PBS/BSA/Na Azide  
PBS: Fosfat tamponlu salin  
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü  
PE: Fikoeritrin  
Pi: İnorganik fosfat  
PKC: Protein kinaz C  
pNPP: p-Nitrofenil fosfat  
PPi: İnorganik pirofosfat  
ProHB-EGF: Heparin bağlı epidermal büyüme faktörü  
PS: Fosfatidilserin  
P/S: Penisilin/streptomisin  
PTA: Fosfotungustik asit  
qRT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu  
rpm: Dakikadaki devir sayısı

Runx2: Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2

sa: Saat

SDF: Stromal hücre kaynaklı faktör

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

SLC20 $\alpha$ 1: Sodyum bağımlı fosfat taşıyıcı 1

S-MKH: Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücre

SMP: Yüzey modifikasyon peptidi

sn: Saniye

TCP: Trikalsium fosfat

TEM: Geçirimli elektron mikroskobu

TGF: Dönüştürücü büyüme faktörü

TSG101: Tümör duyarlı gen 101

UA: Uranil asetat

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

X-RD: X-ışını difraksiyonu

Y-MKH: Yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre

$\alpha$ : Alfa

$\beta$ : Beta







# 1. GİRİŞ

Kemik kendini tümüyle yenileyebilen dinamik bir doku olmasına rağmen osteoporoz gibi metabolik hastalıklarda, osteonekroz ya da travmatik kemik hasarlarında hücre ve ekstraselüler matriksin (ESM) yapısı ve mineralizasyon mekanizması bozulabilir. Yaşlanan nüfus ile artan, kemik mineral kaybıyla seyredip kırıklarla sonuçlanan osteoporoz ve travmalar ya da dolaşım bozuklukları sonucu oluşan osteonekroz dünyada en yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan kas iskelet sistemi hastalıklarını oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü' nün 2003 yılında hazırlamış olduğu rapora göre osteoporoz; Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Japonya'da 100 milyona yakın insanı etkilemekte ve yılda 2,3 milyon kırığa neden olmaktadır [1]. Amerika Birleşik Devletleri'nde, her yıl yaklaşık 20.000-30.000 kişi osteonekroz tanısı almakta [2] ve kalça eklem replasman cerrahilerinin yaklaşık %10'unun osteonekroz nedeni olduğu bildirilmektedir [3-5]. Travmatik ya da metabolik hasarların tedavisinde, kemiğin inorganik matriksinin ana bileşeni olan kalsiyum fosfat bileşiklerinin sentetik formları kullanılmaktadır [3, 4, 6]. Kalsiyum fosfat bileşiklerinin yüksek osteokondüktif etkili olduğu bilinmektedir [7, 8]. Kritik kemik kayıplarında rejenerasyonun sağlanabilmesi için, osteokondüktif malzemelerin osteoindüktif temelli yaklaşımlarla desteklenmesi gerekir [9-12]. Bu amaçla çeşitli büyüme faktörleri [10, 11, 13] ya da bunlara kaynak sağlayan kök ve öncül hücreler [14, 15] uygulanabilir. Mezoderm kökenli kemik dokusunun kök ve progenitör hücreleri, periosteum, endosteum ve Havers kanallarının iç yüzlerinde yer alır. Mezenkimal kök hücreler (MKH), hasarlı bölgedeki rejeneratif potansiyelini, olgun hücrelere farklılaşarak ya da buldukları mikro-çevreye parakrin olarak salgıladıkları moleküllerin immün-baskılayıcı, anti-inflamatuvar vb. etkileriyle sağlar [16, 17]. Eksozomlar elde edildikleri hücreye ait nükleik asit, lipid ve proteinleri bulduran nanometre boyutlu hücre içi yerleşimli keseciklerdir [18, 19]. Mezenkimal kök hücre eksozomları, bu hücrelerin rejeneratif etki süreçlerinden sorumlu molekülleri içermeleri [20, 21], hedef hücre içine kolayca alınmaları [22, 23] ve bağışıklık yanıtı oluşturmamaları [24, 25] gen ifadesinin kontrolünü sağlarken spontan malign dönüşüm göstermemeleri nedeniyle MKH'lerin yerine tercih edilebilir [26]. Osteokondüktif kalsiyum fosfat iskeleyle emdirilmiş osteoindüktif insan kökenli uyarılmış pluripotent kök hücrelerden farklılaştırılmış MKH eksozomlarının PI3K/Akt yolağı üzerinden, kemikleşme sürecinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir [27]. Ancak kalsiyum eksik hidroksiapatitin (KEHA) kemik iliği kaynaklı MKH (Kİ-MKH)

eksozomlarına bağlandığındaki olası etkileri hakkındaki bilgiler sınırlıdır. **Varsayımımıza göre**, insan Kİ-MKH eksozomları, trikalsiyum fosfata anneksin V (AnV) proteini ile bağlanarak tasarlanan formülasyon insan fetal osteoblastların (hFOB) çoğalma ve mineralizasyonunu arttırarak kemik rejenerasyonuna katkıda bulunabilir; böylece metabolik hastalıklar ve travmalar sonucunda oluşan kemik kayıplarının tedavisinde kullanılmak için uygun bir biyomühendislik ürünü ve kişiye özel tedavi alternatifi olabilir.

**Bu tez çalışmasının amacı;** Beta-trikalsiyum fosfatın ( $\beta$ -TCP) ısı işlem öncesi formu olan KEHA'nın üretilerek, insan Kİ-MKH eksozomlarına AnV proteini ile bağlanması sonucu oluşturulan formülasyonun bağlanma karakterizasyonun analizi ve hFOB'ların çoğalma, mineralizasyon ve matriks sentezi kapasitelerine etkilerinin değerlendirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda aşağıdaki **hedefler** belirlenmiştir.

1. KEHA'nın üretilmesi ve karakterizasyonunun yapılması,
2. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının izolasyonu ve karakterize edilmesi,
3. KEHA ve insan Kİ-MKH eksozomlarının AnV aracılığı ile bağlanarak bir malzeme oluşturması, bağlanma ve salım analizlerinin gerçekleştirilmesi
4. Geliştirilen formülasyonun hFOB'ların çoğalma, mineralizasyon ve matriks sentezi potansiyellerine etkisinin değerlendirilmesi

**Tez kapsamında** belirlenen hedeflere ulaşılarak KEHA'nın üretimi ve karakterizasyonu, insan Kİ-MKH eksozomlarının izolasyonu ve karakterizasyonu sağlanmış; KEHA ve eksozomlar etkili dozlarda AnV ile bağlanarak yeni ve yüksek teknolojik bir biyomühendislik ürünü geliştirilerek karakterize edilmiş, ürünün hFOB'larda çoğalma, mineralizasyon ve matriks sentezi uyarıcı potansiyeli doz ve zaman bağımlı olarak ortaya konmuştur.

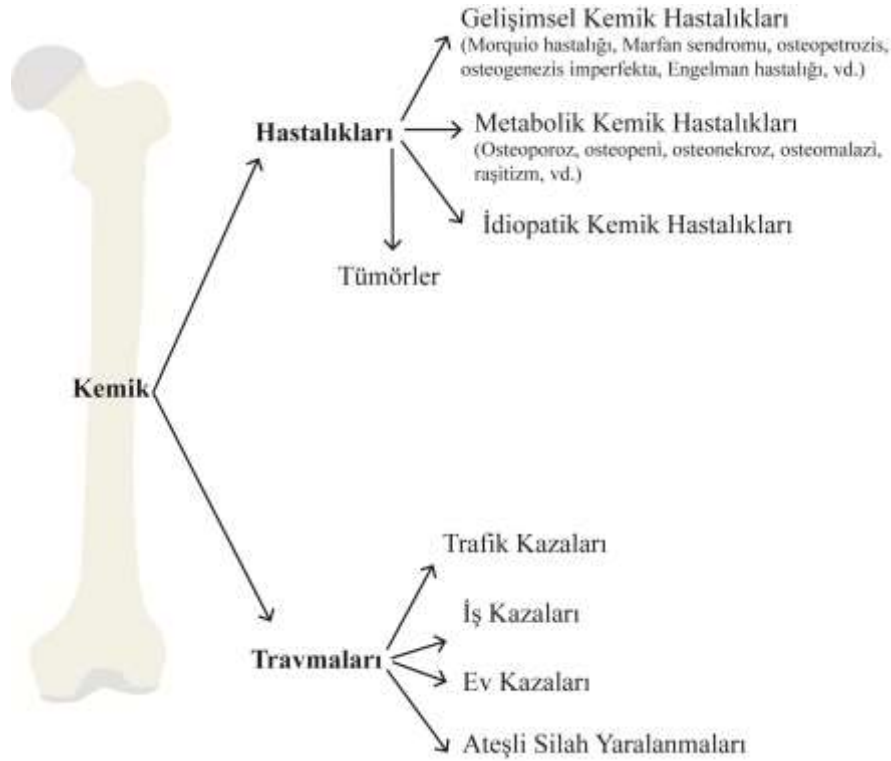
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kemik dokusunun hastalıkları ve travmaları

Kemik, damarlar ve sinirlerden zengin; osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlar ile kendini yenileyen, osteoklastlar ile yeniden yapılanan, dinamik özellikli, özelleşmiş bir bağ dokusudur [28]. Sağlıklı koşullarda kemiğin yapımı ve yıkımı belli bir denge içerisinde sürmektedir [29]. Gelişimsel, metabolik kemik hastalıkları, tümörler ve travmalar sonucu yapım yıkım dengesi aksayabilir [30]. Tez çalışması kapsamında bu sorunlara biyomühendislik yaklaşımıyla çözüm getirebilecek, kemiğin hücre ve matriks bileşenlerini beraberce içeren, yenilikçi, yüksek teknolojik bir ürün geliştirilerek *in vitro* koşullarda kemik hücre kültürlerinde doz ve zaman bağımlı etki profili araştırılmıştır. Bu kapsamda aşağıda sırasıyla problemi oluşturan kas iskelet sistemi hastalıkları ve travmaları, sağlıklı kemiğin hücre ve ekstraselüler matriks bileşenleri ve çalışmaya esas olan mezenkimal kök hücre eksozomları ile kalsiyum hidroksiapatit temelli biyoseramiklere ait gerekçeyi oluşturan bilgiler verilecektir.

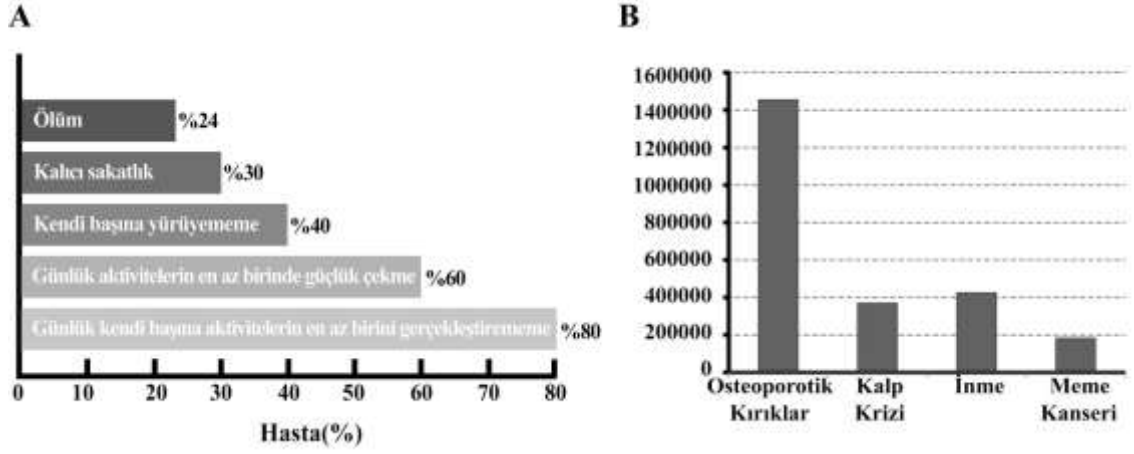
#### 2.1.1. Kemiğin travma ve hastalıkları:

Kemikte meydana gelen metabolik, idiopatik ya da gelişimsel hastalıklar veya çeşitli sebeplerle gelişen travmalar kemiğin yapısının ve dengesinin kaybına neden olur. Bu hastalık ve travma çeşitleri Şekil 2.1’de özetlenmiştir.



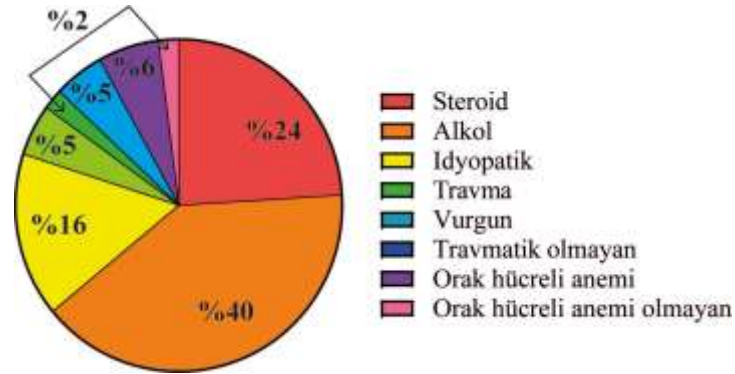
Şekil 2.1. Kemik yapısı ve yapım-yıkım dengesini bozan kemik hastalık ve travmaları özetlenmiştir. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımdan yapılmıştır.*

Yaşlanan nüfus ile artan, kemik mineral kaybıyla seyredip kırıklarla sonuçlanan osteoporoz ve travmalar dünyada en yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan ortopedik problemlerdir (Şekil 2.2-A). Fracturk çalışmasına göre 2009 yılında ülkemizde 50 yaşın üzerinde OP hastalarında 24.000 kırık olgusuna rastlandığı ve 2035’de bu sayının 64.000’e çıkmasının öngörüldüğü bildirilmiştir [31]. Her gün 25.000 adet osteoporotik ve osteopenik kemik kırığı ortaya çıktığı [32] ve ileri yaştaki OP hastalarının özellikle omurga ve kalça kırıklarının cerrahi tedavisinde yaşa bağlı tedaviye direnç, implanta bağlı komplikasyonlar gibi pek çok sorunla karşılaştığı göz önüne alındığında; OP’dan ölüm insidansı inme ve kalp krizlerine bağlı ölümlerin toplamından daha yüksek olarak değerlendirilmektedir [33] (Şekil 2.2-B). Osteoporoz, 2003 yılında Dünya Sağlık Örgütü’ nün hazırladığı rapora göre; Avrupa, ABD ve Japonya’da yaklaşık 100 milyon insanı etkilemekte ve yılda 2.3 milyon kırığa neden olmaktadır [1].



Şekil 2.2. Osteoporozun (A)morbidite ve mortalite oranları ve (B)diğer sık görülen hastalıklara göre dağılımı grafiklerle gösterilmiştir [34]. *Makaleden esinlenilerek yeniden şekillendirilmiştir. Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.*

Çeşitli nedenlerle kemik dolaşım bozuklukları sonucu oluşan osteonekroz ise (Şekil 2.3) [35], Amerika Birleşik Devletleri'nde, her yıl yaklaşık 20.000-30.000 kişi osteonekroz tanısı almakta [2] ve tüm kalça eklem replasman cerrahilerinin yaklaşık %10'unun osteonekroz nedeni olduğu bildirilmektedir[5]



Şekil 2.3. Femur başı osteonekrozunun temel sebepleri dilim grafikte özetlenmiştir [35]. *Makaleden esinlenilerek yeniden şekillendirilmiştir. Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.*

Trafikte, işte ya da evde gerçekleşen kazalar, ateşli silahlarla oluşan yaralanmalar veya diğer sebeplerle oluşan travmatik kemik hasarları sık karşılaşılan ve kemik kayıplarına kadar varabilen sağlık sorunlarıdır [36]. Bu hasarların onarımında sıklıkla otogreftler

kullanılmaktadır [36]. Ancak otogreftlerin yeterli boyutta olmaması veya otograft eldesi sonrası donör bölgede ağrı ve rahatsızlığa neden olabilmesinden dolayı çeşitli biyomühendislik ürünü alternatifler üzerinde araştırmalar yapılmaktadır.

Osteoporoz gibi metabolik kemik hastalıklarında, osteonekrozda ya da travmatik kemik hasarlarında, rejenerasyonu sağlamak için ilk aşamada konservatif tedavi yöntemlerine başvurulur. Bu yöntemler; besin takviyeleri, ilaçlar, egzersiz ve fizik tedavi yaklaşımlarını kapsamaktadır [37]. Konservatif yöntemler kemik onarımını sağlamakta yetersiz kaldığında cerrahi yöntemlerle replasman ya da restorasyon tedavileri yapılır. Bu aşamada biyolojik kökenli doku yamaları olan otogreftler, allogreftler ya da metaller, seramikler, polimerler ve bunların kompozitleri olan sentetik biyomalzemeler uygulanır [38]. Biyoseramiklerin mekanik dayanıklılıkları metaller kadar yüksek olmasa da bu malzemeler kemiğin ekstraselüler matriksindeki HAp'i modelledikleri için yük taşımayan bölgelerde tercih edilmektedir [39, 40]. Ancak biyoseramiklerin osteokondüktif etkilerinin, osteoindüktif etkili mezenkimal kök hücreler [41-43] ya da benzer etkileri yapan çeşitli ajanlar [44, 45] ile desteklenmesi gerekmektedir.

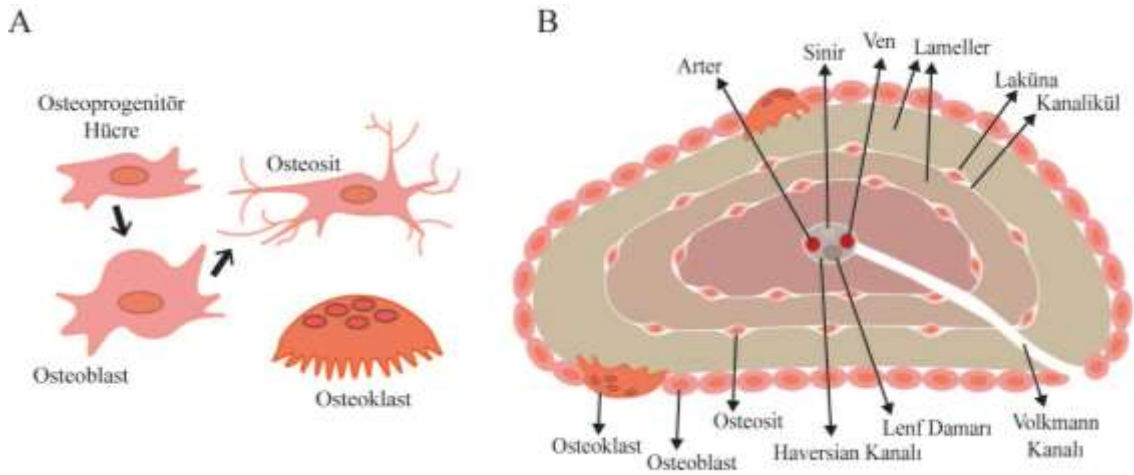
### **2.1.2. Kemiğin Histolojik Yapısı:**

Kemik, özelleşmiş, dinamik bir bağ dokusu olup; hücreler ile organik ve inorganik ekstraselüler matriks bileşenlerinden oluşur. Kemik hücreleri dört grupta incelenir [46, 47]. Bunlar kemik matriksinin yapımından sorumlu mezoderm kökenli osteoprogenitör hücreler, osteoprogenitör hücre kökenli osteoblastlar, osteoblastların olgunlaşması ile oluşan osteositler ve kemik yıkımından sorumlu, kemik iliği kökenli osteoklastlardır (Şekil 2.1-A). Kemik matriksi, organik ve inorganik bileşenlerden oluşur. Organik matriks tip 1 kollajen ağırlıklı fibril yapısındaki matriks (matriks proteinlerinin toplam ağırlığının yaklaşık %90'ı) ve fibril yapısında olmayan amorf kısımdan (proteoglikanlar ve glikoproteinler) oluşur [48]. Kemiğin fibrilli organik matriksinin temel bileşeni tip I kollajendir. Matriks, tip I kollajenin yanı sıra tip V, III, XI ve XIII kollajenleri de içerir. Kollajen olmayan proteinler toplam matriks protein ağırlığının %10'unu oluşturmaktadır ancak bu proteinler kemik gelişimi, yeniden şekillenmesi ve onarımı için oldukça önemlidir [48]. Proteoglikanlar, merkezi bir protein etrafındaki kovalent bağlı glikozaminoglikan (hyaluronan, kondroitin sülfat, keratan sülfat) yan zincirlerinden



oluşur [49]. Bu yapısal elemanların görevi, kemiğin basınç mukavemetini arttırmak, büyüme faktörlerini bağlamak ve mineralizasyonun inhibisyonudur [49]. Glikoproteinlerin (osteokalsin, osteopontin, osteonektin, siyaloproteinler) görevi ise; kemik hücrelerinin ve kollajen fiberlerin mineralize ara matrikse tutunmasını sağlamaktır [49].

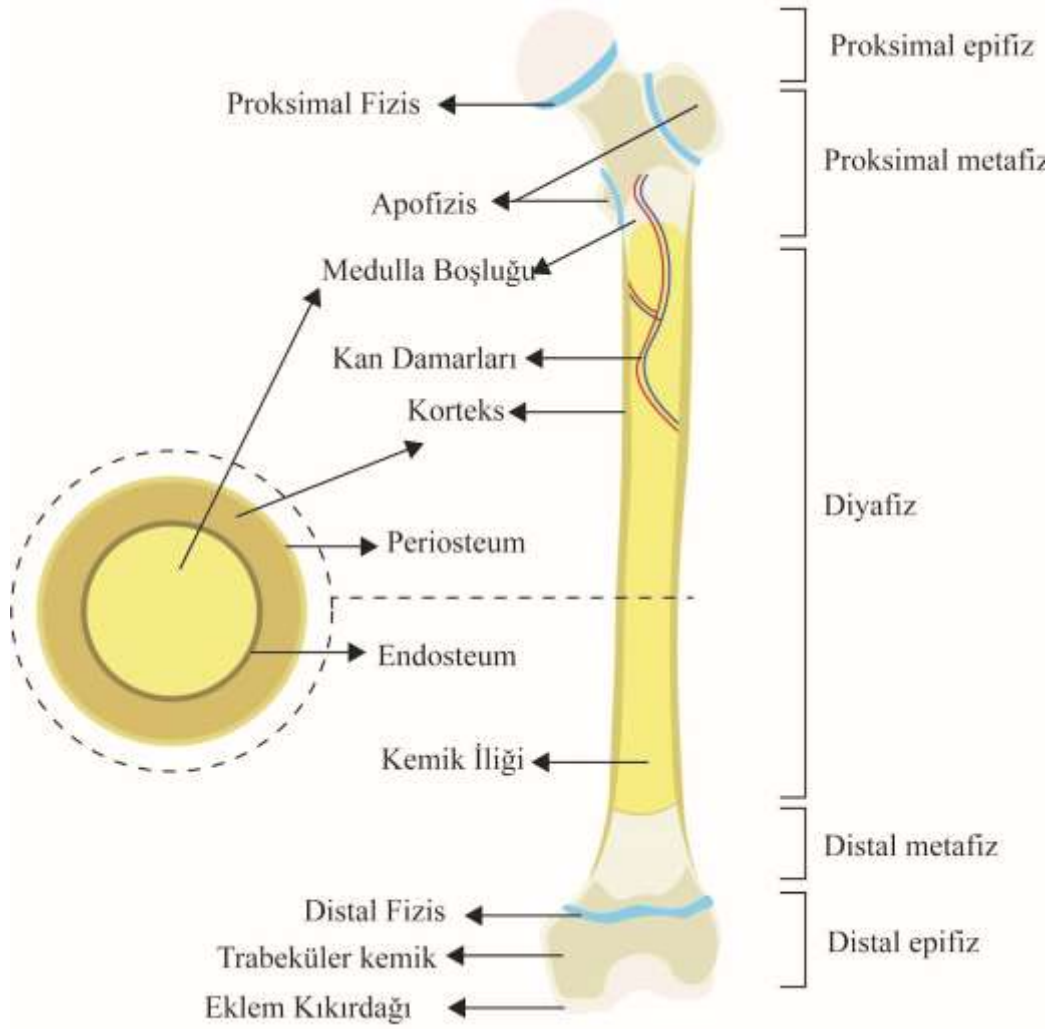
Kemik matriksi, lakünalarının içindeki osteositleri ve bu lakünaları birbirine bağlayan ve osteositlerin uzantılarının bulunduğu kanalikülleri içerir (Şekil 2.1-B). Osteositler oluklu bağlantılar (*gap junction*) sayesinde birbirleriyle iletişim halindedir [50].



Şekil 2.4. Kemik hücreleri ve kompakt kemiğin osteon yapısı görülmektedir. (A) Osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar, osteoblastların matür hali olan osteositler ve osteoklastlar şematize edilmiştir. (B) Bir osteondaki yapısal düzen şematize edilmiştir. Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımdan yapılmıştır.

Olgun kemik dokusu, kompakt (kortikal) kemik ve süngerimsi (spongiyöz, kanselöz) kemik olmak üzere iki tiptir [51]. Uzun kemik kesitlerinde kemiğin dış kısmında daha sıkı bir kompakt kemik dokusu görünürken, iç kısmı trabeküllerden oluşan süngerimsi kemik dokusu ile devam eder. Kemikler şekillerine göre, uzun kemikler, kısa kemikler, yassı kemikler ve düzensiz kemikler olmak üzere 4 alt grupta sınıflandırılmaktadır. Uzun kemiklerin gövdelerine diyafiz, uç kısımlarına ise epifiz adı verilmektedir. Epifiz ve

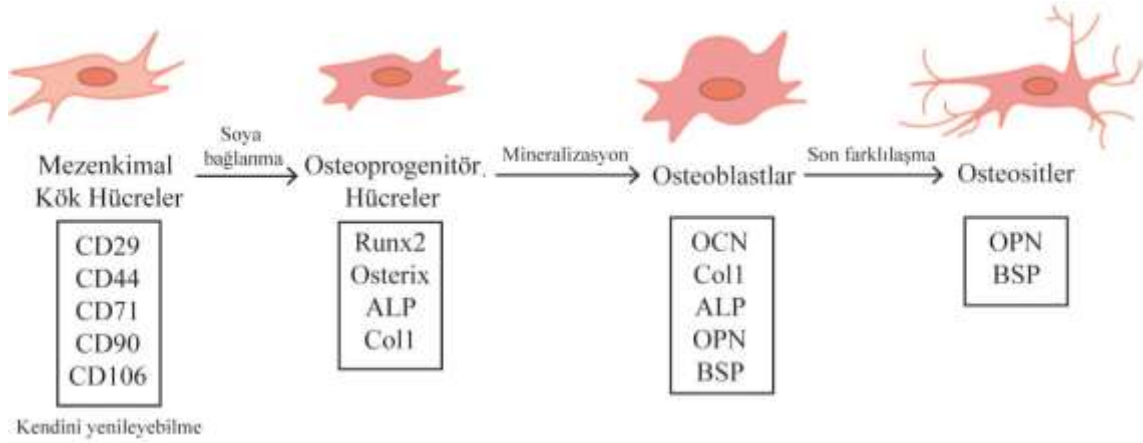
diyafiz arasında kalan boyun kısmına ise metafiz adı verilmektedir. Kemiğin orta kısmında kemik iliği boşluğu içinde kemik iliği bulunmaktadır[52]. Uzun kemiğin şematik görüntüsü Şekil 2.2 de görülmektedir.



Şekil 2.5. Uzun kemik şematize edilmiştir. Kemiğin kısımları, uzun kemiklerde trabeküler kemik ve kompakt kemiğin konumları, kan damarları ve medulla boşluğunun yanı sıra kemik kavitelerini örten bağ dokusu tabakası endosteum ve kemiği dıştan saran periosteum şekilde gösterilmektedir. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımdan yapılmıştır.*

Kemiğin matriks bileşenleri ve bunların sentez ürünlerinin pek çoğu, deneysel çalışmalarda kemikleşme belirteçleri olarak kullanılır [53, 54]. Bu belirteçler alkalin fosfat (ALP), Runx2/Cbfa1, osteonin, tip 1 kollajen, osteokalsin, osteopontin ve kemik

siyaloproteinleri (bone sialoprotein-BSP) olarak sıralanabilir[55-58]. Bu belirteçler, hücrelerin fonksiyonlarını ve farklılaşmalarını, kemik oluşumu ve iyileşme süreçlerini düzenler [59]. Kemikleşme sürecinde etkili hücreler çeşitli belirteçleri yüksek düzeyde ifade eder. Şekil 2.6’da bu belirteçler, kemikleşme evrelerine göre şematize edilmiştir.



Şekil 2.6. İntramembranöz kemikleşme sürecinde mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara ve osteositlere farklılaşmasında etkili belirteçler şematize edilmiştir. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.*

Alkalen fosfataz, hücrelerin ve matris veziküllerin dış yüzeyine bağlı, ektoenzim olarak işlev gören bir glikoproteindir [60]. Osteogenez sürecinde tanınan ilk kilit elemanlardan biri olan ALP'nin normal ve patolojik kalsifikasyondaki önemi büyüktür [61]. Mineralizasyonda inorganik fosfat (Pi) ile HAp oluşumunun bir inhibitörü olan inorganik pirofosfat (PPi) arasındaki önemli dengeyi ALP sağlamaktadır [62]. Alkalen fosfataz, Pi üretmek için PPi'yi hidrolize eder ve PPi ile Pi seviyesi arasındaki oran böylelikle korunur. Alkalen fosfataz, mineralize doku hücrelerinin fenotipini veya gelişimsel olgunluğunu değerlendirirken özellikle tercih edilmektedir [63].

Kemik matriksinin kalsifikasyonu, hücreler tarafından düzenlenir ve matriks veziküllerinin hücreler arası alana salımıyla gerçekleşir [64]. Mineralizasyonun başlaması için  $Ca^{+2}$  ve  $PO_4^{-3}$  iyonlarının normal sınırının altına düşmesi gerekmektedir [64]. Hücre dışı  $Ca^{+2}$  osteokalsin ve diğer siyaloproteinler tarafından bağlanır ve bölgesel konsantrasyon artışı sağlanır. Bu artış ile osteoblastlardan ALP salımı artar; bu durum

bölgesel olarak  $PO_4^{3-}$  iyonlarının artışını sağlamaktadır.  $PO_4^{3-}$  artışı,  $Ca^{+2}$  iyon seviyesinin daha fazla artmasını tetikler. Her iki iyonun da yüksek olduğu bu evrede osteoblastlar kemik matriksine pirofosfataz içeren matriks veziküllerini salar.  $Ca^{+2}$  birikimi yapan ve  $PO_4^{3-}$ 'leri ayıran veziküller  $CaPO_4$  kristalizasyonuna neden olur ve bu kristaller HAp kristallerinin oluşumuyla mineralizasyonu başlatır [64].

Kemik sürekli olarak kendini yıkan ve tekrar yapılandırılan (*remodelling*) dinamik bir dokudur [28]. Bununla beraber, pek çok kemik hastalığı ya da travmatik hasarda kemiğin matriks sentezi ve mineralizasyonu aksayabilir, yeniden yapılanma kapasitesi düşebilir [65]. Çocukluk ve genç erişkinlik dönemlerinde yapım yıkımdan çok daha fazlayken yetişkinlikle dengelenir. Yaşlılıkta ise yıkım yapılandırmadan daha yüksek oranda gerçekleşir. Eğer bu oran gereğinden fazla olursa osteoporoz gelişir [66]. Kas iskelet sisteminin adı geçen metabolik ya da tümoral hastalıkları ve travmalarına bağlı hasarlar toplumda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olabilir [1].

## **2.2. Kemik için kalsiyum ortofosfat temelli biyomalzemeler:**

Biyolojik sistemlerde kalsiyum ortofosfatlar, doğal (kemikler, dişler, balık mineoidleri ve bazı kabuk türleri)[67-69] ve patolojik (diş ve idrar taşı ve taşlar, aterosklerotik lezyonlar) kalsifikasyonların [70, 71] temel inorganik bileşeni olarak ortaya çıkar. Yapısal olarak, çoğunlukla zayıf kristalleşmiş stokiometrik olmayan sodyum, magnezyum ve karbonat içeren HAp (genellikle "biyolojik apatit" veya dahllite olarak adlandırılır) şeklinde oluşurlar [72].

Kemik dokusunun inorganik matriksini HAp kristalleri (ağırlıkça %50–60) oluşturmaktadır [73]. Kemik matriksinin mineralizasyonu iki aşamada gerçekleşir. Bu aşamalardan ilki, osteoblastların yüzey zarından tomurcuklanan matriks veziküllerinin içinde HAp kristallerinin oluşmasıdır. Matriks vezikülleri içinde oluşan HAp,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  formunda birikir. Kalsifikasyonun ikinci aşamasında, HAp kristalleri matriks veziküllerinin zarı aracılığıyla hücreler arası alana aktarılır. HAp'in bu aktarımı, matriks veziküllerinin dışındaki ortamda uygun kalsiyum ve fosfat konsantrasyonlarını gerektirir. HAp, matriks veziküllerinin etrafında kümeler halinde yayılır ve kollajen

fibriller arasındaki boşluğu doldurur [74, 75]. Kemığın yapısında bulunan bu HAp kristallerinin yanı sıra, cerrahi yaklaşımlarda kullanılabilen kalsiyum fosfat temelli, sentetik biyoseramikler; monokalsiyum fosfat anhidrat (MCPA)/ monohidrat (MCPM), dikalsiyum fosfat anhidrat (DCPA)/ dihidrat (DCPD), oktakalsiyum fosfat (OCP), amorf kalsiyum fosfat (ACP),  $\beta$  ve  $\alpha$  trikalsiyum fosfat ( $\beta$ -/ $\alpha$ -TCP), hidroksiapatit (HA) olarak sıralanabilir [73]. Kalsiyum fosfat bileşiklerinde; Ca/P molar oranı azaldıkça, bileşiğin pH'sı düşer ve çözünürlüğü artar. Kalsiyumun fosfata oranının 1'den düşük olduğu fazlarda, pH düşük (asidik), çözünürlük ise yüksektir [76]. İçerdikleri kalsiyum ve fosfat miktarlarına göre farklı özellikler gösteren kalsiyum fosfat fazları Çizelge 2.1'de listelenmektedir. Kimyasal olarak kararlı ve saf bileşikler için, Ca/P oranı 0.5-2.0 arasında değişmektedir.

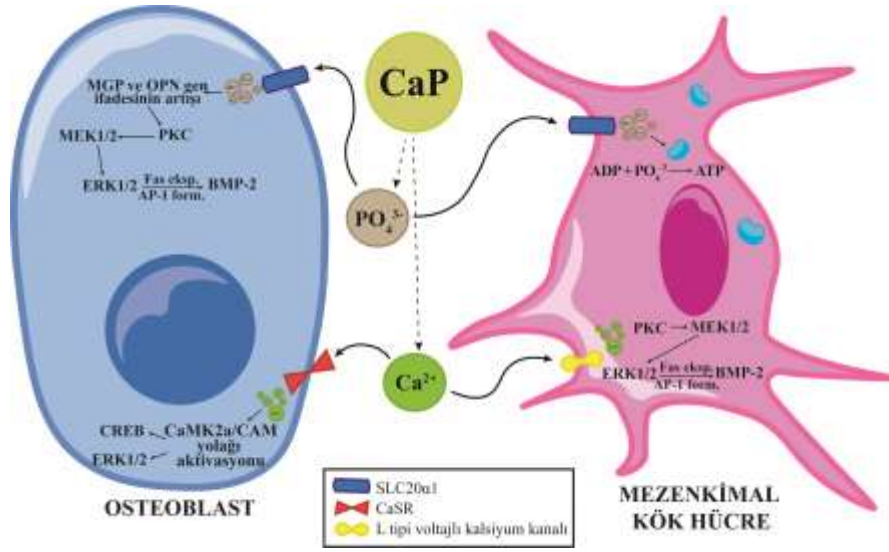
Çizelge 2.1. Kalsiyum fosfat temelli bileşikler, bunların kısaltmaları, Ca/P oranları ve kimyasal formülleri listelenmektedir.

Kalsiyum fosfat	Kısaltma	Ca/P oranı	pH-stabilite aralığı	Kimyasal Formül
Monokalsiyum fosfat anhidrat/ monohidrat	MCPA/M	0,5	0,0-2,0	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ve $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})$
Dikalsiyum fosfat anhidrat	DCP	1	2,0-5,5	$\text{CaHPO}_4$
Dikalsiyum fosfat dihidrat	DCPD	1	2,0-6,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$\beta$ -Trikalsiyum fosfat	$\beta$ - TCP	1,5	6,0-8,0	$\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
$\alpha$ -Trikalsiyum fosfat	$\alpha$ -TCP	1,5	5,2-7,8	$\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Okta-kalsiyum fosfat	OCP	1,33	5,5-7,0	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Amorf kalsiyum fosfat	ACP	1,2-2,2	~5,0-12,0	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
Hidroksiapatit	HAp	1,67	9,5-12,0	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$
Kalsiyumu eksik hidroksiapatit	KEHA	1,5-1,67	6,5-9,5	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )

**Kalsiyum eksik hidroksiapatit (KEHA)**, temel olarak bazı iyonların eksik olduğu HAp olarak tanımlanabilir. KEHA'nın kimyasal formülüne göre (Çizelge 2.1), bu bileşiğin

kristal yapısında boş  $\text{Ca}^{+2}$  bölgeleri ve  $[\text{OH}]^{-}$  bölgeleri mevcuttur. Bununla birlikte, fosfat iyonlarının boşlukları hakkında ise çok az şey bilinmektedir. Fosfat iyonlarının ya protonlanmış veya da başka iyonlarla (örneğin karbonat) yer değiştirmiş şekilde bulunduğu düşünülmektedir. KEHA'nın stokiyometrik olmayan karakteri nedeniyle safsızlıklar da içermektedir. Bu iyonların içeriği, KEHA hazırlamada kullanılan kimyasalların karşı iyonlarına bağlıdır (örneğin  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Cl}^{-}$ ). KEHA kristal yapıları belirli olmadığından birim hücre parametreleri belirsizdir.

Çözünerek  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{PO}_4^{3-}$  iyonlarına ayrılabilen kalsiyum ve fosfat temelli bileşikler hücre içine çeşitli kanallar aracılığıyla (CaSR, L tipi voltajlı Ca kanalı, SLC20 $\alpha$ 1-fosfat taşıyıcıları vs.) alınır (Şekil 2.7) ve Runx2, ERK1/2, BMP-2 gibi sinyal yollarını etkileyerek osteogenezi tetikler [77-79].



Şekil 2.7. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve osteoblastlarda kalsiyum ve fosfatın hücre içine alınma mekanizmaları gösterilmiştir. MKH: Mezenkimal kök hücre, CaP: Kalsiyum fosfat, MGP: Matiks Gla Proteini, OPN: Osteopontin, SLC20 $\alpha$ 1: Sodyum bağımlı fosfat taşıyıcı 1, CaSR: Kalsiyuma duyarlı reseptör, PKC: Protein kinaz C, BMP-2: Kemik morfojenik proteini 2, ERK1/2: Ekstrasellüler sinyallerle düzenlenen kinaz 1/2, CREB: cAMP cevap elemanı bağlama proteini, CaMK2a/CAM: Kalsiyum/ kalmodulin bağımlı protein kinaz tip II alt birim alfa. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.*

### 2.2.1. Kalsiyum fosfat bileşiklerinin biyolojik olarak bağlanma molekülleri ile modifiye edilmeleri:

Sentetik malzemelerin yüzeylerine silan eşleme (*silane couplings*) gibi kovalent bağlama [80] ya da iyonik yük etkileşimleri [81] gibi yöntemlerle peptitlerin bağlanması sayesinde modifiye edilerek, biyolojik ortamlara tutunmaları sağlanabilir. Bu peptidler aracılığıyla mezenkimal kök hücreler ve osteoblastlar yüzeye tutunur [82]. Çizelge 2.2’de kalsiyum fosfat bileşiklerinin modifikasyonlarının kemikleşmeye etkileri ile ilgili çalışmalar listelenmiştir.

Çizelge 2.2. Kalsiyum fosfat bileşikleri bağlanma molekülleri ile modifiye edildiklerinde kemikleşmedeki etkileri listelenmiştir.

Kalsiyum Fosfat	Bağlama Molekülü	Bağlanan Birim	Etki	Kaynak
Jelatin-HAp kompozit hücre İskelesi	Avidin-biyotin bağlanma sistemi	BMP-2	Kİ-MKH çoğalmasında ve ALP aktivitesinde artış, tavşan kafatası hasarında hücre iskelesi içinde yeni damarlanma ve kemik rejenerasyonunda artış	[83]
$\alpha$ -TCP granülleri	SMP	Heparin	Sıçan kritik boyutlu kafatası hasarında erken osteojenik kapasitenin artışı	[81]
$\beta$ -TCP blokları	Aptamer 74	-	2 ve 3 boyutlu çene periosteal hücreler ile yapılan kültürlerin yapışma ve çoğalmasında artış	[84]
CaP kaplı titanyum	Mineral tabaka üzerine OGP	-	Doku kaynağı belirsiz rat MKH’lerinin yapışmasında, çoğalmasında ve ALP aktivitesinde artış	[85]
$\beta$ -TCP hücre iskelesi	Hücre iskelesi üzerine BP	EGF	Üzerine ekilen Kİ-MKH’lerin çoğalmasında artış	[86]
HAp/ $\beta$ -TCP parçacıklar	MEPE	-	Yeni kemik oluşumunun desteklenmesi, kemikleşme alanının artışı	[80]

CaP/PHBV nano-kompozit mikro-küreler	Jelatin, Heparin	rhBMP-2	Mürin embriyonik MKH'lerin ALP aktivitesinde ve osteojenik gen ifadenmesinde artış	[87]
HAp diskleri	ESM kaynaklı DGEA, P15 ve GFOGER peptidleri	-	İnsan Kİ-MKH yapışması artışı, DGEA ve P15 gruplarında ALP ve OCN belirteçlerinin artışı	[88]

Önceki çalışmalarda  $\beta$ -TCP greftlere yalnızca fiziksel absorpsiyon ile eksozomların tutturulması ve etkinlik değerlendirilmesi yapılmıştır [16]. Bu çalışma kapsamında; yapısal olarak HAp'e, sergilediği özellikler bakımından ise  $\beta$ -TCP'a benzeyen KEHA partiküllerinin, kalsiyum ve eksozom membranında bulunan fosfatidilserin fosfolipidine spesifik hedef molekülü AnV ile modifiye edilerek eksozomların yüzeye daha yüksek verimle bağlanması sağlanarak salım kriterleri ve etkinlik değerlendirme çalışmaları (osteoblast canlılığı ve çoğalması, matriks oluşumu ve mineralizasyonu) incelenmiştir. KEHA'nın 750°C ve üzerindeki sıcaklıklarda sinterlenmesi sonucu saf  $\beta$ -TCP fazı elde edilmektedir. Sinterleme sonucu meydana gelen aglomerasyon sebebi ile sıvı fazda partiküllerin dispersiyonu daha kararsız olduğundan, bu çalışmada  $\beta$ -TCP'nin ısı işlem öncesi formu olan KEHA kullanılmıştır.

### 2.3. Mezenkimal kök hücreler ve mezenkimal kök hücre eksozomları:

#### 2.3.1 Kemik ve mezenkimal kök hücreler:

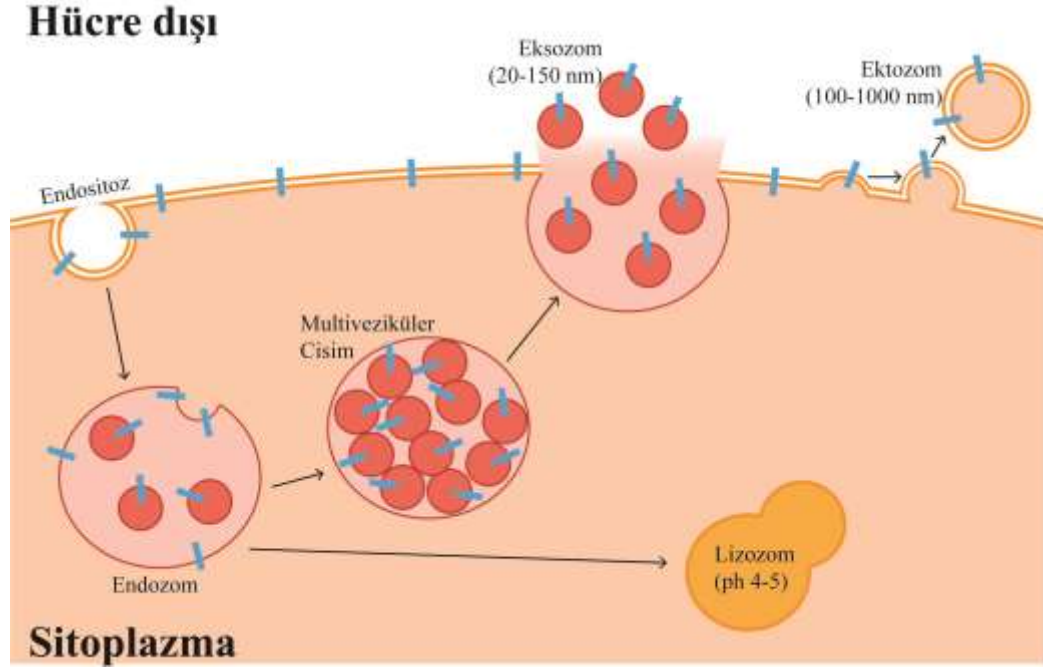
**Mezenkimal kök hücreler**, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (*The International Society for Cellular Therapy-ISCT*) tanımına göre; adipoz, kemik ya da kıkırdak gibi mezoderm kökenli en az iki hücre serisine multipotent farklılaşma özelliği gösteren, standart kültür koşullarında bulunduğu kaba yapışabilme özelliği olan, CD105, CD90, CD73 yüzey belirteçlerini ifade eden, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a ya da CD19 ve HLA-DR yüzey belirteçlerini ifade etmeyen erişkin kök hücreleridir [89]. Mezenkimal kök hücreler vücutta kemik iliği [90], göbek kordonu [91], yağ dokusu [92], diş pulpası [93] ve plasenta [94] gibi mezoderm kökenli dokulardan elde edilebilir [95]. Kemik



dokusundaki mezenkimal kökenli osteoprogenitör hücreler periosteum, endosteum ve Havers kanallarının iç yüzlerinde yer alır. Kemik hasarlarında yukarıdaki bölgelerden ve kemik iliğinden mobilize olarak hasarlı bölgeye ulaşır [96]. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, *in vivo* koşullarda; kritik boyutlu kemik hasarlarında doku iskeleleri ile beraber [15, 97] ya da bölgeye doğrudan verilerek uygulanmaktadır [98]. Mezenkimal kök hücreler, rejeneratif etkisini, hasarın olduğu bölgedeki olgun hücrelere farklılaşarak [99-102] ya da buldukları mikro çevreye parakrin olarak salgıladıkları moleküllerin etkileriyle [99, 103-105] sağlar. Mezenkimal kök hücrelerin parakrin etkilerini, eksozom adı verilen hücre içi vezikülleri toplu halde hücre dışına salarak gösterebildiği bilinmektedir [106, 107].

### **2.3.2. Kemik ve mezenkimal kök hücre eksozomları:**

**Eksozomlar**, nanometre boyutlu veziküller olarak adlandırılan, boyutları 20 ile 150 nm arasında değişen ekstraselüler veziküllerdir (EV) [108]. Endozomlardan elde edilen eksozomlar veya hücre zarından ayrılan ektozomlar heterojen, zar kaynaklı EV [23]. Ekstraselüler veziküller biyolojik sıvılarda bulunur ve çeşitli fizyolojik [109, 110] ve patolojik [111, 112] süreçlerde yer alır. Bu veziküller, hücreler arası iletişim için hücrelerin proteinleri, lipitleri ve genetik materyallerinin alışverişine izin veren mekanizmaları oluşturur [19, 108]. Endozomların gelişimi esnasında zarın kendi içine doğru çökmesi ile eksozomlar oluşur. İçinde çok sayıda nanometre boyutlu vezikül bulunduran bu oluşuma, çok kesecikli yapı anlamına gelen, multiveziküler cisim (MVC) denir. Bu çok veziküllü endozomun hücre zarı ile birleşip içeriğini dış ortama salması ile eksozomlar vücut sıvılarına yayılır [113]. Eksozomlar, endozomların zarlarının içeri kıvrılması sonucu oluştuğundan, taşıdıkları içerik, hücrenin endozom içeriğini yansıtmaktadır. Eksozomlardan çok daha büyük boyutlu olan ektozomlar ise direkt olarak hücre zarının dışa kıvrılması ile hücreden ayrılır. Eksozomlar kaynak aldıkları hücreye ait içerikleri ile, bağışıklık yanıtının düzenlenmesi [114, 115], hücreler arası iletişimin sağlanması [116, 117] ve genetik materyalin taşınması [118, 119] gibi pek çok fizyolojik işlevi yerine getirmenin yanı sıra, bozulan mikro çevrede, çeşitli hastalıkların (kanser, otoimmün hastalıklar gibi) tanısı için biyobelirteçleri içerebilir [19]. Şekil 2.8'de eksozomların oluşumları ve boyutları şematize edilmiştir.



Şekil 2.8. Endozomların, eksozomların ve ektozomların oluşum süreçleri şematik olarak gösterilmektedir. Endositoz yoluyla oluşan endozomların kendi içine kıvrılması ile eksozomları oluşturduğu, içinde eksozomları barındıran multiveziküler cismin ekzositoz ile eksozomları hücre dışına attığı görülmektedir. Şekilde görülen mavi simgeler yüzey spesifik belirteçlerini sembolize etmektedir. *Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.*

Eksozomlar, multiveziküler cisimciklerden hücreler arası matrikse salındıktan sonra hedef hücreler tarafından, çeşitli zar proteinleri aracılı endositoz yolu ile, fagositoz veya makropinositoz ile ya da doğrudan hücre zarından füzyon ile alınabilir ya da hücreye alınmadan, jukstakrin ya da çözülebilir sinyal yollarını uyararak, etki gösterir [23, 108, 120, 121]. Eksozomların taşıdıkları kargo kaynaklandıkları hücreye ve hücrenin bulunduğu koşullara göre farklılık göstermektedir. Bununla birlikte tüm eksozomların ortak olarak bazı proteinleri taşıdıkları bilinmektedir. Bunların en önemlileri de eksozom karakterizasyonu için oldukça önemli olan CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 ve CD82 tetraspanin zar proteinleri ve multiveziküler cisim oluşumunda görevli Alix ve TSG101, Rab11, HSP70 ve 90, Anneksin 1 ve 2 ile ICAM-1 proteinleridir [122].

**Mezenkimal kök hücre eksozomları**, osteoblastlar ve osteoklastlarda bulunan eksozomların içerikleri ve kemikleşmedeki etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Mezenkimal kök hücre eksozomlarının yüzey belirteçleri, miRNA ve protein içerikleri Çizelge 2.3 de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Mezenkimal kök hücre eksozomlarının içerikleri listelenmiştir.

<b>Eksozom Kaynağı</b>	<b>Yüzey belirteci</b>	<b>miRNA içeriği</b>	<b>Protein içeriği</b>
Kİ-MKH	CD9, CD63, CD81, Alix, TSG101, GTPaz'lar, anneksinler, flotillin-1, Hsp70 [123, 124]	Osteoblast farklılaşmasını attıran; let-7 [125, 126], miR-9 [127], miR-17 [128], miR-135b [129, 130], miR181a [131], miR-196a [132, 133], miR-210 [134], miR-218 [135], miR-346 [136]; Osteoblast farklılaşmasını azaltan; miR-221 [137], miR-885-5p [138], miR-10 [139], miR-23a [140], miR-23b [141], miR-338-3p [142], miR-34a [143]; OB farklılaşmasını kontrol eden; miR-199b [144], Osteoklastogenezi uyaran; miR-148a [145, 146]	Kemik onarımı ile ilgili sitokinler; MCP 1 (monosit kemotaktik protein-1), MCP 3 (monosit kemotaktik protein-3), SDF 1 (stromal hücre kaynaklı faktör-1) ve VEGF [147]
GK-MKH	-	let-7f-5p, miR-125b-5p, miR-100-5p, miR-25-3p, miR-145-5p, miR-21-5p, miR-1260b, miR-1260a, miR-199a-3p, miR-24-3p, miR-23a-3p, miR-16-5p, let-7a-5p, miR-92-3p, miR-106a-5p, miR-19b-3p, [148, 149] miR-17-5p [150]	PDGF, EGF, bFGF, TGF- $\beta$ 2/3, VEGF, ve [151], IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-8, IL-2, , IL-10 ve GM-CSF [152, 153]
Y-MKH	HSP70, CD63 ve CD9, CD81, TSG101 [154]	miR-10a-5p, miR-191-5p, miR-486-5p, let-7a-5p, miR-222-3p, miR-10b-5p, miR-22-3p, miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-127-3p, miR-99b-5p, miR-92a-3p, let-7f-5p, miR-92b-3p, miR-26a-5p, miR-143-3p, miR-4485, miR-146b-5p, miR-151a-3p olarak sıralanabilir [155]	HGF, granülosit ve makrofaj koloni stimüle edici faktörler, IL6, IL7, IL8, IL11, TNF- $\alpha$ , VEGF, BDNF, NGF, adiponektin, anjiyotensin, katepsinD, CXCL12 [156]

S-MKH	CD44, CD73, CD90, CD166, TSG101 [157]	miR-126-3p [158]	-
PI-KH- MKH	CD9, CD63, CD81[159], CD29, CD44, CD73, CD90 [157].	-	-

Osteoblast ve kemik iliği kaynaklı kök hücre eksozomlarının osteogenezi, osteoblast çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklerken, kemik mineral yoğunluğunu da arttırdığı raporlanmıştır [138, 147, 160-164]. Osteoklast eksozomlarının osteoblast etkinliğini durdurarak kemik yapımını düzenlediği. Çizelge 2.4’de kemik onarımı çalışmalarında kullanılan osteoblast, osteoklast ve Kİ-MKH eksozomların içerikleri ile hangi etkilerde buldukları listelenmiştir.

Çizelge 2.4. Kemik hücreleri ve mezenkimal kök hücrelerin içerdiği, kemik onarımında etkili moleküller listelenmiştir.

Eksozom Kaynağı	İçerik	Etki
Osteoblast	SMURF1, BMPR1, LRP6, TGFBR3 ve EFNB1 proteinleri [160]	Osteogenez, osteoblast çoğalması, farklılaşması, kemik mineralizasyonu
Osteoklast	RANK, RANKL, ephrinA2, semaforin 4D, miRN -146a ve miRNA-214-3p [165]	Kemik yeniden modellenmesi
	miRNA-214 [166, 167]	Osterix ve ATF4 ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesi, Osteoblastik kemik oluşumunun inhibisyonu
	semaforin 4D [168]	Hedef hücre osteoblastlara bağlanma

Kİ-MKH	miR-196a, miR-7a ve miR-206 [161]	Osteogenez için kritik, hücredeki kalsiyum birikimlerine olumlu etkiler
	MCP-1/-3 ve SF-1 sitokinleri [147]	Kemik kırıklarının iyileşmesi, anjiyogenez, osteojenik farklılaşma
	BMP-9, TGFβ1, Runx-2, OPN, OCN, BMP-2, Osteriks [162]	Osteojenik farklılaşma, osteogenez indüksiyonu
	Wnt, MAPK TGF-β, PPAR ve BMP sinyal yollarında görevli proteinler [163]	Osteojenik farklılaşma, kemik iyileşmesi
	miR-218, miR-135b, miR-199b, miR-299 5p, miR-148a, miR-20, miR-219, let-7a, ve miR-302b [138]	Osteojenik farklılaşma
	Let-7a, miR-18 [164]	Adipojenik farklılaşmanın engellenmesi, osteojenik farklılaşma

Mezenkimal kök hücre eksozomları, bu hücrelerin rejeneratif etki süreçlerinden sorumlu molekülleri içermeleri [20, 21], hedef hücre içine kolayca alınmaları [22, 23] ve immün yanıt oluşturmamaları [24, 25] nedeniyle, kemik rejenerasyonunu hedefleyen çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca eksozomlar, taşıdıkları moleküller sayesinde transkripsiyonun düzenlenmesi, gen ifadesinin kontrolünü sağlayabilmeleri ve çekirdek içermediklerinden, spontan malign transformasyona uğramamaları nedeniyle MKH'lerin yerine tercih edilmektedir [26]. Diğer yandan osteoindüktif etkilerine rağmen eksozomlar, hasarlı bölgeye mineral desteği sağlayamayabilir.

#### **2.4. Eksozom zarına spesifik bağlanabilen moleküller ve Anneksin V**

Çeşitli moleküller eksozomların zarında bulunan protein ya da lipidlere bağlanarak bu yapıların belirli yüzeylere tutunmaları, bazı molekülleri taşıyabilmeleri ya da ışık mikroskopunda görünür olmaları sağlanabilir [169] (Çizelge 2.5).

### 2.4.1. Eksozom zarına spesifik bağlanabilen moleküller

Miristile edilmiş alanından zengin C kinaz efektör ucu (MARCKS-ED) lizinden zengin bir peptiddir [170]. Lizin açısından zengin motifler, zardaki fosfatidilserini algılayabilen proteinlerin ortak bir özelliğidir [171]. MARCKS-ED ve diğer MARCKS'den türetilmiş peptidlerin, negatif kurvatür indükleyicileri yerine pozitif kurvatür sensörleri olma avantajına sahip olduğu, potansiyel olarak endositozun uyarılması ile ilişkili komplikasyonları önlediği bildirilmiştir [170, 172].

Peptid CP05 aminoasit yapılı bir polimerdir. Bu molekülün, eksozomları tedavi ya da teşhis amaçlı hedeflenmesi, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi için eksozomlara çeşitli içeriklerin yüklemesini sağladığı bildirilmiştir [169, 173]. CP05, ortak eksozom yüzey proteini CD63'e bağlanarak çeşitli hücreler ait eksozomların yakalanmasını sağlayabilmektedir [174]. CP05 peptidinin eksozomlara bağlanmasının, eksozomların özellikleri ve *in vivo* dağılımlarını değiştirmedeği görülmüştür [174]. Bu peptidin eksozom yüzeyini modifiye ederek, eksozomları hedefleme mekanizması olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [169, 173].

Heparin bağlı epidermal büyüme faktörü peptid yapıda olup, bu molekülün hücre zarına bağlanabilen formu (proHB-EGF) juksta-membran, transmembran ve sitoplazmik bölgelerden oluşan 208 aminoasitlik bir transmembran proteini olarak sentezlenmektedir [175]. ProHB-EGF'nin, hücre yüzeyinde CD9 ve integrin  $\alpha 3\beta 1$  ile bir kompleks oluşturduğu bilinmektedir [176]. CD9'un proHB-EGF transkripsiyonunu arttırmadığı ve hücre yüzeyindeki proHB-EGF moleküllerinin sayısını etkilemediği gösterilmiştir [176]. Ancak eksozom zarında bulunan CD9 tetraspanini ile kompleks oluşturabilen bu proteinin eksozomlarla beraber kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

### 2.4.2. Anneksin V yapısı ve işlevi

Anneksinler, homolog yapıda, iç kısmında tekrarlı tetrad yapısı gösteren, zarı bağlayıcı bir proteinler ailesini işaret eder [177]. Bu protein ailesinin tüm üyeleri yapısal olarak, benzer üç boyutlu yapı gösteren yaklaşık 70 amino asitten oluşan dört (anneksin A6'da sekiz) homolog bölgeden oluşan yüksek oranda korunmuş bir çekirdeğe ve bu tekrarlanan alanların ortasında yerleşik bir deliğe sahiptir [178]. Her bir bölgede korunaklı 17 amino asit kalıntısından oluşan bir dizi bulunur [177]. Anneksin ailesinin üyeleri,  $Ca^{2+}$  iyonlarının varlığında negatif yüklü fosfolipitlere bağlanabilir [179]. Anneksinler,  $Ca^{2+}$

aracılı ekzositoz [180, 181], endositoz ile [182], kalsiyum kanal aktivitesi ve sinyal iletiminde [183] ve organel ve hücre zarının spesifik alanlarının stabilizasyonunda rol oynar [182, 184]. Bununla birlikte, bu proteinlerden bazıları çekirdeğe göç edebilir ya da ESM'ye salınabilir [177]. Pıhtılaşma [171] ya da inflamasyon gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin önemli düzenleyicileri olarak hareket edebilirler [177].

Anneksin V, bu ailenin kristalizasyon yöntemiyle edilen ve X-RD ile incelenen ilk üyesidir [178, 185]. Anneksin V hücre içi ve hücre dışında bulunabilmektedir ve fosfatidilserin içeren zarlara çok yüksek afinite ile bağlanır [186]. Apoptozun indüksiyon aşamasında, fosfatidilserin (PS) hücre zarının iç tabakasından dış tabakasına geçer ve bu aşamada AnV-PS bağlanması gerçekleşir [187]. Florokromlarla konjüğe AnV, apoptozun floresan mikroskobu ile ya da gerçek zamanlı görüntülenmesine izin verir [188]. Floresan mikroskobu dışında apoptoz ışık ve elektron mikroskobu ile ve akış sitometrisi ile de tespit edilebilir. Bu nedenle apoptotik süreçlerin takibinde bu yöntemler ile sıklıkla görüntülenir [189]. AnV veya oto antikorları ile önemli bozukluklar arasında ilişki olduğu için, AnV'in fizyolojik rolü günümüzde kapsamlı olarak araştırılmaktadır [190-192]. Anneksin V gerekli koşullarda  $Ca^{2+}$  kanalı gibi davranabilir [179], aynı zamanda zarı zara ve zarı hücre iskeleti bileşenlerine bağlayabilir [182, 184]. Anneksin V'in iki malzemeyi birbirine bağlamak için kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Çizelge 2.5. Eksozom zarında bulunan olası tutunma bölgelerine göre bağlayıcı moleküller listelenmiştir.

<b>Bağlayıcı Molekül</b>	<b>Tutunma Bölgesi</b>
AnV [193]	PS
MARCKS-ED (ED residüleri 151–175) [170-172]	
CP05 peptid [174]	CD63
proHB-EGF [175, 176]	CD9

Yukarıda incelenen eksozom zarı modifikasyonu olan ya da olası zar modifikasyonunu işaret eden çalışmalarında sadece eksozomların zarı hedef alınmakta modifikasyonun amacına göre tek taraflı bir bağlanma söz konusudur. Bu tez çalışmasında uygulanması

planlanan AnV'in  $Ca^{+2}$  varlığında fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlandığı bilinmektedir [186]. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin  $Ca^{+2}$  bağlanma bölgeleri olduğundan, hedef, AnV'in KEHA'nın kalsiyum bölgesine eksozom zarındaki fosfatidilserine aynı zamanda tutunarak iki molekül arasında köprü oluşturmaktır. Bu tez çalışmasında ilk kez kemikte osteoindüktif ve osteokondüktif potansiyeli artırmak amacıyla KEHA ile insan Kİ-MKH eksozomları AnV ile bağlanarak *in vitro* koşullarda osteoblastların çoğalması ve matris sentezini uyarmak üzere etkili miktarlarıyla bir araya getirilmiştir.

Yukarıdaki genel bilgiler doğrultusunda, tez kapsamında; (1)  $\beta$ -TCP'nin ısı işlem öncesi formu olan KEHA uygun özelliklerde üretilebilir mi? (2) İnsan Kİ-MKH'lerinden uygun özelliklerde eksozom izole edilebilir mi? (3) Üretilen KEHA'ya AnV ile insan Kİ-MKH eksozomları bağlanabilir, yeni bir biyomalzeme formülasyonu üretilebilir mi? ve (4) Elde edilen biyomalzemenin osteoblastların çoğalma ve mineralizasyonuna olumlu etkisi var mıdır? sorularına cevap verilmiştir.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

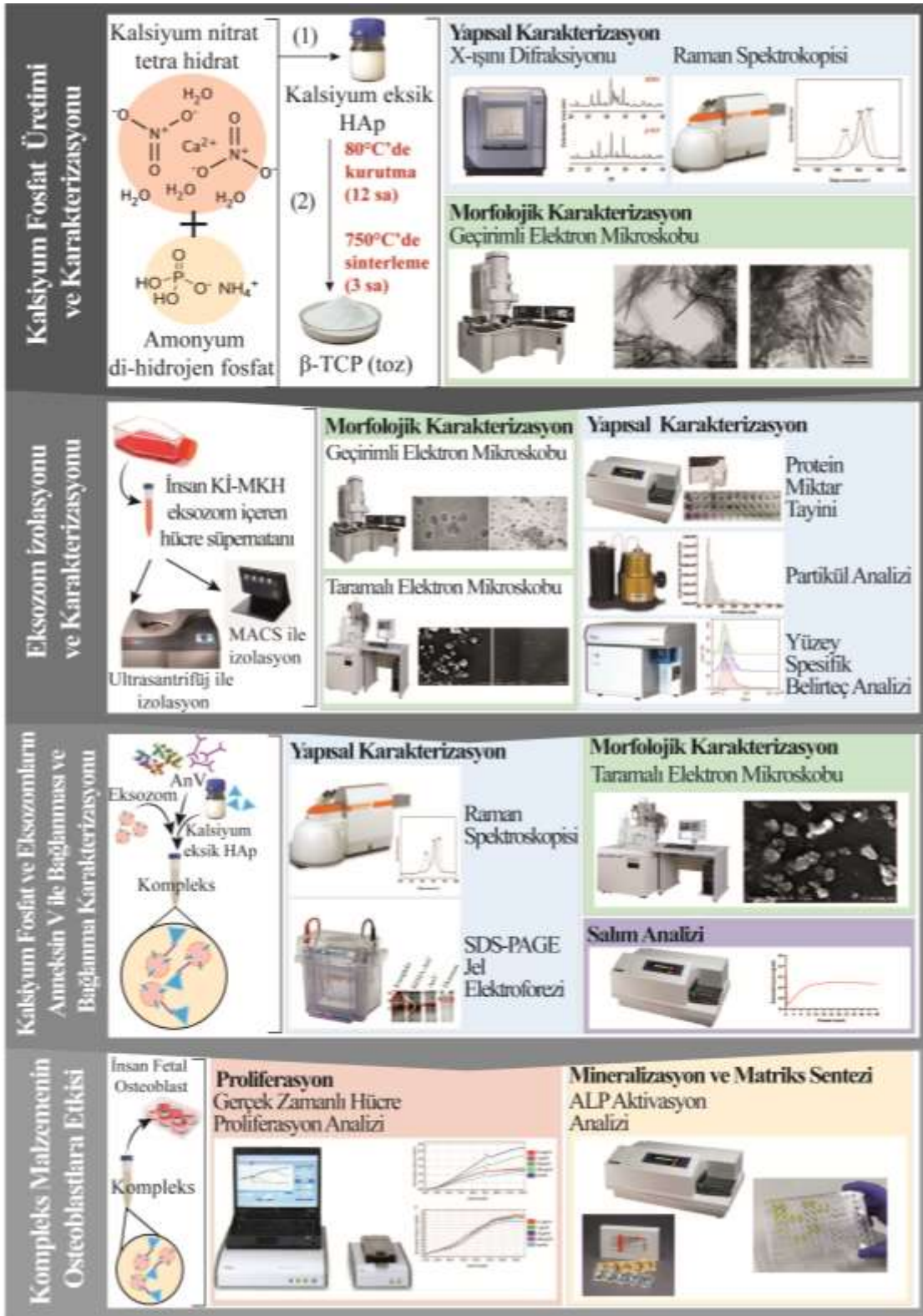
#### 3.1. Deneysel Tasarımı:

Tez deneyleri *in vitro* koşullarda deney ve kontrol grupları içeren gözlemsel, multidisipliner, rastgele seçilmiş ve ileriye yönelik olarak planlanmıştır. Deneydeki bağımsız değişkenler, gruplar ve zaman; bağımlı değişkenler, çoğalma ve mineralizasyon verileridir. Gruplara ait tekrar sayıları (n), zaman ve bağımsız değişkenler Çizelge 3.1’de özetlenmiştir. Gruplara ait tekrar sayıları güç analizi (çift yönlü varyans analizi) ile belirlenmiştir. Buna göre, tüm iş paketleri için 8 tekrar 2 set olarak deney planlanmıştır. Etki boyutu %80, hata payı %5 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Bağımlı ve bağımsız değişkenleri gösteren deney planı. Deney ve kontrol gruplarıyla gerçekleştirilen iş paketlerindeki tekrar (n) sayıları gösterilmektedir. AnV: Anneksin V, KEHA: Kalsiyum eksik hidroksiapatit.

Bağımsız değişkenler	Gruplar	Kontrol (besiyeri)		KEHA		AnV		Eksozom		KEHA-AnV-Eksozom	
	Zaman (gün)	3	7	3	7	3	7	3	7	3	7
Bağımlı değişkenler	Gerçek zamanlı çoğalma (n)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	ALP aktivitesi (n)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Bu tez, Biyomühendislik Anabilim Dalı Doktora Programı bünyesinde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na ait laboratuvar altyapısı ve teknik donanımına ek olarak Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi ve Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi altyapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha önce bahsedilen araştırma sorularını yanıtlamak amacıyla aşağıdaki iş paketleri tamamlanmıştır sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasının iş akışı şematize edilmiştir. Tez içeriğindeki tüm şema ve şekiller tarafımda yapılmıştır.

## 3.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin üretilmesi ve karakterizasyonu

### 3.2.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit (KEHA) üretimi:

KEHA sentezinde kimyasal çöktürme yöntemi tercih edilmiştir. Bu amaçla kullanılan başlangıç çözeltileri;

- Kalsiyum: kalsiyum nitrat tetrahidrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) çözeltisi,  $\text{pH} \approx 5.5$
- Fosfor: amonyum di-hidrojen fosfat ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) çözeltisi,  $\text{pH} \approx 5.5$

Her iki çözeltinin hazırlanmasında yüksek saflıktaki başlangıç bileşenleri (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Başlangıç çözeltilerinin hazırlanmasında  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 'lik saf su kullanılmıştır. KEHA üretimi için Ca/P oranı 1.55'dir. Başlangıç çözeltilerinin pH'sının ayarlanmasında amonyak (%32, Merck, ABD) çözeltisi kullanılmaktadır. Reaksiyon,  $45^\circ\text{C}$ 'de karıştırılmakta olan fosfor başlangıç çözeltisine, kalsiyum başlangıç çözeltisinin peristaltik pompa ile kontrollü bir şekilde damla damla ilave edilmesiyle gerçekleşmiştir. Çözeltiler karıştırıldıktan sonra oluşan jel oda sıcaklığında 24 sa yaşlandırılmaya bırakılmıştır. Yaşlandırma süresi sonunda santrifüjleme işlemi takiben birkaç defa saf su ile yıkama yapılarak reaksiyon ortamından kalan safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen KEHA partikülleri hücre kültüründe kullanıma uygun saf su (Double processed tissue culture water- Sigma-Aldrich, ABD) içerisinde süspansiyon olarak muhafaza edilmiştir.

$\beta$ -TCP fazı asidik susuz dikalsiyum fosfatın CaO gibi bir bazla katı hal reaksiyonu ile veya ıslak kimyasal metotlarla elde edilebilir.  $\beta$ -TCP yüksek sıcaklık fazı olduğundan sıvı fazda doğrudan elde edilemez, ancak stokiyometrik olmayan ve Ca/P oranı 1.33 ila 1.65 arasında değişen KEHA'dan ısıl işlem sonrası elde edilebilir. Eşitlik 1'e göre stokiyometrik olmayan apatitin HAp ve  $\beta$ -TCP'ye dönüşüm reaksiyonu verilmektedir:



Birinci denklemde  $x=1$  ve Ca/P oranı 1.5 olduğunda elde edilen apatit, KEHA olarak adlandırılmakta olup kimyasal olarak  $\beta$ -TCP fazına benzemektedir. Isıl işlem sonrası

KEHA'dan saf  $\beta$ -TCP fazı elde edilebilmektedir. Bu amaçla sentezlenen KEHA partiküllerinden kurutma sonrası  $\beta$ -TCP fazının elde edildiğinin gösterilebilmesi için ısı işlem uygulanmıştır. Oluşan partiküller öncelikle 80°C'de 12 sa kurutulmuştur. Daha sonra ise sinterlenmiştir. Burada dikkat edilen husus, kimyasal dönüşümün gerçekleştiği fakat morfolojik olarak partikül farklılaşmasına sebep olmayan ısı işlem parametrelerinin optimize edilmesidir. Bu amaçla kurutma ile elde edilen partiküller ilgili literatürde öngörüldüğü üzere 750°C'de 3 sa sinterlenmiştir.

### **3.2.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin karakterizasyonu:**

Elde edilen KEHA ve  $\beta$ -TCP nanopartiküllerinin yapısını belirlemek için X-ışını difraksiyonu (*X-ray Diffraction- XRD*) ve Raman Spektroskopisi teknikleri kullanılmış, partiküllerin morfolojisini belirlemek için ise Geçirimli Elektron Mikroskobu (*Transmission Electron Microscopy- TEM*) kullanılmıştır.

#### **3.2.2.1. X-ışını difraksiyonu ile kalsiyum eksik hidroksiapatitin yapısal karakterizasyonu:**

Bir maddenin kristal yapısını incelemek için X ışını kırınımı tekniğinden yararlanılmaktadır. Bu metot, oldukça kısa dalga boyuna olan elektromanyetik dalgalardan oluşan X-ışınları demetinin analizi yapılacak olan örnekler gönderilerek kristallerin atomlarına çarptırılması sonucu yansıtılması esasına dayanmaktadır. Bir başka deyişle kristalografide X ışınları sayesinde yapılan yapısal analizde, atom ve moleküllerin uzaydaki üç boyutlu dizilimlerini incelenmektedir. Analiz için Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesinde bulunan X-Işını Difraktometresi (D2 PhaserX-RD, Bruker, ABD) kullanılmıştır. Adım tarama modunda  $\text{CuK}\alpha$  radyasyonu kullanılarak 30 kV'luk bir tüp voltajı ve 10 mA'lık bir tüp akımı ile gerçekleştirilmiştir. Tarama için adım boyutu 0,02 ° ve tarama hızı 1 sn/adım olarak seçilmiştir. Pik genişlemesine bağlı olarak, örneklerin ortalama kristalit boyutu (D), sırasıyla HAp ve  $\beta$ -TCP'ye karşılık gelen (002) ve (0210) yansımaları kullanılarak Scherrer denklemi uyarınca DIFFRAC.EVA yazılımı (Bruker, AXS GmbH, Almanya) ile hesaplanmıştır:

$$D_{hkl} = \frac{0.94\lambda}{(\cos\theta)B_{hkl}}$$

Burada  $B_{hkl}$ ; radyan cinsinden pikin yarı yüksekliğindeki genişliği,  $\lambda$ ;  $\text{CuK}\alpha$  radyasyonunun dalga boyu (1.5406 Å),  $k$ ; 0.94'e karşılık gelen şekil faktörüdür ve  $\theta$  ise incelenen pikin gelen yansıma düzleminin kırınım açısıdır. Kristallik derecesi ( $X_c$ ) ise, bir numunenin incelenen hacmindeki kristal faz yüzdesine karşılık gelmektedir. D'ye benzer şekilde,  $X_c$  de, karşılık gelen bir yansımanın genişliğinden yine DIFFRAC.EVA yazılımıyla hesaplanabilir:

$$X_c = \frac{kA}{B_{hkl}}^3$$

Burada  $X_c$ ; kristallik derecesi,  $B_{hkl}$ ; derece cinsinden pikin yarı yüksekliğindeki genişliği ve “ $kA$ ” ise sabit olup değeri 0.24'tür [194].

### **3.2.2.2.Raman Spektroskopisi ile kalsiyum eksik hidroksiapatitin yapısal karakterizasyonu:**

Raman Spektroskopisi analizlerinde Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan, 532 nm yeşil lazer eklentisine sahip Raman (InVia, Reinshaw, BK) cihazı kullanılmıştır. Raman analizi ile HAp ve  $\beta$ -TCP fazlarındaki farklı titreşim modları sayesinde, KEHA'dan  $\beta$ -TCP fazının oluşumunun erken aşamalarının daha iyi bir değerlendirmesini elde edilebilmektedir. Her iki faz için de  $(\text{PO}_4)^{3-}$  grup modları hâkim olduğundan, örneklerin Raman spektrumları, özellikle  $(\text{PO}_4)^{3-}$  modları dikkate alınarak değerlendirilmiştir.  $\beta$ -TCP birim hücrede 42  $(\text{PO}_4)^{3-}$  tetrahedra'ya sahipken, HAp birim hücresi yalnızca altı  $(\text{PO}_4)^{3-}$  tetrahedra içerir [194].

### **3.2.2.3. Geçirimli elektron mikroskobu ile kalsiyum eksik hidroksiapatitin morfolojik karakterizasyonu:**

Kalsiyum eksik hidroksiapatit morfolojik karakterizasyonu için gerçekleştirilen TEM analizlerinde Eskişehir Teknik Üniversitesi'nde bulunan yüksek çözünürlüklü TEM

(JEM-2100F UHR7HRP, JEOL, Japonya) cihazı kullanılmıştır. Analizi için, numuneler ultrasonik olarak etanol içinde süspansiyon edildikten sonra TEM gridine (Pelco Net Mesh™ Cu grid, Ted Pella, ABD) damlatılarak kurumaya bırakılmıştır.

### **3.3. İnsan kemik iliği kaynaklı ticari mezenkimal kök hücrelerden eksozomların eldesi ve karakterize edilmesi**

#### **3.3.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu:**

Ticari hücre hattı olarak satın alınan insan Kİ-MKH (ATCC, ABD) uygun koşullarda dondurulmuş olarak temin edilmiştir. Dondurma tüpünde bulunan hücreler 37°C'de su banyosunda çözülene kadar bekletilmiş, büyüme besiyeri (MEM- $\alpha$  (Lonza, İsviçre), %20 fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher, ABD), %1 penisilin/streptomisin (P/S) (Lonza, İsviçre), %1 L-glutamin (Lonza, İsviçre)) ile 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktararak 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Dondurma besiyeri içeren süpernatant hücrelerden uzaklaştırılmış, pellet 10 ml büyüme besiyerinde çözülmüştür. Hücre miktarı, hemositometrik hücre sayımı yöntemi ile yapılmıştır. Sayım sonrasında hücreler yoğunluklarına göre 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü kaplarına ekilerek, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübe edilmiş, 2-3 günde bir büyüme besiyerleri yenilenmiştir. Kültürleri yapılan mezenkimal kök hücreler ışık mikroskobu altında incelenerek, ~%80 yoğunluğa ulaştığı tespit edildikten sonra hücrelerin mezenkimal kök hücre karakteristik özelliklerini taşıdığı teyit edilmiştir. Karakterizasyon 5. pasaj hücrelerde gerçekleştirilmiş, tez kapsamındaki diğer deneylerde de bu pasaj kullanılmıştır.

##### **3.3.1.1. Morfolojik Değerlendirme:**

İnsan Kİ-MKH'lerin kültür sırasında buldukları kültür kabına yapışma ve hücre kültürü gerçekleştirildiği sırada hücrelerin, invert ışık mikroskobu altında plastik hücre kültür kabı yüzeyine yapışabilmeleri ve MKH'nin karakteristik özelliği olan poligonal, iğsi morfoloji göstermeleri değerlendirilmiştir.

### 3.3.1.2.Yüzey Antijenik Özelliklerin Belirlenmesi:

Çoğaltılan MKH'lerin karakteristik CD44 ve CD90 yüzey belirteçlerini eksprese edip CD38, CD45 yüzey belirteçlerini eksprese etmediklerinin değerlendirilmesi için enzimatik olarak birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmıştır. Bunun için her bir T75 kültür kabına 5ml %0,25'lik Tripsin-EDTA (Lonza, İsviçre) çözeltisi eklenmiş ve 5 dk boyunca 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarını sağlayan inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında MKH'lerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrıldıkları ışık mikroskopundan da görüldükten sonra tripsin aktivitesini durdurmak için FBS içeren büyüme besiyeri eklenmiştir. Besiyeri eklenen hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Pellet homojenize edilerek hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı, hücre süspansiyonu ile tripan mavisi boyasının oranı 1:1 olacak şekilde sulandırılarak yapılmıştır. Hücre sayımı sonrasında her bir FACS tüpünde 2x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde 2 ml PBS ile konulmuştur ve tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenme sonunda oluşan pellet homojenize edilerek üzerine 100 µl PBS/BSA/Na Azide (PBN) ve Çizelge 3.2'de gösterilen her bir antikordan 5 µl olacak şekilde eklenerek +4°C'de, karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübe edilen hücreler 20 dakika sonunda 2 kere PBN ile yıkanmıştır. Yıkama aşamasından sonra 200 µl PBN eklenerek *Aria 2 FACS* (BD Biosciences, ABD) cihazı ile okutulmuştur. İşaretlenen hücrelerin yüzey belirteçleri için 15.000 olgu ile okuması yapılarak değerlendirme yapılmıştır. Bu çalışma *FacsDiva* yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 Deneyde kullanılan antikorlar ve izotip kontrolleri tabloda özetlenmiştir.

Antikor/İzotip Kontrol	Florokrom
Fare anti insan CD44 / IgG <sub>1</sub> (BD Biosciences, ABD)	FITC
Fare anti insan CD45 / IgG <sub>1</sub> (BD Biosciences, ABD)	FITC
Fare anti insan CD29 / IgG <sub>1</sub> (BD Biosciences, ABD)	APC
Fare anti insan CD38 / IgG <sub>1</sub> (BD Biosciences, ABD)	PE

### 3.3.1.3.Osteojenik ve Kondrojenik Farklılaşma:

İnsan Kİ-MKH'lerinin osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelleri değerlendirilmiştir.

**Osteojenik farklılaşma için;** hücreler 24 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyucuk başına  $15 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 12 kuyucuğa ekilmiş ve %80 yoğunluk oranına ulaşana kadar 2 günde 1 kere olacak şekilde eski besiyerleri atılarak taze besiyeri eklenmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler 0.5 ml PBS ile yıkanarak 6 kuyucuğuna %10 FBS (Gibco, Thermo Fisher, ABD), 100 nM deksametazon (Sigma-Aldrich, ABD), 10 mM  $\beta$ -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, ABD) ve 0.2 mM L-askorbik asit (L-AA) (Merck Millipore, ABD) içeren osteojenik farklılaştırma besiyeri ve 6 kuyucuğuna %10 FBS (Gibco, Thermo Fisher, ABD), %1 P/S (Lonza, İsviçre) ve %1 L-glutamin (Lonza, İsviçre) eklenen DMEM-LG (Lonza, İsviçre) besiyeri koyulmuştur. Besiyerleri 3 günde 1 kere olacak şekilde taze besiyeri ile değiştirilmiştir ve 21. günün sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırılarak 0.5 ml PBS (Lonza, İsviçre) ile yıkanmıştır. Osteojenik farklılaştırma değerlendirmesi hücre içi ALP aktivitesinin ölçümü kantitatif olarak yapılmıştır; yıkanan kuyucuklara üreticinin talimatları doğrultusunda 0.5 ml SIGMAFAST pNPP (*p-Nitrophenyl phosphate*) substrat (Sigma-Aldrich, ABD) solüsyonu eklenmiştir. Solüsyon eklenen kültür kabı folyo ile kaplanarak karanlık bir ortam sağlanmıştır, 30 dakika  $37^\circ\text{C}$  ve %5 oranında  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde bekletilmiştir. Otuz dakika sonunda kültür kabı inkübatörden alınarak her bir kuyucuktan 200  $\mu\text{l}$  çekilerek 96 kuyucuklu kültür kabına karanlık ortamda koyulmuştur ve 96 kuyucuklu kültür kabı ELISA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutulmuştur.

**Kondrojenik farklılaştırma için;** yeterli sayıya ulaşmış olan mezenkimal kök hücreler tripsin ile kaldırılmış ve sayımları yapılmıştır. Hücreler, 2 adet 15 ml'lik santrifüj tüplerine yıkama solusyonu içerisinde hücre olacak şekilde ayrılmıştır ve uygun oranda PBS ile sulandırılarak 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj süresi bittiğinde süpernatant atılarak, pellet karıştırılmıştır. Pellet üzerine 2 ml normal gelişim medyumunu eklenerek tekrar 1500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş, santrifüj sonunda santrifüj tüplerinin kapakları aralık olacak şekilde inkübatöre yerleştirilmiştir. Santrifüj tüpü dibinde 24 sa sonunda top oluşup oluşmadığı kontrol edilmiş top şeklinde oluşan pellet üzerindeki besiyeri toplanıp atılmış ve PBS ile yıkama yapılarak, kontrol santrifüj tüpüne 2 ml normal büyüme besiyeri, farklılaşma santrifüj tüpüne ise 2 ml farklılaşma besiyeri (%0,01 Deksametazon (Sigma-Aldrich, ABD), %1 penisilin-streptomisin (Lonza, İsviçre), %1,25 L-AA (Sigma-Aldrich, ABD), %1 Na-piruvat (Sigma-Aldrich, ABD), %1  $\mu\text{l}$  ITS+premix (Corning, ABD), %1  $\mu\text{l}$  TGF- $\beta$  (Sigma-Aldrich, ABD), %1 L-



Glutamin (Lonza, İsviçre) ve DMEM-LG (Lonza, İsviçre)) eklenmiştir. Santrifüj tüpleri inkübatörde çok hareket ettirilmeyecek bir bölgeye koyularak 3 günde bir besiyerleri pipet ile toplanarak yerine 2 ml taze besiyeri koyulmuştur ve 21 gün boyunca takip edilmiştir. Süreç sonunda qRT-PCR ile değerlendirme yapılmıştır [195].

### **3.3.2. Eksozomların İzolasyonu ve Karakterizasyonu:**

Eksozom izolasyonu öncesi eksozom kontaminasyonunu engelleyebilmek amacı ile kültüre edilmiş ve %70 yoğunluğa ulaşmış Kİ-MKH'ler, oda sıcaklığındaki PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra 1-2 gün eksozom içermeyen FBS'li hücre kültür besiyerinde inkübe edilmiştir. Eksozom izolasyonu deney düzeneğine uygun olan yöntemin seçilebilmesi açısından iki farklı yöntem, ultrasantrifüjleme ve manyetik olarak aktive edilmiş hücre sıralama (*Magnetic Activated Cell Sorting- MACS*) ile izole edilmiştir.

#### **3.3.2.1. Manyetik olarak aktive edilmiş hücre sıralama (Magnetic Activated Cell Sorting-MACS) yöntemi ile eksozom izolasyonu:**

Mezenkimal kök hücrelerden eksozomların izolasyonu üç aşamada tamamlanmıştır. Bu aşamalar hücre kültürü süpernatantının ön temizliği sonrası; manyetik işaretleme, manyetik ayırma ve eksozom elüsyonu olarak sıralanabilir. Hücre, hücre artıkları ve büyük veziküllerin uzaklaştırılması için 300 g'de 10 dakika (dk), 2.000 g'de 30 dk ve 10,000 g'de 45 dk seri santrifüjlenmiştir. Elde edilen pellet atılarak, süpernatant kullanılmıştır. Manyetik işaretleme sürecinde, 2 ml eksozom içeren örnek için, 50 µl eksozom izolasyonu mikro boncuk solüsyonu eklenerek, iyice karışması için vortekslenmiştir. Karışım 1 sa oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, manyetik ayırma aşamasına geçilmiştir. Bunun için µMACS ayırıcı manyetik bölgesine yerleştirilmiş olan µ kolon deneye hazırlanmıştır. Kolon üzerine manyetik olarak etiketlenmiş örnek uygulanmış ve ardından izolasyon tamponu ile kolon yıkanmıştır. Eksozomların elüsyonu için; kolon manyetik ayırıcıdan çıkarılmış ve içerisindeki manyetik işaretli eksozomlar dikkatlice 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

### 3.3.2.2. Ultrasantrifüjleme yöntemi ile eksozom izolasyonu:

Eksozom içermeyen FBS'li besiyeri ile inkübe edilen MKH'lerin besiyeri çekilerek 400g'de 10 dk santrifüjlenmiş, süpernatant yeni santrifüj tüpüne alınarak 3000g'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj tüpünün dibinde 1-2 ml kalacak şekilde süpernatant çekilmiştir. Süpernatant vortekslenmiş ve yeni 35 ml'lik ultrasantrifüj tüplerine aktarılarak, 35 ml PBS ile tamamlanmıştır. Hücre artıkları içeren pelleti uzaklaştırmak için 10000 g'de 10 dk santrifüjlenmiş, süpernatant 30.000g'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne alınmış, üzeri yeniden PBS ile 35 ml'ye tamamlanmıştır. Sonra 100.000g'de 90 dk boyunca santrifüjlenmiş, süpernatant atılarak, PBS ile hacim 35 ml'ye tamamlanmış, yeniden 100.000g'de 90 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Son olarak süpernatant atılmış ve kalan pellet 500µl PBS ile çözülmüştür.

### 3.3.2.3. Eksozomların Karakterizasyonu:

**Taramalı elektron mikroskopisi ile eksozom karakterizasyonu:** Taramalı elektron mikroskopu mikrograflarının analizi öncesi, eksozom pelleti HEPES içinde 1:100 oranında seyreltilmiştir. Bu sayede eksozomların kümeler oluşturulmasının bir miktar önüne geçilmiştir. Silikon levha üzerine sulandırılmış olan eksozom solüsyonu ~1µl hacimde sürülmüştür. Bu sayede eksozomların kümeleşmesinin önüne bir geçilmiştir. Eksozom solüsyon damlası etüvde 30°C sıcaklıkta kurutulmuş 1 sa süre ile tamamen kurutulan damla üzerine kaplama cihazı (Cressington Sputter Coating-108 auto, Ted Pella Inc., ABD) ile 5nm kalınlığında altın kaplama yapılmıştır. Sonra tutucuya oturtulan silikon levha cihaza yerleştirilmiştir. Örnek, düşük vakumlu ikincil elektron detektörü kullanılarak SEM (JIB-4601F, JEOL, Japonya) ile görüntülenmiştir.

**Geçirimli elektron mikroskopisi ile eksozom karakterizasyonu:** Formvar karbon kaplı 200 mesh'lik bakır gridler (Ted Pella Inc., ABD) mat yüzlerine eksozom içeren örneklerden 15µl gridlerin üstüne damlacık oluşturulmuştur. 30 dk kadar petrinin ağzı yarı açık biçimde bekletilip gridlerin üstündeki örnek solüsyonlarının çökmesi beklenmiştir. Temiz bir parafilmün üstüne 0.22'lik filtre yardımıyla fosfotungustik asit (PTA) (Sigma-Aldrich, ABD), uranil asetat (UA) (Sigma-Aldrich, ABD) ve distile su damlacıkları oluşturulmuş ve damlacık boyama yöntemi kullanılarak boyama

gerçekleştirilmiştir. UA damlacığında 1 dk UA ve PTA damlacığında 2 dk bekletilen gridler 3'er defa distile su ile yıkanmıştır. Ardından gridlerin üstündeki fazla sıvı filtre kâğıdı yardımı ile uzaklaştırılmış, kurutma kâğıdı üstüne, örneklerin bulunduğu taraf yukarı bakacak şekilde kurumaya bırakılmıştır. Örnekler kurduğunda TEM'e (JEM-1400, JEOL, Japonya) bağlı dijital kamera (Gatan, Almanya) ile görüntüleme yapılmıştır.

***Protein Miktarının ve Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi:*** Eksozom içeren örnek içinde bulunan protein miktarını analiz edebilmek ve yüzey belirteçlerinin analizinde antikor oranlarının belirlenmesi amacıyla BCA Total Protein Testi (Pierce™, Thermo Fisher, ABD) kullanılmıştır. Standartların (2000µg/ml ile 1,95µg/ml aralığında) her birinden ve örnekten 25µl alınarak mikro-plaka kuyucuklarına koyuluş ve her bir kuyucuk üzerine 200µl BCA solüsyonu eklenerek 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda kültür kabının soğuması beklenmiş, ardından 562 nm dalga boyunda okuması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protein miktarına göre kullanılacak olan antikorların miktarları belirlenmiştir. Yüzey belirteçlerinin değerlendirilmesi için ilk olarak her bir eksozom izolasyon yöntemine göre belirteç için belirlenen her bir tüpe 5µl, 3,6 µm boyutunda (4,2g/100ml) karboksil lateks boncuklar (Thermo Fisher, ABD) eklenmiştir. Belirlenen protein miktarına göre her 1 µg eksozom için 1µl boncuk konulması gerekmektedir. Boncuklar ayrı ayrı CD9, CD63 ve CD81 belirteçlerini yakalayacak şekilde gruplandırılmıştır. Boncuklar tüplere eklendikten sonra gece boyunca rotatorda karışmaları sağlanacaktır. Ardından karışım 10.000g'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiş, pellet tüp başına 50 µl olacak şekilde PBS çözülmüştür. Üzerlerine ilgili antikorlar konulduktan sonra oda sıcaklığında 1 sa karanlıkta inkübe edilmiş, tüp başına 1ml PBS eklenerek vortekslenmiştir. Sonrasında karışım 10.000g'de 10 dk santrifüjlenmiş, elde edilen pellet 100µl PBS içerisinde çözülerek vortekslenmiştir. Hazırlanan örnekler akım sitometrisi cihazına (Novocyte, Agilent, ABD) analiz edilmek üzere yerleştirilmiştir. Antikorlar ile işaretlenen hücrelerin yüzey belirteçlerinin 10.000 olgu ile okuması yapılarak değerlendirme yapılmıştır.

***Eksozomları parçacık boyutu ve konsantrasyonunun belirlenmesi:*** Eksozomların mililitredeki partikül sayısı ve boyutu Nanopartikül Takip Analizi (*Nanoparticle tracking analysis*-NTA) cihazı (iZON qNano Gold, Izon Science Ltd., New Zelanda) kullanılarak yapılmıştır. Eksozom örnekleri 1:20 HEPES içinde sulandırılmış, 40-225 nm çaplı

parçacıkları hedefleyen NP80 nanopor aparatı kullanılarak ölçüm 0.56V akım ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.4. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin anneksin V molekülü ile eksozomları bağlaması

Bu kapsamda KEHA nanoseramiklerin yüzeyleri, eksozom membranında bulunan fosfatidilserinlerini hedefleyerek bağlayacak olan AnV ile modifiye edilmiş ardından eksozomların bağlanması sağlanmıştır. İşlevselleştirme değerlendirme çalışmalarında, atomik güç mikroskopu (AFM) yerine SEM ile mikrograflar elde edilmiştir. HEPES'den gelen tuz kristallerinden oluşabilecek kalıntılar bu sayede yüksek çözünürlüklü SEM'de tanımlanarak başka bir oluşum ile karıştırılmasının önüne geçilmiştir. Elektron mikroskopu mikrograflarının analizi öncesi, örnekler hazırlanmıştır. Bunun için Çizelge 3.3'deki yöntem basamakları uygulanmıştır.

Çizelge 3.3. Elektron mikroskopu analizleri için örnek hazırlama ve konsantrasyon bilgileri özetlenmiştir.

Malzeme	Hazırlanışı	Konsantrasyon	
		Başlangıç	Son
AnV (BD Biosciences, ABD)	1:10 oranında hücre kültür seviyesinde su ile sulandırılmıştır. AnV'in sulandırması üretici firmanın verdiği protokolden uyarlanarak gerçekleştirilmiştir.	10x	1x
KEHA	Hücre kültür seviyesinde su ile sulandırılmıştır.	60mg/ml	0.1µg/ml
Eksozom	BCA ile total protein analizi gerçekleştirilmiş, karışıma eklenmiştir.	Konsantrasyona göre	25µg/ml

### **3.4.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom bağlanmasının karakterizasyonu ve görüntülenmesi**

#### **3.4.1.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom bağlanmasının Raman Spektroskopisi ile karakterizasyonu:**

Raman spektroskopisi değerlendirmesinde, 532nm yeşil lazer kaynağı ile Raman spektrometresi (inVia, Reinshaw, BK) ve ışık mikroskobu (Leica, Avusturalya) kullanılmıştır. Cihaz, 30 µm lazer gücü kullanarak 35 saniyede bir veri toplayacak, 5x ve 20x ve 50x büyütme gösterecek şekilde ayarlanmıştır.

#### **3.4.1.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom bağlanmasının SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile karakterizasyonu:**

Kopolimerize jelatin (1.5mg/ml) içeren %12 poliakrilamid jel (11cm çözünmüş jel-0.75mm kalınlıkta) kalıba dökülmüştür [196]. Örnekler 1:1 oranında yükleme solüsyonu (SDS, bromofenol mavi, gliserol, tris ve distile su içeren karışım) ile karıştırılmıştır. 20'şer ml örnek karışımı kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 10 dk 120V, 60dk 190V olarak uygulanmış, örneklerin jelde yürümleri sağlanmıştır.

#### **3.4.1.3. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom bağlanmasının taramalı elektron mikroskopisi ile görüntülenmesi:**

Kompozit bağlanmasının morfolojik değerlendirmesi için yüksek çözünürlüklü SEM'de (JIB-4601F MultiBeam Platform, JEOL Ltd., Japonya) üç deney grubu (A) Yalnızca KEHA damlası grubu ve (B) AnV ve KEHA'in bir arada bir damla içinde bulunduğu grup ve (C)KEHA, AnV ve insan Kİ-MKH eksozom solüsyonu içeren damla incelenmiştir. Silikon levha üzerine solüsyonlar ~1µl hacminde damlatılmıştır. Bütün solüsyon damlaları bir gece çeker ocak altında kurumaya bırakılmış, tamamen kurutulan damla yüzey yükü etkilerini azaltmak amacıyla, kaplama cihazı (Cressington Sputter Coating-108 auto, Ted Pella Inc., ABD) ile 5nm kalınlığında altın kaplama yapılmıştır. Sonrasında tutucuya oturtulan silikon levha cihaza yerleştirilmiş, düşük vakumlu ikincil elektron detektörü ile x700 ve x150.000 büyütmede incelenmiştir.

### **3.4.2. Eksozomların Kalsiyum eksik hidroksiapatit'den salımı**

Salım için belirlenen sürelerle göre (0, 15, 30. dk, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48. sa) KEHA-AnV-insan Kİ-MKH eksozomları içeren malzeme eşit konsantrasyonlarda santrifüj tüplerine hazırlanmıştır. Süresi dolan örnek ilk olarak 1200rpm'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiş, sonra süpernatandan alınan örneklerin içerdikleri eksozom miktarı BCA protein tayin yöntemi kullanılarak ELISA okuyucu ile 562 nm dalga boyunda alınan ölçümler sayesinde elde edilen absorbans verilerinin karşılık geldiği miktarlar standart eğri denkleminde yerleştirilerek hesaplanmış, bağlanma-salım grafiği *GraphPad Prism 8* (Prism GraphPad v8.4.2, ABD) yazılımı ile çıkarılmıştır. Deney 2 set, 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.5. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom formülasyonunun osteoblastların çoğalma, matriks sentezi ve mineralizasyonuna etkisinin değerlendirilmesi**

Osteoblastların çoğalma, matriks sentezi ve mineralizasyonuna etkisinin değerlendirilmesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom formülasyonunun osteoblastların çoğalması üzerindeki etkisi gerçek zamanlı hücre çoğalma analiz (*Xcelligence RTCA SP*, Agilent, ABD) cihazı ile ve matriks sentezine ve mineralizasyona etkisinin değerlendirilmesi amacıyla ALP aktivitesi ELISA cihazı (*VersaMax*, Molecular Devices, ABD) ile ölçülmüştür.

#### **3.5.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit ve eksozomların osteoblast çoğalmasında etkili dozunun belirlenmesi**

Kalsiyum eksik hidroksiapatit ve eksozomların proliferatif etkilerinin değerlendirilmesi için gerçek zamanlı hücre çoğalma analizi (*Xcelligence RTCA SP*, Agilent, ABD) cihazı kullanılarak gerçek zamanlı çoğalma değerlendirmesi yapılmıştır. Bunun için 96 kuyucuklu kültür plağının her bir kuyusuna  $2 \times 10^3$  hücre ekilmiş, hücrelerin plak yüzeyine tutunmalarına izin verilen 24 sa 37 °C, %5'lik CO<sub>2</sub> koşullarını sağlayan inkübatörde bulunan gerçek zamanlı hücre çoğalma analizi cihazında, inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki büyüme besiyeri uzaklaştırılarak, belirlenen dozlarda (0.1, 1, 10, 100 µg/ml) KEHA ve/veya eksozom içeren büyüme besiyerleri eklenmiştir. Sonrasında 24,

48 ve 72. sa hücrelerin gerçek zamanlı büyüme eğrileri değerlendirilerek osteoblastların çoğalması için eksozom dozu belirlenmiştir.

### **3.5.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- AnV- eksozom formülasyonunun osteoblastların mineralizasyonuna etkisinin ALP analizi ile değerlendirilmesi:**

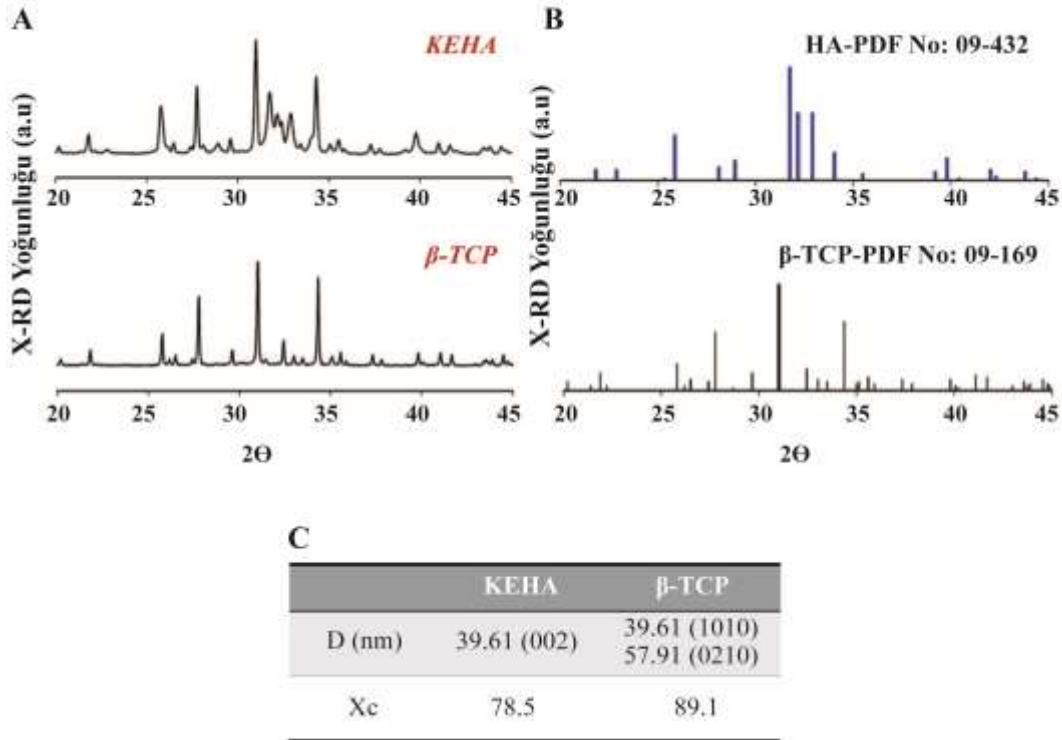
Yirmidört kuyucuklu hücre kültür plaklarına kuyucuk başına 20.000 hFOB ekilmiştir. Hücrelerin %70 yoğunluğa ulaşması beklendikten sonra kuyucuklara uygun dozda (0.1 µg/ml KEHA/25 µg/ml eksozom) KEHA-AnV-insan Kİ-MKH eksozomu formülasyonu eklenmiştir. Deney 2 set, 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 3. ve 7. günlerde ALP aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için PBS ile yıkanan kuyucuklara üreticinin talimatları doğrultusunda 0.5 ml SIGMAFAST pNPP substrat (Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltisi eklenmiştir. Çözelti eklenen kültür kabı folyo ile kaplanarak karanlık bir ortam sağlanmıştır, 40 dk 37°C ve %5 oranında CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda her kuyucuktan 200 µl çekilerek 96 kuyucuklu kültür kabına karanlık ortamda koyulmuştur. Kültür kabındaki ALP aktivitesi ELISA okuyucuda (*VersaMax*, Molecular Devices, ABD) 405 nm dalga boyunda okutulmuştur.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit'in karakterizasyonu:

#### 4.1.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit'in X-ışını difraksiyonu ve Raman spektroskopisi ile karakterizasyonu:

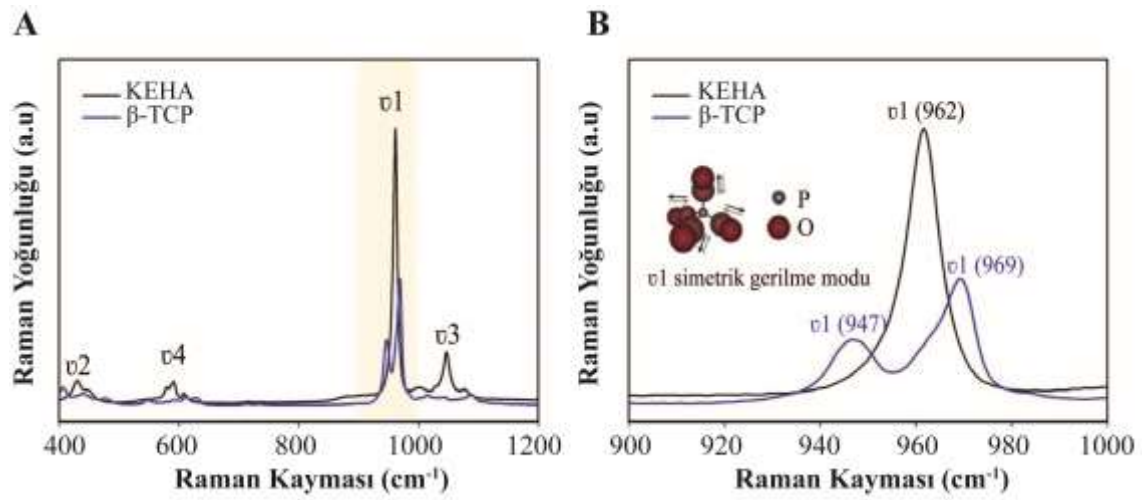
Bir malzemenin hangi yapısal faz(lar)dan oluştuğunun gösterilmesi için X ışını kırınımı analizi sonucu elde edilen spektrumlar referans spektrumlar ile mukayese edilmelidir. Referans spektrumlar, *Powder Diffraction File* (PDF) olarak tanımlanıp, X-RD analizi programları ile temin edilebilmektedir. Bir faza ait referans spektrumda mevcut olan tüm piklerin, analizi yapılan malzemeye ait spektrumda da tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla yürütülen çalışmada KEHA sentezlendikten sonra vakumda kurutularak X-RD ile analiz edilmiştir. Şekil 4.1-B'de görüldüğü gibi faz analizlerinde HAp için 009-0432 TCP için ise 09-169 numaralı standart PDF kartları kullanılmıştır. Şekil 4.1-A'da sinterlenmemiş örnekte HAp'a ait karakteristik pikler tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Şekilde (A) sentezlenen KEHA'ya ve  $\beta$ -TCP'ye ait X-ışını difraktogramı, (B) referans numunelere ait X-ışını difraktogramları, (C) hesaplanan ortalama kristal boyutu ve kristallik derecesi görülmektedir. D: ortalama kristalit boyutu, Xc: kristalit derecesini ifade etmektedir.



Raman spektroskopisi, kimyasal yapı, faz ve polimorfi, kristallik ve moleküler etkileşimler hakkında ayrıntılı bilgi sağlayan, tahribatsız bir kimyasal analiz tekniğidir ve ışığın bir malzeme içindeki kimyasal bağlarla etkileşimine dayanmaktadır. Bu teknik ile moleküllerin titreşim modlarının yanı sıra dönme ve diğer düşük frekanslı sistem modları belirlenebilir. Tez kapsamında üretilen KEHA ve ısıtılma sonrası oluşan  $\beta$ -TCP'nin moleküler titreşimlerden faydalanılarak analizi için Raman spektroskopisi tekniği kullanılmıştır. KEHA ve  $\beta$ -TCP'ye ait olan Raman spektrumları Şekil 4.2'de verilmektedir.

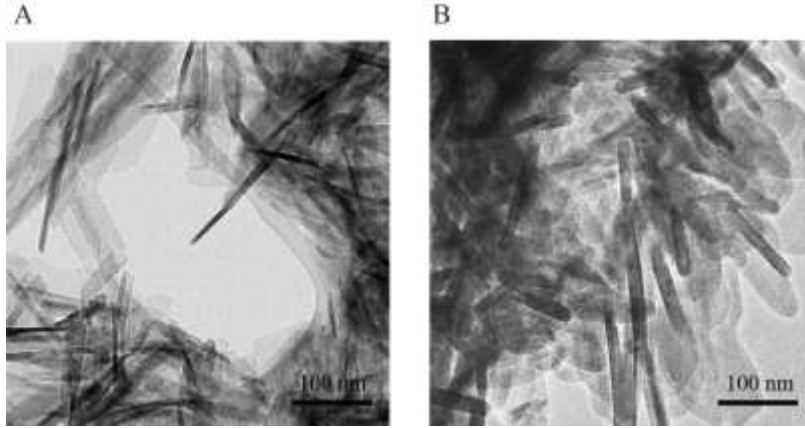


Şekil 4.2. Sentezlenen KEHA'ya ve KEHA'nın ısıtılma tabi tutulması sonucu elde edilen  $\beta$ -TCP'ye ait Raman spektrumları A) 400-1200  $\text{cm}^{-1}$  B) 900-1000  $\text{cm}^{-1}$ . Spektrumlarda fosfat grubuna ait tam simetrik v1 titreşim modu KEHA'de 962  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenirken, faz dönüşümü sonrası  $\beta$ -TCP'de 947 ve 969  $\text{cm}^{-1}$ 'de iki ayrı pik olarak görülmektedir.

#### 4.1.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatit'in geçirimli elektron mikroskobu ile morfolojik analizi:

Kurutulmuş KEHA partiküllerinin stokiometrik veya stokiometrik olmayan HAp partiküllerinin morfolojisine benzer şekilde iğne benzeri morfolojide olduğu gözlemlenmiştir. 750°C'de sinterleme sonrası faz dönüşümü ile elde edilen  $\beta$ -TCP partiküllerinde KEHA partikülleri ile oldukça benzer bir morfoloji gözlemlenmiştir. Yalnızca uygulanan ısıtılma bağlı olarak partiküllerin kalınlaştığı görülmüştür. Kurutulmuş ve

sinterleme sonrası elde edilen örneklere ait aydınlık alan elektron mikrografları Şekil 4.3'te görülmektedir.

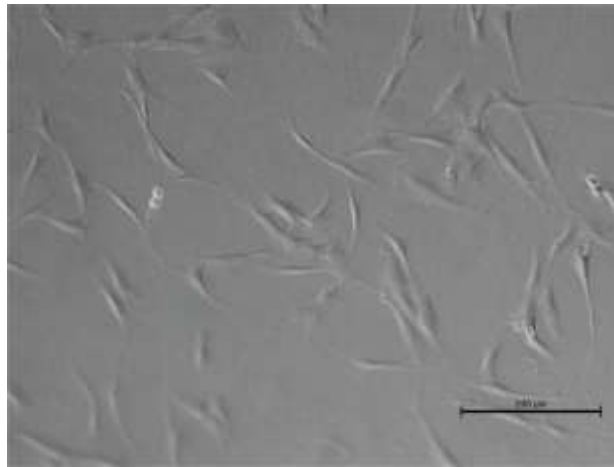


Şekil 4.3. Kurutulmuş (A) KEHA ve (B) sinterleme sonrası elde edilen  $\beta$ -TCP örneklerine ait aydınlık alan elektron mikrografları görülmektedir.

## **4.2. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden eksozomların eldesi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi**

### **4.2.1. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürü ve karakterizasyonu:**

İğsi, polimorfik biçimli insan Kİ-MKH'lerinin 4. pasajda, buldukları kültür kabının yüzeyine tutundukları ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir. Şekil 4.4'de iğ biçimli insan Kİ-MKH'ler sitoplazmik uzantılarıyla görülmektedir.

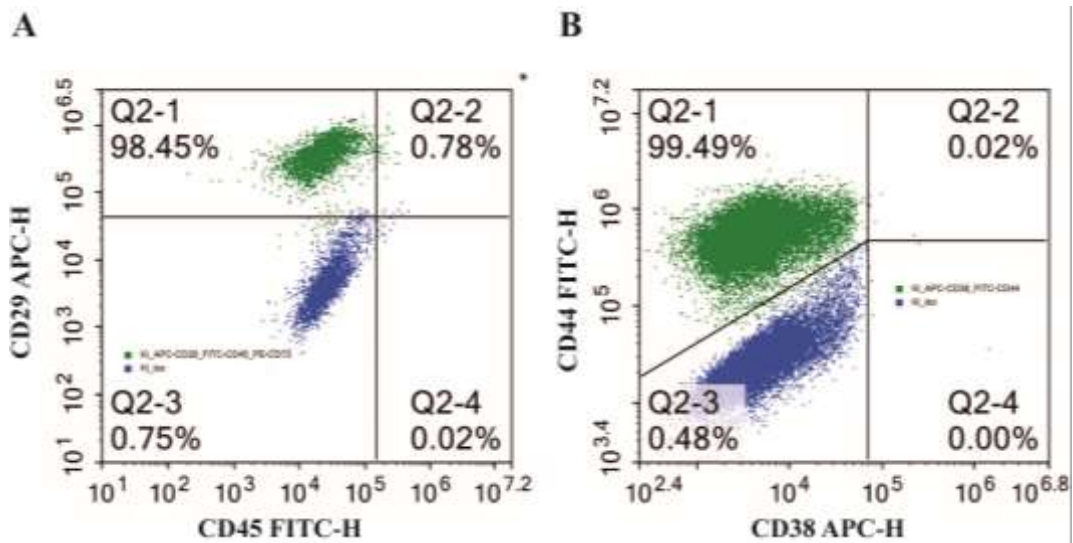


Şekil 4.4. İnverte ışık mikroskobunda iğsi şekilli insan Kİ-MKH'lerin kültür plağına tutundukları görülmektedir. x100.

## 4.2.2. Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu:

### 4.2.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin değerlendirilmesi:

Akım sitometrisi yöntemi ile 4. pasajdaki insan Kİ-MKH'lerinin mezenkimal belirteçler olan CD29 ve CD44'ü yüksek oranda (sırasıyla %98.45 ve %99.49) hematopoietik belirteçler olan CD38, CD45'i düşük oranda (sırasıyla %0.02 ve %0.78), bulundurduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). Buna göre; 4. Pasajdaki insan Kİ-MKH'lerinin ileri iş paketlerinde güvenle kullanılabilceği kararı alınmıştır.

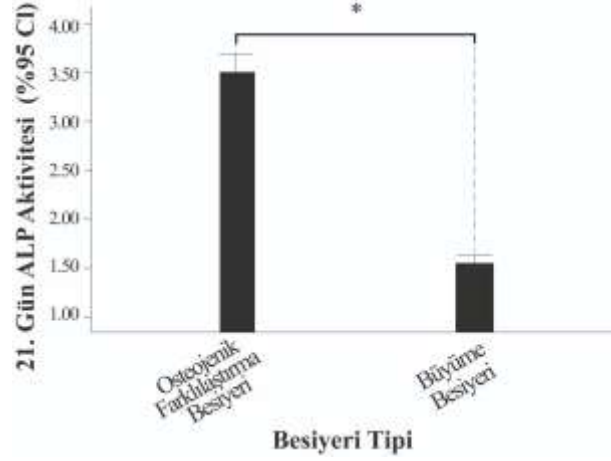


Şekil 4.5. İnsan Kİ-MKH'lerinin spesifik yüzey belirteçlerinin akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmesi. (A) Pozitif CD29 ve negatif CD45, (B) pozitif CD 44 ve negatif CD38 işaretlemelerinin yüzdeleri akım sitometrisi grafiklerinde gösterilmiştir. Buna göre insan Kİ-MKH'lerinin %98.45 oranında CD29 ve %99.49 oranında CD44 ile işaretlendiği, hematopoietik kök hücre belirteçlerinin ise çok düşük oranda işaretlendiği görülmektedir.

### 4.2.2.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesi:

#### *Osteojenik Farklılaştırma;*

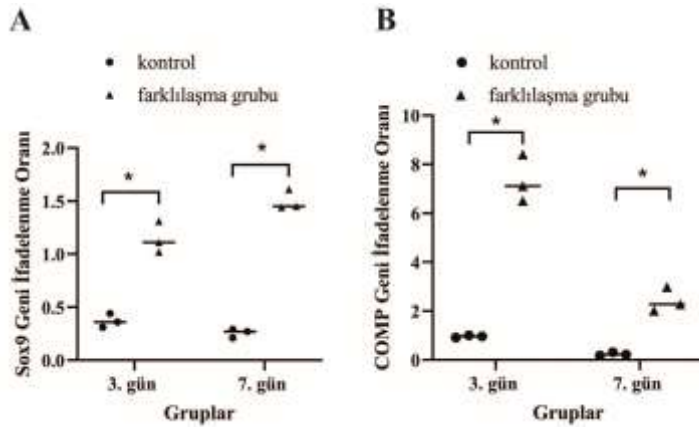
Osteojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan insan Kİ-MKH'lerinin, büyüme besiyeri uygulanan insan Kİ-MKH'leri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiği görülmüştür ( $p=0,001$ ; Şekil 4.6). Buna göre 4. Pasajdaki insan Kİ-MKH'lerinin ileri iş paketlerinde kullanılabilceği kararı verilmiştir.



Şekil 4.6. İnsan Ki-MKH'lerinin 21. günde ELISA tekniği ile gerçekleştirilen osteojenik farklılaştırma analizi görülmektedir. Kontrol grubuna göre Ki-MKH'lerin ALP aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür. (\*) istatistiksel olarak anlamlı farklılık p=0.001 ifade etmektedir.

#### ***Kondrojenik Farklılaştırma;***

Yedi günlük protokol sonucunda kondrojenik farklılaştırma besiyeri uygulanan insan Kİ-MKH'lerinin qRT-PCR yöntemi ile kontrol grubuna göre 3. ve 7. günlerde kondrojenik farklılaşma erken belirteci COMP ve geç belirteci SOX9'u, anlamlı biçimde daha yüksek oranda ifade ettiği saptanmıştır (p=0.05, Şekil 4.7-A, B). Buna göre 4. Pasajdaki insan Kİ-MKH'lerinin ileri iş paketlerinde kullanılabileceği kararı verilmiştir.

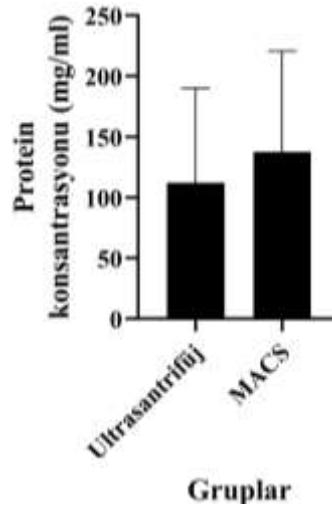


Şekil 4.7. Büyüme besiyeri ve kondrojenik farklılaşma besiyerlerinde kültüre edilen MKH'lerin 3. ve 7. gün (A)SOX9 ve (B)COMP ekspresyon verilerine ait grafikler gösterilmektedir. Sox9 ve COMP genlerinin 3. ve 7. günlerde kontrole göre yüksek oranda ifade edilmiştir. (\*) p < 0.05 ifade etmektedir.

### 4.2.3. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu:

#### 4.2.4.1. Eksozomların protein miktarı açısından değerlendirilmesi:

MACS yöntemi ile elde edilmiş eksozom örneklerine ait BCA ölçümlerinde, protein miktarı  $275\mu\text{g/ml}\pm 181\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir. Ultrasantrifüjleme yöntemi ile elde edilen protein miktarı  $1,8\text{ mg }\mu\text{g/ml}\pm 1,2\text{ mg/ml}$  olarak ölçülmüştür. MACS yöntemi ile değerlendirilen örneklerin başlangıç hacimlerinin düşük, ultrasantrifüjleme ile elde edilenlerin ise yüksek olması nedeniyle protein miktarı karşılaştırması için oransal normalizasyon gerçekleştirilerek, giriş miktarları eşitlenmiştir. Buna göre MACS yönteminin ultrasantrifüjlemeye göre daha yüksek miktarda eksozom proteini eldesi sağladığı tespit edilmiştir. Ancak elde edilen bu verilerin aradaki farklılık istatistiksel anlamlılığa sahip değildir (Şekil 4.8). Çizelge 4.1’de normalize edilmiş protein miktarları verilmiştir.

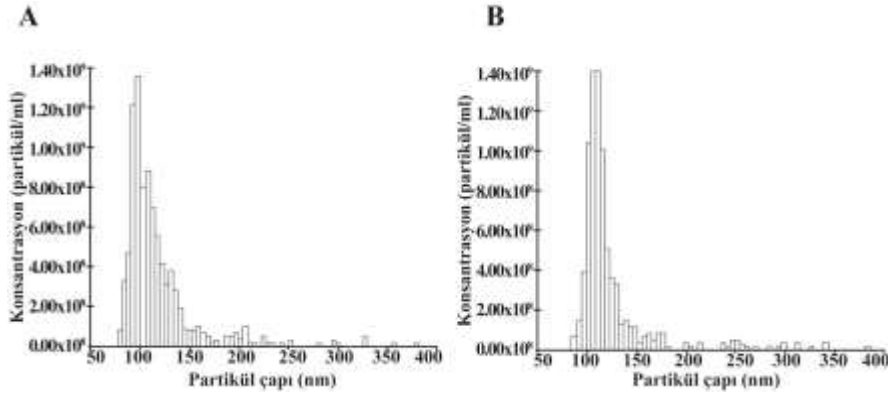


Şekil 4.8. Ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının protein konsantrasyonları görülmektedir. Gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktur.

#### 4.2.4.2. Eksozomların partikül boyut ve sayılarının değerlendirilmesi:

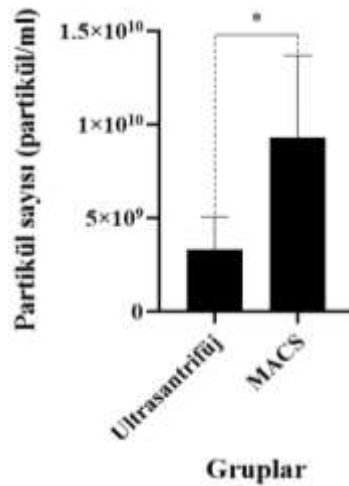
NTA ile elde edilen partikül özelliği verilerine göre (Şekil 4.9); MACS ile izole edilmiş insan Kİ-MKH eksozomlarının maksimum partikül boyutu 110 nm’de pik verdiği için partikül boyutu dağılımı 88-426 nm olarak hesaplanmıştır. Ultrasantrifüjleme ile izole edilen eksozomlar aynı şekilde 110 nm’de pik vererek 80-383 nm aralığında partikül

boyutu dağılımı göstermiştir. Parçacıkların dağılımını yansıtan açıklık değeri, (d90-d10) / d50, MACS ile izole edilmiş grupta 0.52 ve ultrasantrifüleme ile izole edilen örneklerde 0.60 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Grafiklerde (A) Ultrasantrifüleme ve (B) MACS yöntemleri ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının partikül konsantrasyonlarının partikül çapına göre değerleri grafiklerde görülmektedir.

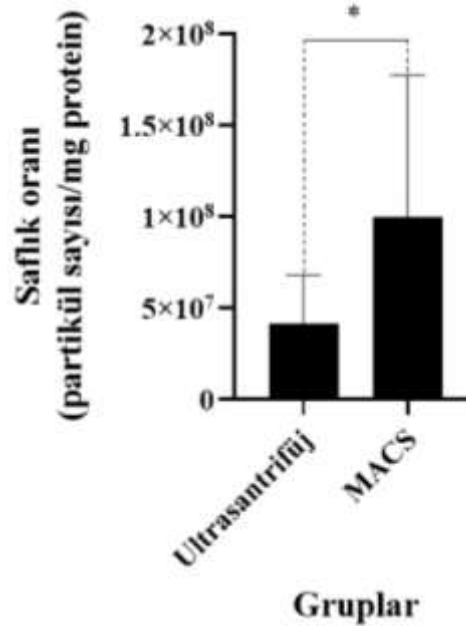
MACS ile izole edilen eksozomların ( $9.31 \pm 4.4 \times 10^9$ ) normalize edilmiş olarak ml başına düşen partikül sayısının, ultrasantrifüleme ile izole edilenlerle karşılaştırıldığında ( $3.34 \pm 1.7 \times 10^9$  partikül/ml) anlamlı olarak fazla olduğu görülmüştür ( $p=0.011$ , Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Ultrasantrifüleme ve MACS yöntemleri ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının ml başına düşen partikül sayısı grafikte gösterilmektedir. MACS ile izole edilen grubun normalize edilmiş ml başına düşen partikül sayısı verileri ultrasantrifülemeye göre yüksektir. (\*)  $p=0.011$ .

#### 4.2.4.3. Eksozomların saflık analizi:

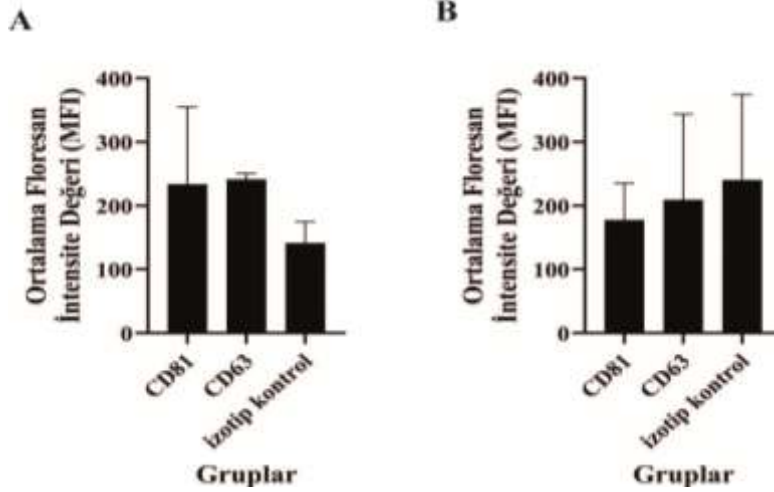
Normalize edilmiş veriler ile yapılan saflık analizi hesaplamalarına göre; MACS ile izole edilmiş insan Kİ-MKH eksozomların saflık oranı,  $4.23 \times 10^9$  partikül/mg iken, ultrasantrifüjleme ile izole edilen örneklerde bu değer  $1.85 \times 10^9$  partikül/mg olduğu görülmüştür. MACS ile izole edilen örnek anlamlı olarak daha saf bir örnektir ( $p = 0.006$ , Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının saflık oranı (mg protein başına düşen partikül sayısı) grafikte gösterilmektedir. Normalize edilmiş saflık oranı verilerine göre MACS ile izole edilen grup ultrasantrifüjleme ile izole edilenlere göre yüksek saflıktadır. (\*)  $p=0.006$ .

#### 1.2.4.4. Eksozomlara özel yüzey belirteçlerinin değerlendirilmesi:

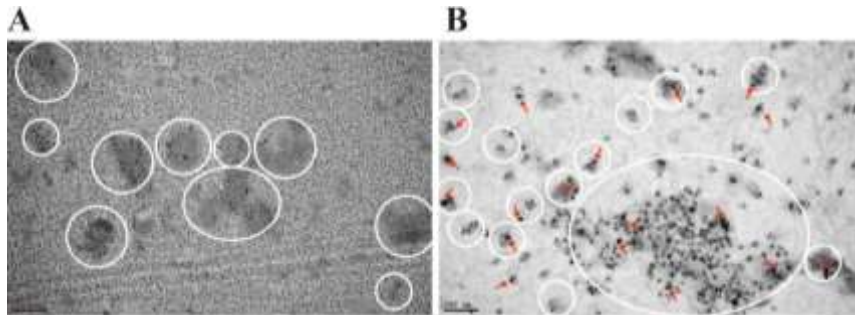
Her iki izolasyon yöntemi ile elde edilen eksozomların karakterizasyonu için yapılan akım sitometrisi ölçümlerine göre; CD 9 ile yakalanan eksozomların CD63 ile ve CD81 ile işaretlendikleri her üç belirtece de sahip oldukları gösterilmiştir. (Şekil 4.12). MACS ile izole edilmiş eksozomlarda ortalama floresan intansitesi (MFI) verilerinin izotip kontrole benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.12-A). Ultrasantrifüjleme ile izole edilmiş eksozomların MFI değerleri ise izotip kontrole göre daha yüksektir (Şekil 4.12-B). Ancak farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.12. Ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile izole edilmiş insan Kİ-MKH eksozomlarının yüzey belirteçlerinin akım sitometrik değerlendirmesi sonucunda elde edilen ortalama floresan intansite değerleri görülmektedir. (A) Ultrasantrifüjleme, (B) ise MACS yöntemi ile izole edilen eksozomları göstermektedir.

#### 1.2.4.5. Eksozomların geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi:

Geçirimli elektron mikrograflarında, fosfotungstik asit ile negatif boyanmış olan eksozomlar küresel yapılı veziküller olarak kümeler halinde veya tek tek görüntülenmiştir (Şekil 4.13). Ultrasantrifüjleme ile izole edilmiş olan insan Kİ-MKH eksozomların boyutlarının 80-150 nm arasında olduğu, MACS ile izole edilmiş olanların ise 90-170 nanometre boyutu aralığında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. Geçirimli elektron mikrograflarında (A)ultrasantrifüjleme ve (B)MACS ile izole edilmiş negatif işaretli küresel yapılı insan Kİ-MKH eksozomları görülmektedir. Beyaz çemberler eksozom kümelerini göstermektedir. MACS ile izole edilen eksozomların manyetik boncukları okla işaretlenmiştir. UA, PTA x50.000



Çizelge 4.1. MACS ve Ultrasantrifüjleme yöntemleri ile izole edilen eksozomların karşılaştırmalı tablosu görülmektedir.

<b>Karakterizasyon</b>	<b>Ultrasantrifüjleme</b>	<b>MACS</b>
<b>Protein miktarı</b>	1.8 mg/ml	2.2 mg/ml
<b>Partikül sayısı</b>	3.34±1.7x10 <sup>9</sup> partikül/ml	9.31±4.4x10 <sup>9</sup> partikül/ml
<b>Partikül boyutu</b>	80-383 nm (pik110 nm)	88-426 nm (pik110 nm)
<b>Safılık</b>	1.85x10 <sup>9</sup> partikül/mg	4.23x10 <sup>9</sup> partikül/mg
<b>Yüzey belirteçleri tayini</b>	Daha iyi işaretlenmiştir	Manyetik boncuklar ile yakalama yapılan tetraspaninler ile yüzey belirteci analizi gerçekleştirildiği için, bağlanma yeri dolu olduğundan değerler ultrasantrifüjlemeye göre düşüktür.
<b>Morfolojik değerlendirme</b>	80-150 nm, küresel şekilli parçacıklar gözlemlenmiştir	90-170 nm, küresel şekilli parçacıklar, manyetik boncuklar gözlemlenmiştir.

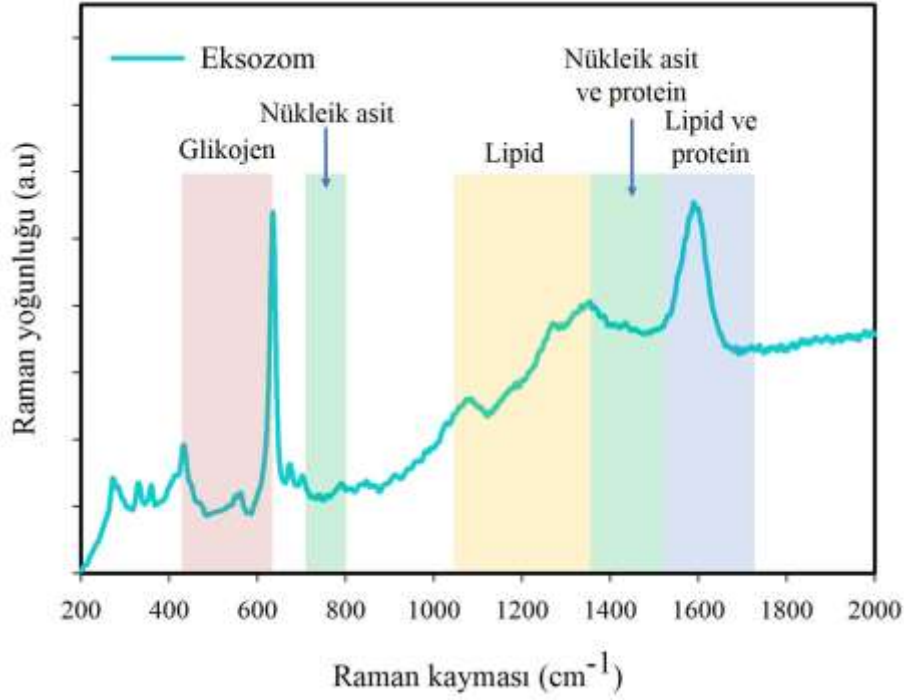
MACS yöntemi verileri girdinin miktarına göre ultrasantrifüjleme ile eşlenerek normalize edildiğinde, çıktının ultrasantrifüjlemeye göre avantajlı olduğu görülmektedir. Ancak MACS kiti ile her deney setinde çalışılan küçük hacimlerle kısıtlı olduğundan, düşük eksozom çıktısı ile çalışabilmektedir. Bu nedenle geri kalan deneyler için eksozomlar ultrasantrifüjleme yöntemi ile MACS'a göre daha büyük hacimlerde elde edilmiştir.

### **4.3. Kalsiyum eksik hidroksiapatit- eksozom formülasyonunun karakterizasyonu**

#### **4.3.1. Raman Spektroskopisi ile KEHA-AnV-Eksozom formülasyonunun içerdiği komponentlerin bağlanma analizi:**

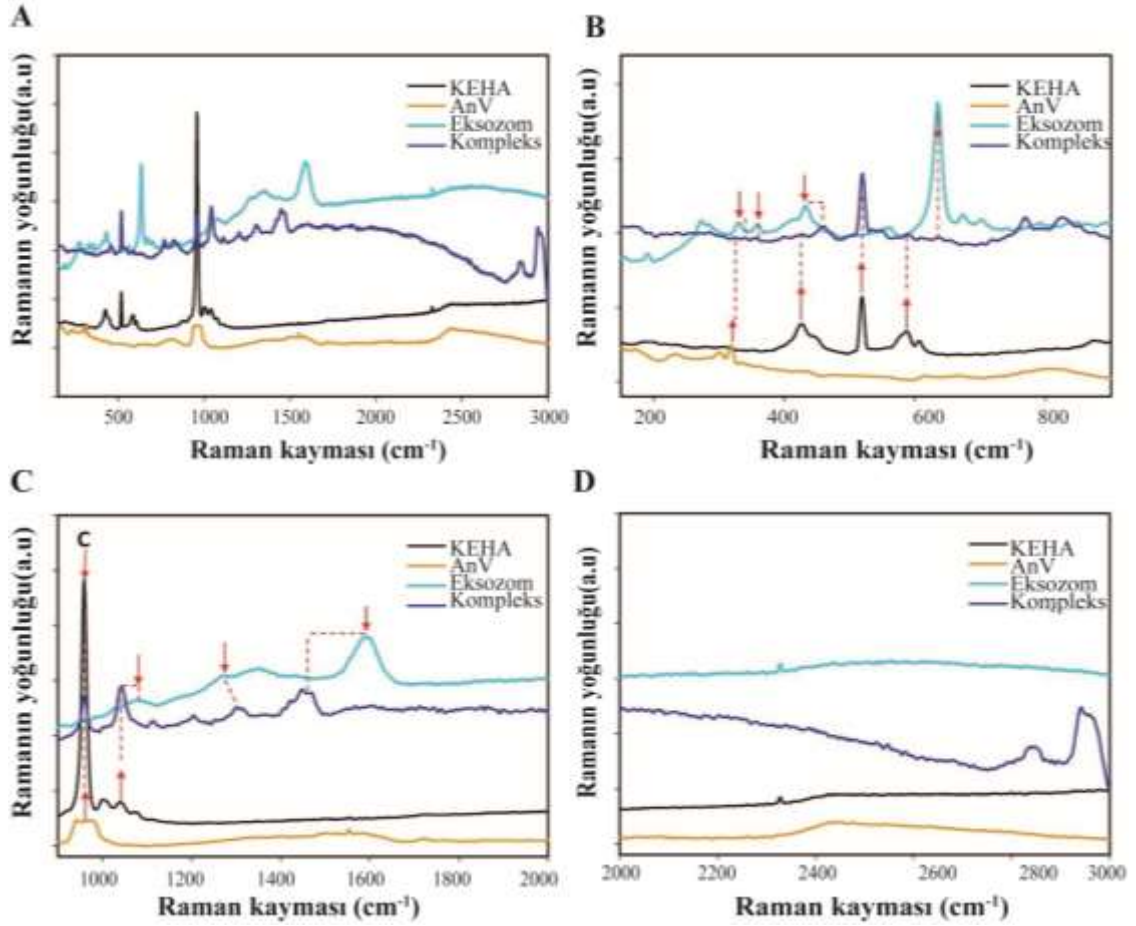
Bir Raman spektrumu, biyolojik bir sistemin fenotipi olarak kabul edilebilir çünkü proteinler, nükleik asitler, lipitler ve karbonhidratlar gibi ana hücrel yapı blokları için Raman bantları içeren genel bir moleküler titreşim profili sağlar. Bu sebeple eksozoma ait spektrum Şekil 4.14'de detaylı olarak verilmektedir. Burada her bir bandın işaret ettiği biyomoleküller literatür göz önünde bulundurularak işaretlenmiştir. Eksozom yüzey

bileşiminin ana katkıları olan lipidlere ve proteinlere karşılık gelen titreşimlerin karakteristik pikleri 700-1800  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde görülmektedir. Örneğin, C-C iskelet gerilmesinden kaynaklanan titreşim spektrumunda 1076  $\text{cm}^{-1}$  'de görülmektedir [197]. Açıkça ayırt edilebilen bir diğer pik ise 1587  $\text{cm}^{-1}$ 'deki  $\text{CH}_2$  bükülme titreşiminden kaynaklanan tipik lipid pikidir [198]. 1300-1400  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki pikler,  $\text{CH}_2$  bükülme titreşimlerine atfedilebilir [197].



Şekil 4.14. Tespit edilen 200-2000  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki eksozom bantları ve ait oldukları biyomoleküller görülmektedir.

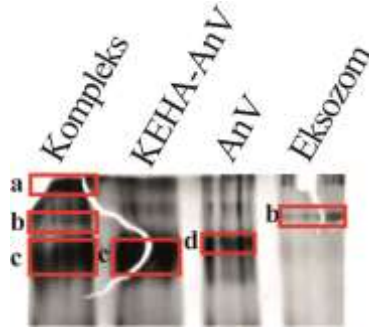
KEHA-AnV-insan Kİ-MKH eksozomu formülasyonunu oluşturan her bir bileşene ait pikler, KEHA-AnV-insan Kİ-MKH eksozomu birleşimine ait spektrumda da görülmektedir (Şekil 4.15). Şekil 4.15-B ve 4.15-C'de koyu mavi hat ile gösterilen formülasyona ait spektrumda eksozoma ait piklerinin de yer aldığı oklar ile işaretlenmiştir. Koyu mavi hatta meydana gelen pik kaymaları kimyasal bir bağlanmanın sonucudur. Siyah hat ile gösterilen KEHA piklerinin de formülasyonun içinde yer aldığı, fakat bazı piklerde kayma olduğu bazı piklerde ise Raman yoğunluğunun değiştiği görülmektedir. Spektrumlarda kesikli çizgiler ile belirtilen pik kaymaları sonucu tespit edilen yeni frekans pozisyonlarıdır.



Şekil 4.15. KEHA, AnV, Eksozom ve formülasyona ait mukayeseli Raman spektrumları. (A) 100-3000  $\text{cm}^{-1}$ , (B) 100-900  $\text{cm}^{-1}$ , (C) 900-2000  $\text{cm}^{-1}$  ve (D) 2000-3000  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bölgelerdeki mukayeseli Raman spektrumları verilmektedir.

#### 4.3.2. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile KEHA-AnV-Eksozom formülasyonunun içerdiği bileşenlerin bağlanma analizi:

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçlarına göre serbest eksozom (Şekil 4.19(b)) ve serbest AnV (Şekil 4.19(d)) bantları görülmektedir. KEHA-AnV bandında (Şekil 4.19(c)) görülen genişleme burada bağlanma olduğunu ortaya koymaktadır. KEHA-AnV-Eksozom içeren formülasyon grubunda ise üçlü bağlanma en üstte bulunan bant (Şekil 4.19 (a)) ile görülmektedir. Formülasyondaki diğer bantlar (Şekil 4.19 (b,c)) ise hala bağlanma sürecinde bulunan ve henüz bağlanmamış serbest eksozom ve KEHA-AnV örneklerini göstermektedir. (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. KEHA-AnV-Eksozom formülasyonunun ve kontrol gruplarının SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile elde edilen bantları görülmektedir. Soldan sağa sırasıyla KEHA-AnV-Eksozom formülasyonu, KEHA-AnV karışımı, AnV ve eksozom grupları yer almaktadır. (a) KEHA-AnV-Eksozom içeren formülasyon bandı, (b) serbest eksozom bandı, (c) KEHA-AnV bandı, (d) serbest AnV bandını göstermektedir.

#### 4.3.3. Anneksin V ile modifiye edilmiş kalsiyum eksik hidroksiapatit ile insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının bağlanması

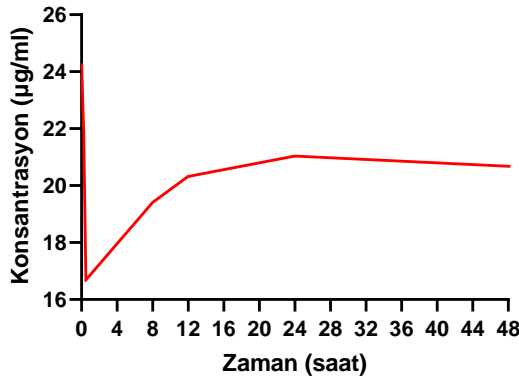
Taramalı elektron mikrograflara göre, insan Kİ-MKH eksozomlarının seçildiği ve boyutlarının da eksozomlarla uyumlu olduğu görülmüş (Şekil 4.17-A), tek başına KEHA içeren grupta tek başına KEHA partikülü görüntülenmiş çubuk şeklindeki yapısı teyit edilmiştir (Şekil 4.17-B). Anneksin V, KEHA nano kristalleri ve eksozomların beraber olduğu örnekte ise eksozomların, AnV aracılı olarak KEHA'ye tutunduğu, tek başına KEHA'dan ve eksozomdan farklı bir yapı sergiledikleri görülmektedir (Şekil 4.17-C).



Şekil 4.17. İnsan Kİ-MKH eksozomları ve oluşturulan formülasyona ait elektron mikrografları görülmektedir. (A) İnsan Kİ-MKH eksozom grubunda eksozomlar seçilmektedir. (B) Tek başına KEHA partikülünün çubuksu yapısı izlenmektedir. (C) Formülasyon: KEHA, Anneksin V ve eksozom grubunda ise formülasyon bileşenlerinin etkileşimi görülmüştür. x150.000

#### 4.5. Eksozomların kalsiyum eksik hidroksiapatit-eksozom formülasyonundan salımı

Salım deneyine göre, 25 µg olarak başlayan eksozomların ilk 1 sa içinde miktarındaki düşüş; eksozomların KEHA-AnV ile bağlandığını ve ilk 12 sa büyük çoğunluğunu (yaklaşık 10 µg'ını) kontrollü bir şekilde serbest bıraktığını göstermektedir (Şekil 4.18). 12-24 sa arası salım yavaşlamış, 24. sa sonrasında salım 21.04 µg'da sabit hale gelmiştir. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının KEHA-AnV ile bağlandığı ve sonrasında kontrollü bir şekilde salımının gerçekleştiği gösterilmiştir.



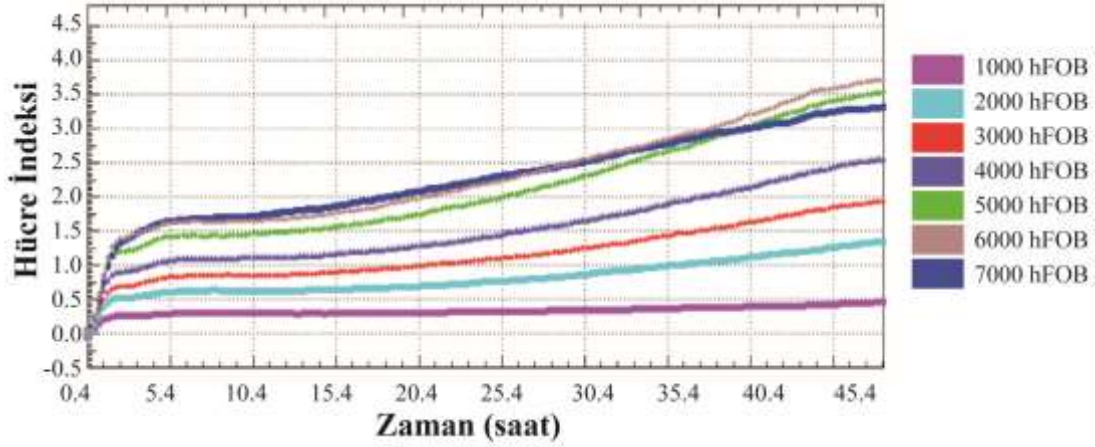
Zaman (sa)	Eksozom miktarı (µg/ml)
0	24.2860
¼	21.8182
½	16.6874
1	17.3654
2	18.0034
4	18.9568
8	19.4156
12	20.3247
24	21.0390
48	21.0021

Şekil 4.18. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının KEHA'dan zamana göre salım grafiği ve zamana göre ayrıntılı salım verileri gösterilmektedir. Başlangıçta 24.3µg/ml konsantrasyonlu eksozom ile başlanan salım çalışmasında ilk yarım sa içinde eksozomların KEHA ile AnV aracılı bağlandığı, sonrasında salımının ilk 24 sa gerçekleştiği görülmektedir.

#### 4.6. Kalsiyum eksik hidroksiapatit-eksozom formülasyonunun osteoblastların çoğlama, matriks sentezi ve mineralizasyonuna etkisinin değerlendirilmesi

##### 4.6.1. Kalsiyum eksik hidroksiapatit ve eksozomların osteoblastların çoğalmasında etkili dozlarının belirlenmesi

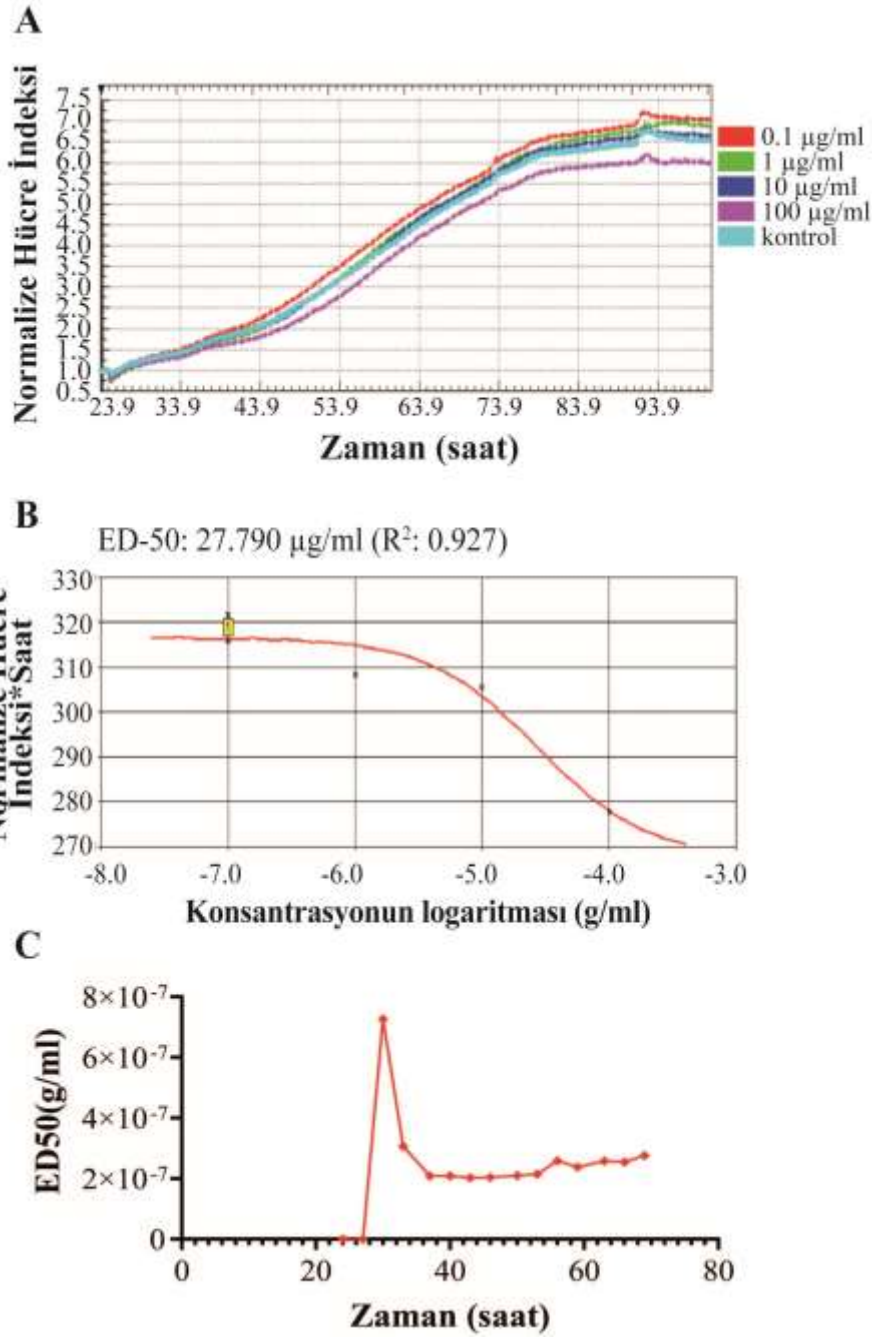
Gerçek zamanlı hücre çoğalma analizinde (Şekil 4.19) 4000 osteoblast ve üstünde hücre ekilen kuyucuklarda impedans temelli hücre endeksinin ilk 24 sa önce 1'e çıktığı görülmüştür. Bu durum daha düşük hücre miktarının daha uygun olduğunu göstermektedir. 1000 adet hücre ekilmiş olan kuyuların ise impedans temelli hücre endeksinin 1'e ulaşamadığı görülmüştür. 3000 ve 2000 hücre ekili kuyuların, ilk 24 sa sonrasında impedans temelli hücre endekslerini 1'e çıkardığı görülmüştür. Bu nedenle optimal hücre miktarı 3000 ile 2000 arasında olması gerektiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.19. Ticari olarak elde edilen hFOB 1.19 hücre hattının deneylerde kullanılacak optimal hücre miktarının impedans temelli gerçek zamanlı hücre çoğalma analizi gösterilmektedir. Grafiğe göre 3.000 ve 2.000 adet hücre içeren grupların hücre indeksleri ilk 20 sa içinde 1.0 değerine ulaşmakta ve deney için en ideal hücre yoğunluğunu oluşturmaktadır.

#### 4.6.1.1. İnsan KI-MKH eksozomlarının osteoblastların çoğalmasında etkili dozunun belirlenmesi

Deneyin gerçek zamanlı hücre çoğalma analizlerinde (Şekil 4.20-C) osteoblastların çoğalması için etkili eksozom dozunun 27.8  $\mu\text{g/ml}$  olduğu ED-50 değerlendirmesi ile belirlenmiştir (Şekil 4.20-B). Zamana bağlı etkili doz 21. sa 24.2  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir ve etkinin 36. sa'e kadar devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.20-C). ED-50 analizi için cihazın kendi yazılımı RTCA SP v 2.0 kullanılmıştır. Deney sonucunda eksozomların sağlıklı osteoblastların çoğalmasını indüklediği görülmüştür.

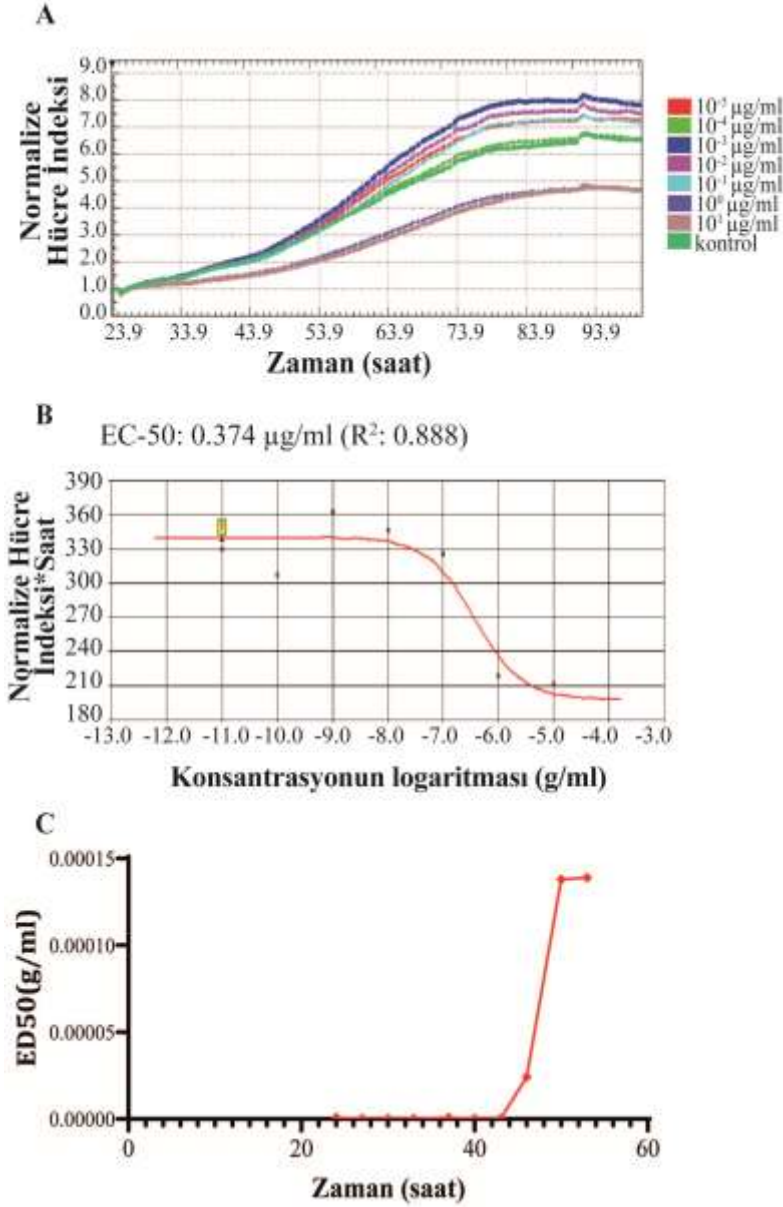


Şekil 4.20. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının osteoblastlardaki etkili doz değerlendirmesi şekilde görülmektedir. (A) Gerçek zamanlı hücre çoğalma verileri, (B) etkili doz değerlendirmesi, (C) zamana bağlı etkili doz değerlendirmesi gösterilmiştir. Osteoblastlar için çoğalma etkili eksozom dozu 27.8 µg/ml olduğu, zamana bağlı etkili dozun ise 21. sa 24.2 µg/ml olduğu ve 36. sa kadar devam ettiği belirlenmiştir.



#### 4.6.1.2. Kalsiyum eksik hidroksiapatitin osteoblastların çoğalmasında etkili dozunun belirlenmesi

Deneyin gerçek zamanlı hücre çoğalma analizlerinde (Şekil 4.21-A) osteoblastlar için ED-50 değeri 0.37  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.21-B). Zaman bağımlı etkili doz ise 21. sa 0.1  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.21-C).



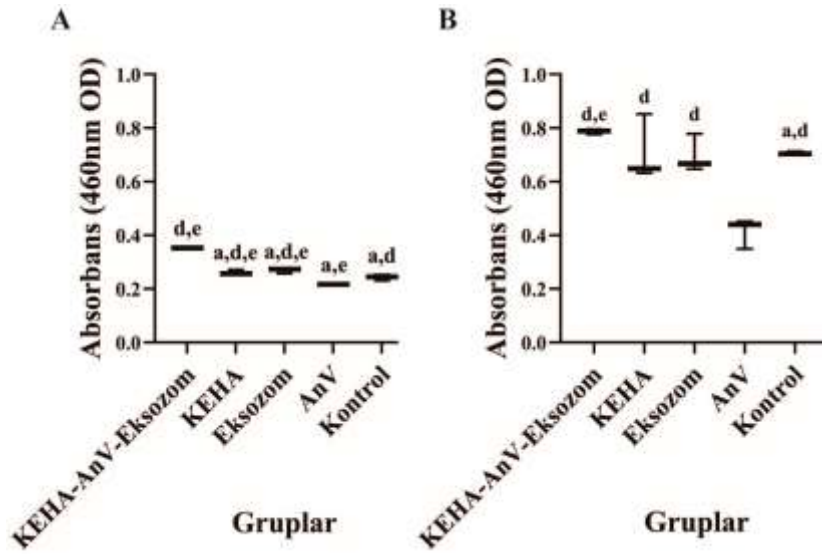
Şekil 4.21. KEHA'nın osteoblastlardaki etkili doz değerlendirmesi şekilde görülmektedir.

(A) Gerçek zamanlı hücre çoğalma verileri, (B) etkili doz değerlendirmesi, (C) zamana bağlı etkili doz değerlendirmesi gösterilmiştir. Osteoblastlar için etkili KEHA dozu 0.37  $\mu\text{g/ml}$  olduğu, zamana bağlı etkili dozun ise 21. sa 0.1  $\mu\text{g/ml}$  olduğu belirlenmiştir.



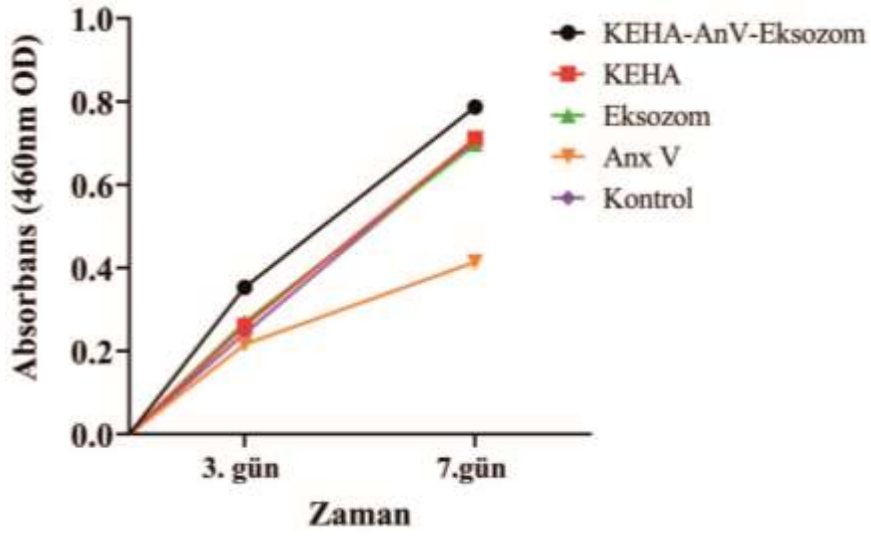
#### 4.6.2.Kalsiyum eksik hidroksiapatit-eksozom formülasyonunun osteoblastların mineralizasyonuna etkilerinin ALP analizi ile değerlendirilmesi

Malzemelerin ED-50 dozunda uygulandıkları insan osteoblastlarında 3.gün ALP aktivite sonuçları, KEHA-AnV-Eksozom içeren besiyeri ile beslenen osteoblastların sadece besiyeri, sadece KEHA, sadece eksozom ve sadece AnV ile beslenmiş olanlara göre anlamlı olarak daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (her grup için  $p<0.05$ , Şekil 4.22-A). KEHA-AnV-Eksozom uygulanan osteoblastların 7. gündeki ALP aktivitesi sadece besiyeri ve sadece AnV ile beslenen osteoblastlardan anlamlı olarak daha yüksektir ( $p<0.05$ , Şekil 4.22-B). Hem 3. gün hem de 7. gün osteoblastların ALP aktivitesi değerlerine göre sadece KEHA ve sadece eksozom ile işlem görmüş olan gruplar arasında bir fark görülmemiştir. Her iki grup da 3. günde sadece besiyeri içeren gruba göre anlamlı olarak yüksek ALP aktivitesi göstermiş ( $p<0.05$ , Şekil 4.22-A), 7. günde sadece besiyeri ile beslenen grupla anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Şekil 4.22-B). Anneksin V uygulanan osteoblastların ALP aktivitesi her iki zaman dilimi için hem diğer kontrollerden hem de KEHA-AnV-Eksozom içeren malzemeden anlamlı olarak düşüktür (her grup için  $p<0.05$ , Şekli 4.22-A, B).



Şekil 4.22. KEHA, AnV ve insan Kİ-MKH eksozomu içeren malzemenin osteoblastların mineralizasyonu üzerine etkilerinin değerlendirildiği grafikler görülmektedir. Gruplara göre (A) 3. Gün ALP aktivitesi değişimleri, (B) 7. Gün ALP aktivitesi değişimleri gösterilmiştir. Kontrol: sadece besiyeri içeren, KEHA: Etkili dozda KEHA içeren, Eksozom: Etkili dozda insan Kİ-MKH eksozomu içeren, AnV: sadece AnV içeren grupları ifade etmektedir.

Gruplar arasında 3. ve 7. gün ALP aktivite değerleri arasında zaman içinde anlamlı artış olduğu görülmüştür (her grup için  $p < 0.05$ , Şekil 4.23).



Şekil 4.23. KEHA, AnV ve insan Kİ-MKH eksozomu içeren malzemenin osteoblastların mineralizasyonu üzerine zamana göre değişen etkilerinin değerlendirildiği grafik görülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, planlanan hedeflere ulaşılarak  $\beta$ -TCP'ın ısıtılma işlem öncesindeki formu KEHA'nın başarı ile üretildiği yapısal olarak XRD ve Raman spektroskopisi, morfolojik olarak ise TEM ile ortaya konmuştur. Spesifik yüzey belirteçlerini taşıyan, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyeli ile karakterize edilmiş, insan ticari Kİ-MKH'lerinden ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İki farklı yöntem ile izole edilen eksozomlar total protein miktarı, partikül sayısı, partikül boyutu, spesifik yüzey belirteçleri, SEM ve TEM'deki şekil ve boyutları açısından karşılaştırılmış, yüksek hacimlerde eksozom eldesi sağladığı için ileri deneylerde ultrasantrifüjleme yöntemi ile izole edilen eksozomların ve KEHA'nın ticari hFOB'ların çoğalması için etkili dozları gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak 25  $\mu\text{g/ml}$  ve 0.1  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir. Etkili dozdaki eksozomlar KEHA ile AnV aracılığıyla fiziksel olarak bağlanmış, bağlanma karakteristikleri Raman spektroskopisi ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile ortaya koyulmuştur. Etkili dozda KEHA-AnV-insan Kİ-MKH eksozomu içeren formülasyonun hFOB matriks sentezi ve mineralizasyona etkisi ALP aktivitesi ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda projenin ulaşılan hedeflerini kapsayan başlıklar altında sırayla tartışılmaktadır.

### 1. Araştırma Hedefi: KEHA'nın üretilmesi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen KEHA ısıtılma işlem öncesi ve sonrasında yapısal olarak karakterize edilmiştir. KEHA'ye ait XRD spektrumunda ikincil bir faz olmayıp bu durum saf KEHA fazının elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca kurutma sonucu elde edilen partiküllerin 750°C' de ısıtılma işlemi tabii tutulması ile  $\beta$ -TCP fazının elde edildiği görülmüştür. XRD analizi sonucu KEHA için kristal boyutu 39,61 nm iken,  $\beta$ -TCP fazı için ise 57,91 nm olarak hesaplanmıştır. KEHA fazı 750°C'de  $\beta$ -TCP'ye dönüştüğü için ısıtılma işlem sonrası ortalama kristal boyutunun artması beklenen bir sonuçtur [194, 199, 200]. Aynı durum kristallik oranında da görülmektedir. XRD tekniği fazların belirlenmesinde yeterli olmasına rağmen, bu tezde Raman spektroskopisi de hassas ve tamamlayıcı bir analiz tekniği olarak kullanılmıştır.  $\beta$ -TCP birim hücrede 42  $(\text{PO}_4)^{3-}$  tetrahedraya sahipken, HAp birim hücresi yalnızca altı  $(\text{PO}_4)^{3-}$  tetrahedra içerir[194].  $\beta$ -TCP'nin birim hücresindeki fosfat gruplarının daha yüksek olması nedeniyle, daha fazla sayıda titreşim

modu beklenir[201]. Bu durum Raman spektroskopisi ile izlenebilir hassas sonuçlar vermektedir. Raman spektroskopisi ile yapılan inceleme sonucunda  $(PO_4)^{3-}$  grubuna ait  $\nu_1$  tamamen simetrik gerilme modu spektrumunda literatüre uygun şekilde  $962\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenmiştir. KEHA fazının ısı işlem sonrası  $\beta$ -TCP fazına dönüşümü yine Raman spektroskopisi ile çok belirgin şekilde gözlemlenmiştir. Birim hücredeki fosfat grubu sayısının fazla olması sebebi ile  $\beta$ -TCP'daki fosfat grubuna ait titreşimlerin daha belirgin olması beklenmektedir. Bu durum  $\beta$ -TCP'a ait Raman spektrumunda  $\nu_1$  tamamen simetrik gerilme modu iki ayrı pik şeklinde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar yapısal olarak istenilen özellikte KEHA üretildiği gösterilmiştir [201, 202].

Üretilen KEHA'dan beklenen bir başka özellik de nano boyutlu olmasıdır. Geliştirilen yapının hücre içine alınabilmesi için boyut önemli bir parametredir. Tez kapsamında yürütülen morfolojik inceleme sonucu nano boyutlu ve iğne yapılı partiküllerin üretildiğini göstermektedir. Stokiyometrik ve stokiyometrik olmayan apatitlerin benzer morfolojiye sahip olduğu literatürde bildirilmiştir [194, 203].

**2. Araştırma Hedefi:** *İnsan Kİ-MKH eksozomları karşılaştırmalı olarak ultrasantrifüjleme ve MACS teknikleriyle izole ve karakterize edilmiş, MACS ultrasantrifüjlemeye göre daha saf, ancak ultrasantrifüjleme MACS'a göre daha yüksek miktarda eksozom eldesi sağlamıştır.*

Bu tez çalışmasında insan Kİ-MKH'lerinden ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleriyle izole edilen eksozomların benzer protein miktarı, partikül boyutu ve ince yapı özellikleri gösterdikleri tespit edilmiştir. MACS tekniği, ultrasantrifüjlemeye göre daha yüksek saflık ve partikül sayısı sağlamış, ancak bu yöntemle elde edilen eksozomlar üzerlerindeki manyetik boncuklar nedeniyle akım sitometrisinde spesifik belirteçleri (CD9, CD63 ve CD81) düşük oranda bağlamıştır. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada insan Kİ-MKH eksozomları, eksozom zarında bulunan fosfatidilserin fosfolipidlerini hedefleyerek manyetik boncuklar aracılığıyla izole edilmiştir [204]. Bu tez çalışmasında MACS'da kullanılan eksozoma özgü üçlü yüzey belirteçleri (CD9, CD63 ve CD81) ile izolasyon [205, 206], eksozoma özgü tetraspaninin varlığına dayandığından, fosfolipid yakalama tekniğinden daha güvenilir bir yöntem sunmaktadır. Eksozomlarla benzer boyutlara sahip apoptotik cisimler, tüm hücre dışı veziküller

tarafından paylaşılan bir molekül olan fosfatidilserin ile yakalanabilir ve bu durum sonucu olumsuz etkileyebilir [207]. Literatürde insan Kİ-MKH'leri CD9, CD63 ve CD81 üzerinden MACS ile izole edilmemiştir.

Bu çalışmada insan Kİ-MKH'lerinden MACS ile elde edilen eksozomların protein miktarı  $2.2 \pm 0.17$  mg/ml; ultrasantrifüjleme ile elde edilenlerin  $1.8 \pm 0.25$  mg/ml olarak ölçülmüştür. Farklı türlerden ultrasantrifüjleme ile elde edilen Kİ-MKH eksozomlarının protein miktarları  $0.27$  mg/ml ile  $1.18 \times 10^3$  mg/ml arasında rapor edilmiştir [208-210]. Eksozomların protein içeriği sıçan Kİ-MKH'lerinde  $0.27$  mg/ml [208]; insan Kİ-MKH'lerinde  $1.18 \times 10^3$  mg/ml [210] ve  $1$  mg/ml olarak bildirmiştir [209]. Bu çalışmalarda BCA ile değerlendirilen protein miktarı sonuçlarındaki farklılık, büyük olasılıkla başlangıç hacimlerinin farklı olması ile ilişkilidir. Çalışmalarda başlangıç hacimleri rapor edilmemiştir. Diğer yandan BCA tekniği, protein miktarını değerlendirmek ile beraber, eksozom saflığını ölçmek için yeterli olmayabileceğinden, saflık için gereken partikül sayısı NTA analizi ile desteklenmelidir [211-213]. Bu çalışmada, MACS ile elde edilen eksozomların partikül sayısının ( $9.31 \pm 4.4 \times 10^9$ ) ultrasantrifüjlenmişlere ( $3.34 \pm 1.7 \times 10^9$ ) göre daha yüksek olduğu görülmüştür. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının fosfatidilserini yakalayan manyetik boncuklar ile izole edildiği çalışmada, partikül sayısı  $4.1 \times 10^9$  partikül/ml olarak bildirilmiştir [204]. Aynı çalışmada başlangıç hacmi ve izolasyon tekrarlarının sayısı rapor edilmediğinden, çalışmalar arasında güvenilir bir karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Ultrasantrifüjleme ile izole edilen eksozom örneklerimizin partikül miktarına yakın bir sonuç, Mead vd. ( $1.17 \times 10^9 \pm 1.42 \times 10^8$  partikül/ml) tarafından insan Kİ-MKH eksozomları için raporlanmıştır [214]. Ancak bu çalışmada da izolasyon sayısı ve başlangıç hacmi hakkında bilgi sunulmadığından güvenli bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Protein miktarının partikül konsantrasyonuna oranının eksozom açısından zengin örneklerin saflığını belirlediği bilinmektedir [211-213]. Sonuçlarımız, insan Kİ-MKH eksozomlarının saflık oranının MACS için  $4.23 \times 10^9$  ve ultrasantrifüjleme için  $1.85 \times 10^9$  olduğunu göstermektedir. İnsan plazmasından çöktürme yöntemi ile elde edilen eksozomların saflığının  $>3 \times 10^{10}$  partikül/mg protein olduğu bildirilmiştir [211]. İnsan idrarından ultrasantrifüjleme ile elde edilen eksozomların saflık oranı  $1 \times 10^9$  partikül/mg

protein olarak raporlanmıştır [212]. *Sucrose cushion* ile ultrasantrifüjleme yöntemi kullanılarak izole edilmiş prostat, mesane ve meme kanseri hücre hatlarına ait eksozomların [212] saflık oranının  $5 \times 10^9$ - $4 \times 10^{10}$  partikül/mg aralığında olduğu bildirilmiştir. Literatürde MACS ve ultrasantrifüjleme yöntemleriyle elde edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının saflığına ait bir değerlendirmeye rastlanmamıştır. Prostat kanser hücre hattından elde ettikleri eksozom örneklerinin saflık oranı aralığını standart hale getirmiştir. Buna göre; saflık oranı  $>3 \times 10^{10}$  partikül/mg protein olan örneklerin yüksek saflıkta olduğu,  $2 \times 10^{10}$  ile  $2 \times 10^9$  partikül/mg protein arasındaki örneklerin düşük saflıkta olduğu ve saflık oranı  $<1.5 \times 10^9$  partikül/mg protein olan örneklerde ise saflığın kaybolduğunu belirtmiştir [212]. Ultrasantrifüjleme ve MACS yöntemleri ile izole edilmiş insan Kİ-MKH eksozomlarının saflık oranı bu sınıflandırmaya göre düşük olarak kategorize edilmektedir. Bununla birlikte, bu tez kapsamında MACS ile elde edilen eksozomların saflık oranı ultrasantrifüjleme ile elde edilenden daha yüksektir.

Bu tez çalışmasında hem ultrasantrifüjleme hem de MACS ile izole edilen eksozomların homojen, küresel şekilli ve çift zarla çevrili yapılar olduğu TEM ile ortaya konmuştur. MACS ve ultrasantrifüjleme ile izole edilmiş insan Kİ-MKH eksozomlarının NTA ile elde edilen partikül çaplarının,  $110 \text{ nm}^3$ 'de yoğunluk olmak üzere 80 ila 200 nm arasında ve TEM ile elde edilen boyut aralıklarının, MACS için 90-170 nm, ultrasantrifüjleme için ise 80-150 nm olduğu görülmüştür. Son çalışmalar, MACS ile insan yağ dokusu kökenli MKH eksozomlarının ve insan Kİ-MKH eksozomlarının ortalama boyutlarının sırasıyla  $80.0 \pm 1.9 \text{ nm}$  [215] ve 170 nm [204] olduğunu bildirmekte; protein miktarı hakkında bilgi vermemektedir. MACS ve ultrasantrifüjleme ile izole edilen eksozomların, TEM [210, 216-221] ve NTA [204, 221-224] yöntemleriyle ölçülen partikül boyutları literatürle uyumludur. Sonuç olarak bu çalışmada saptanan 80 ila 200 nm boyut aralığı, eksozom tanımlamasına karşılık geldiğinden, her iki yöntem için de güvenli aralıktır [221, 222, 224-226].

Burada uygulanan MACS tekniği, belirli yüzey işaretleyicilerini taşıyan manyetik boncuklarla hücreleri ve hücre dışı vezikülleri yakalama prensibine dayanır [227, 228]. Bu nedenle, MACS ile izole edilen insan Kİ-MKH eksozomları, ultrasantrifüjleme ile elde edilenlerle karşılaştırıldığında, antikorlar için bağlanma yerlerini dolduran üçlü

manyetik boncukların varlığı nedeniyle akım sitometrisi analizinde yüzey belirteçleri (CD9, CD63 ve CD81) için daha düşük floresan yoğunluğu (MFI) değeri vermiştir. Ultrasantrifüjlenmiş örneklerin akım sitometri verileri literatür ile uyumludur[229-231].

Bu çalışma kapsamında, klinikteki potansiyel kişiselleştirilmiş tedaviler için değerlendirmeyi hak eden güvenilir *in vitro* teknikler olduklarından eksozom izolasyonu MACS ve ultrasantrifüjleme teknikleri ile gerçekleştirilerek etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bir seferde daha fazla eksozom eldesini sağladığı için eksozom içeren KEHA formülasyonlarının oluşturulduğu ve osteoblastlardaki etkinliklerinin değerlendirildikleri iş paketlerinde ultrasantrifüjleme yöntemi ile devam edilmiştir.

**3. Araştırma Hedefi:** *KEHA ve insan Kİ-MKH eksozomları AnV aracılığı ile bağlandığı formülasyonla osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri beraber barındıran, biyomühendislik temelli yeni bir formülasyon, bir malzeme geliştirilerek başarıyla karakterize edilmiş, salım dinamikleri değerlendirilmiştir.*

Bu tez ile ilk kez, insan Kİ-MKH eksozomları AnV aracılığı ile KEHA'ya bağlanarak osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri beraber barındıran, biyomühendislik temelli yeni bir biyomalzeme geliştirilmiştir. Anneksin V'in eksozomlara bağlanması SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ve Raman spektroskopisi teknikleri ile gösterilmiştir. KEHA'e bağlanan eksozomların ise 24 ile 48 sa arasında salındıkları gözlemlenmiştir.

Eksozomların zarlarından bağlayıcı peptidler kullanılarak modifiye edildikleri çalışmalar bulunmaktadır [170-172, 174, 193]. Bu modifikasyonların amacı eksozomların belirli bir malzemeye bağlanarak ikili (osteoindüktif ve osteokondüktif) etki göstermesi değil, hücre hedefleme [174], eksozom izolasyonu [170, 174] ya da görüntülemeye [170, 172, 174]. Gao vd., CP05 peptidini eksozomları zarlarındaki CD 63 üzerinden yakalayarak, serumdan eksozom izolasyonu yapmış, sonrasında da bu bağlanmayı eksozomları görüntüleme yöntemi olarak kullanmıştır [174]. Bağlanma başka bir (spektroskopi ya da elektroforez vb.) yöntem ile gösterilmemiştir. Diğer çalışmalarda bağlanma üzerinde değil, etki üzerinde durulmuş, herhangi iki malzemenin bağlanma karakterizasyonu

üzerine bir çalışma yapılmamıştır. Eksozomlara özel zar yüzey belirteçlerinin en bilinenlerinden olan CD 9 [232, 233] ile bağlanabilen peptit yapılı ProHB-EGF molekülünün bu özelliğinden dolayı [175] eksozomlara bağlanması mümkün olabilmesine rağmen eksozomlarla beraber bir çalışmada araştırılmamıştır.

Birçok spektroskopik teknikte piklerin veya bantların yoğunluğunun değişmesi, bant veya pik pozisyonunun ilgili eksen boyunca kayması, bileşim ve bölgesel kimyasal değişimlere göre piklerin kaybolması veya yeni piklerin oluşması incelenen malzemeyi oluşturan atom veya doğası hakkında önemli ipuçları sunmaktadır [234, 235]. Bu prensipten yola çıkarak yürütülen Raman spektroskopisi incelemesinde KEHA-AnV-Eksozom içeren formülasyonda her bir bileşene ait piklerin olduğu fakat bu piklerin şiddetlerinin ve pozisyonlarının değiştiği gözlenmiştir. Yoğunluk düşüşünün sebeplerinden birisi formülasyon içinde bileşene ait konsantrasyonunun azalmış olmasıdır. Pik pozisyonlarındaki kaymalar ise bağ yapısındaki farklılaşmaları, dolayısı ile mevcut bir bağlanmayı göstermektedir. Ayrıca bağlanma sonucunda formülasyon içinde 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde yeni pikler gözlemlenmiş olup bu bölge protein, lipid ve nükleik asitlere karşılık gelmektedir [236].

Bağlanmanın gösterilmesi için kullanılan SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yönteminde moleküllerin boyutlarına göre bantlanma görülmektedir [237]. Küçük moleküller daha hızlı bir şekilde jelin alt kısımlarına doğru ilerlerken, büyük moleküller ise jelin üst kısımlarında kalmaktadır. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi kullanılarak KEHA-AnV-eksozom bağlanmasını gösteren ilk çalışma bu tez çalışmasıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda eksozomlar enzimatik olarak parçalanarak SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yönteminde jelde yürütme gerçekleştirilmiş, protein içerikleri incelenmiştir [238, 239]. Bu çalışmada ise bağlanmayı gösterebilmek ve fazla bant karmaşasına sebep olmamak için eksozomlara bir işlem yapılmamıştır. Bu nedenle boyutları küçültülmemiş olan eksozomlar jelin aşağı kısımlarına inememiş, jelin üst kısımlarına hafif bir bant oluşturmuş ve proteinler tek tek bantlarla görülmemiştir. Kalsiyum fosfat bileşiklerinin jelde yürütülmesinin görüldüğü tek çalışmada matriks metalloproteinaz bağlı CaP ve CaPPi %7.5'lük SDS-poliakrilamid jelde yürütülmüş ve fibrin bağlanmasına etkilerine bakılmıştır [196]. Deney her ne kadar başka amaçla gerçekleştirilse de SDS-poliakrilamid



jel elektroforezi uygulamasında CaP kombinasyonlarının yürütülebildiği görülmüş ve bu tez çalışmasına örnek teşkil etmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında ilk kez KEHA üzerinden AnV aracılığıyla insan Kİ-MKH eksozomlarının salımı sağlanmıştır. Kalsiyum fosfat temelli bileşiklerin eksozomlar ile beraber kullanıldığı ve salım analizi yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır [240-243]. Hidroksiapatit partikülleri ve insan göbek kordonu kaynaklı MKH eksozomları bir hidrojele yüklenmiş, 14 gün süreyle süpernatandaki eksozom miktarları ölçülerek kompozit hidrojel ve sadece eksozom içeren kontrol hidrojelinin salım dinamikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Buna göre 14 günün sonunda kompozit hidrojelden ortalama  $71.20 \pm 2.64$  salım olurken kontrol hidrojelinden daha yüksek ( $84.81 \pm 4.91$ ) sağlanmış ve kompozit hidrojelden salımın daha kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır [240]. Diğer çalışmada hidroksiapatit, ipek fibroini, glikol kitosan, çifte işlevli polietilen-glikol hidrojelinin içine eksozomlar yüklenmiş ve 30 günlük salım dinamikleri değerlendirilmiştir. Kompozit hidrojelden 30 günde  $78.22 \pm 0.36$  eksozom salımı olduğu, sadece eksozom içeren hidrojelde ise salımın aynı sürede  $87.07 \pm 1.12$  oranına ulaştığı görülmüştür [241]. Başka bir çalışmada, HAp ve kitosan kompozit hidrojeline sinoviyum kaynaklı MKH eksozomları yüklendikten sonra 6 gün süre ile eksozom salımı ölçülmüş ve  $(164.07 \pm 9.24) \times 10^8$  başlangıç partikülünün yaklaşık olarak yarısını saldığı görülmüştür [242]. Diğer çalışmada *thiol* ile modifiye edilen hiyaluronan, HAp ve *thiol* ile modifiye heparin hidrojele insan yağ dokusu kaynaklı MKH eksozomları yüklenmiş ve 14 gün süreyle salım analizleri gerçekleştirilmiştir [243]. Sürenin sonunda malzemenin çok sınırlı miktarda eksozomu yaklaşık olarak %0.8-1 aralığında saldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalarda kalsiyum fosfat ve eksozomlar hidrojel ile bir arada tutulmakla beraber bileşenlerin hücre içine aynı anda alınmasını sağlayacak, birebir bağlama işlemi gerçekleştirilmemiştir. Salım çalışması da jelin salım potansiyelini ölçmek için uygulanmıştır. Hidrojel eksozomları daha uzun süreli hapsettiğinden dolayı bizim salım dinamiğimize göre oldukça uzun sürelerde değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışmamızda ise KEHA üzerinden eksozomların direkt salımına bakılmış ve diğer hidrojelli sistemlere göre beklendiği gibi direkt salımın daha hızlı gerçekleştiği görülmüştür. Çalışmamızda eksozomların bir kısmının bu salım süresi içinde KEHA ile beraber hücre içine alınması ve bir kısmının da ESM'de kalmasını istediğimizden dolayı süre bizim için yeterlidir. Bununla beraber, eksozomların stabil kalma süresi hiçbir modifikasyon [244] yapılmadığında oldukça kısa olduğundan dolayı bu veziküller uzun

sürelerde salındıklarında inaktive olabilirler. Bu gibi durumlarda salım analizlerinin yanında, eksozomların dokudaki varlığının da gösterilmesi gerekliliği doğmaktadır.

**Araştırma Hedefi:** *KEHA ve insan Kİ-MKH'lerinin insan osteoblastlarındaki proliferatif etki dozu (ED50) in vitro koşullarda gerçek zamanlı olarak sırasıyla 0.1 µg/ml ve 25 µg/ml olarak belirlenmiştir. Etkili dozlarda KEHA ve insan Kİ-MKH eksozomları ile oluşturulan formülasyonun insan osteoblastlarındaki proliferatif etkisi in vitro koşullarda gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizi ile gösterilmiştir. KEHA-AnV-insan Kİ-MKH eksozomları içeren formülasyonun, insan osteoblastlarının ALP aktivitesini 0-7 gün zaman diliminde indüklediği görülmüş ve böylece ekstraselüler matriks yapımı ve mineralizasyonunu uyardığı ortaya konmuştur.*

Eksozom ve KEHA için belirlenen ED50 ile hazırlanan *formülasyon* osteoblastlar üzerinde denendiğinde *formülasyonun* diğer tüm kontrol gruplarından (sadece besiyeri, sadece KEHA, sadece eksozom ve sadece AnV) anlamlı olarak yüksek ALP aktivitesi gösterdiği, dolayısıyla mineralizasyonu indüklediği ortaya koyulmuştur. Sadece eksozom ve sadece KEHA gruplarında ise sadece besiyeri ve sadece AnV kontrollerinin üzerinde anlamlı bir etki görülmüştür. Kalsiyum fosfat ve MKH eksozomunun beraber kullanıldığı sınırlı sayıda *in vitro* kemikleşme çalışması bulunmaktadır [27, 240-243]. İnsan kaynaklı indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden elde edilmiş MKH eksozomlarının iki farklı dozunun ( $5 \times 10^{11}$  ve  $1 \times 10^{12}$  partikül/ml), insan Kİ-MKH'leri üzerinde ALP aktivitesi 10. günde değerlendirilmiş, aktivitenin bu süre içinde doz bağımlı olarak arttığı sonucuna varılmıştır [27]. Bu artış 10 gün içinde kontrole göre  $5 \times 10^{11}$  partikül/ml eksozom içeren dozun ALP aktivitesini 2 ye,  $1 \times 10^{12}$  partikül/ml eksozom içeren dozunun ise 3'e katladığı görülmüştür [27]. Çalışmamızda daha düşük dozda (partikül miktarına denk gelen doz hesaplandığında  $4.6 \times 10^8$  partikül/ml) ve 7 gün içinde kontrole göre ALP aktivasyonunu 1.5 kat arttırmıştır. Çalışmamızda eksozomların uzun sürede degrade olabileme ihtimalleri düşünülerek ALP aktivasyon analiz süresi 7 gün olarak diğer çalışmalara göre daha kısa tutulmuştur. Hidrojel içine eksozomların (25 µg/ml) ve HAp partiküllerinin yüklendiği bir çalışmada, sadece eksozomların mineralizasyona etkisi fare osteoblast hücre hattı, MC3T3, üzerinde 14 günlük ALP aktivitesi ile değerlendirilmiştir [240]. Sonuçta eksozom içermeyen gruba göre, sadece osteojenik farklılaşma besiyeri içeren grubun ALP aktivitesi; osteojenik farklılaşma besiyeri ve eksozom içeren grubun ise sadece osteojenik farklılaşma besiyeri içeren grubun ALP aktivitesine göre yüksek olduğu görülmüştür [240]. Kullanılan eksozom dozu yönünden çalışma benzer olsa da eksozom

ve HAp içeren kompozit malzemenin matriks sentezi ve mineralizasyona etkileri üzerine inceleme yapılmamıştır [240]. Hücre hatlarının farklı olması da sonucu etkileyebilecek faktörlerden biridir. Eksozom ve osteojenik farklılaşma besiyeri içeren grubun ALP aktivitesi ile sadece osteojenik farklılaşma besiyeri içeren grubunki karşılaştırıldığı zaman 14 günde ortaya çıkan fark en fazla 1.5 kat olarak görülmektedir [240]. Osteoblastlar üzerinde eksozom ve KEHA için proliferatif etkili doz çalışması ilk defa bu tez çalışmasında yapılmıştır. Çalışmamızda proliferatif etkili dozlarda KEHA ve insan Kİ-MKH eksozomlarının beraber uygulandığı grubun 7 gün içindeki ALP aktivitesi, sadece besiyeri, sadece KEHA ve sadece eksozom içeren kontrol gruplarına göre 1.5 kat daha fazladır. Buna göre eksozomlar ve KEHA içeren formülasyonun sadece eksozom uygulamasından daha etkili ve hızlı mineralizasyona neden olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasındaki formülasyonun *in vitro* koşullarda analiz edilmesinden kaynaklı sınırlaması bulunmaktadır. Tez çalışması kapsamında orijinal olarak geliştirilen formülasyonun osteoindüktif ve osteokondüktif etkileri mutlaka sağlıklı ve hastalıklı *in vivo* hayvan modellerinde de değerlendirilmelidir. Diğer yandan bu tez çalışmasında da kullanılan RTCA tekniği, ilaç geliştirme çalışmalarında geçerli ve güvenilir olarak kullanılan ve *in vitro* ortamda gerçekleştirilmesine rağmen gerçek zamanlı veri sağladığından doz ve zaman bağımlı etkiler için *in vivo* koşulları modelleyebilen bir tekniktir [245-247]. Çalışmamız için istatistiksel doğruluk onaylandığından, belirtilen sınırlama gelecekteki *in vivo* ve klinik çalışmaları kısıtlamamaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile ilk kez KEHA nanopartiküllerinin, AnV aracılığı ile insan Kİ-MKH eksozomlarına bağlanarak orijinal ve yenilikçi, biyomühendislik ürünü, yüksek teknolojik, kişiye özel ve hedefli bir formülasyon geliştirilerek *in vitro* koşullarda insan osteoblastlarındaki yenileyici etkisi ortaya konmuştur. Bu yeni formülasyonun *in vivo* hastalık modellerindeki deneysel validasyonunu takiben klinikteki metabolik ya da travmatik kemik hasarlarının onarılmasında allojenik ya da otojenik, kişiye özel bir tedavi ajanı olarak yer alma potansiyeli bulunmaktadır. Tez kapsamındaki biyomühendislik temelli yeni tedavi ürününün ülkemizin ortopedik ve travmatik kemik kayıplarının tedavisine ait uluslararası pazardaki rekabet gücünü arttırma hedefini karşılaması önemlidir.

## 6. SONUÇLAR

Tez kapsamında;

- Kimyasal çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş, en az bir yüzeyinin uzunluğu 100nm'den küçük, biyobozunur ve biyouyumlu KEHA nanopartikülleri, ultrasantrifüjleme yöntemi ile insan Kİ-MKH'lerden izole edilen, yaklaşık 110nm çaplı, zarında CD9, 63 ve 81 tetraspaninlerini içeren eksozomlar AnV aracılığı ile başarı ile bağlanmıştır.
- İnsan fetal osteoblastlar üzerinde etkili proliferatif dozları gerçek zamanlı belirlenmiş olan KEHA (0.1µg/ml) ve insan Kİ-MKH eksozomlarının (25µg/ml) AnV ile bağlanmasından oluşan kompleks malzemenin, insan fetal osteoblastlarındaki matriks sentezi ve mineralizasyonunu 0-7 gün aralığında arttırdığı ALP aktivitesinin değerlendirilmesi ile ortaya konmuştur.

## 7. KAYNAKLAR

- [1] K.D. Schuiling, K. Robinia, R. Nye, Osteoporosis update, *Journal of midwifery & women's health*, 56 (2011) 615-627.
- [2] J. Moya-Angeler, A.L. Gianakos, J.C. Villa, A. Ni, J.M. Lane, Current concepts on osteonecrosis of the femoral head, *World journal of orthopedics*, 6 (2015) 590.
- [3] K. Saikia, T. Bhattacharya, S. Bhuyan, D. Talukdar, S. Saikia, P.J.I.j.o.o. Jitesh, Calcium phosphate ceramics as bone graft substitutes in filling bone tumor defects, 42 (2008) 169.
- [4] I. Denry, L.T. Kuhn, Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Dental Materials*, 32 (2016) 43-53.
- [5] M.J. Lespasio, N. Sodhi, M.A. Mont, Osteonecrosis of the hip: a primer, *The Permanente Journal*, 23 (2019).
- [6] W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, M.J.M.T. Böhner, Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?, 19 (2016) 69-87.
- [7] C. Chen, X. Kong, S.-M. Zhang, I.-S. Lee, Characterization and in vitro biological evaluation of mineral/osteogenic growth peptide nanocomposites synthesized biomimetically on titanium, *Applied Surface Science*, 334 (2015) 62-68.
- [8] M. Allais, P.E. Maurette, N.G. de Moraes, T.B. da Costa, S. Fraga, E.D.d.O. e Silva, J.R. Laureano Filho, C.M.B. de Castro, Comparative study of bone regeneration in critical cranial bone defects using bone marrow adult stem cells and calcium phosphate, *Revista Espanola de Cirugia Oral y Maxilofacial*, 37 (2015) 15-22.
- [9] N. Huettner, T.R. Dargaville, A. Forget, Discovering cell-adhesion peptides in tissue engineering: beyond RGD, *Trends in biotechnology*, 36 (2018) 372-383.
- [10] W. Chen, J. Liu, N. Manuchehrabadi, M.D. Weir, Z. Zhu, H.H. Xu, Umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cell seeding on macroporous calcium phosphate for bone regeneration in rat cranial defects, *Biomaterials*, 34 (2013) 9917-9925.
- [11] D. Wang, A. Tabassum, G. Wu, L. Deng, D. Wismeijer, Y. Liu, Bone regeneration in critical-sized bone defect enhanced by introducing osteoinductivity to biphasic calcium phosphate granules, *Clinical oral implants research*, 28 (2017) 251-260.

- [12] X. Shu, J. Feng, J. Feng, X. Huang, L. Li, Q. Shi, Combined delivery of bone morphogenetic protein-2 and insulin-like growth factor-1 from nano-poly ( $\gamma$ -glutamic acid)/ $\beta$ -tricalcium phosphate-based calcium phosphate cement and its effect on bone regeneration in vitro, *Journal of biomaterials applications*, 32 (2017) 547-560.
- [13] E. Bedeloğlu, S. Ersanlı, V. Arisan, Vascular endothelial growth factor and biphasic calcium phosphate in the endosseous healing of femoral defects: An experimental rat study, *J Dent Sci*, 12 (2017) 7-13.
- [14] E. García-Gareta, M.J. Coathup, G.W. Blunn, Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration, *Bone*, 81 (2015) 112-121.
- [15] A. Oryan, M.B. Eslaminejad, A. Kamali, S. Hosseini, A. Moshiri, H. Baharvand, Mesenchymal stem cells seeded onto tissue-engineered osteoinductive scaffolds enhance the healing process of critical-sized radial bone defects in rat, *Cell and tissue research*, 374 (2018) 63-81.
- [16] C. Zhang, K. Hu, X. Liu, M.A. Reynolds, C. Bao, P. Wang, L. Zhao, H.H. Xu, Novel hiPSC-based tri-culture for pre-vascularization of calcium phosphate scaffold to enhance bone and vessel formation, *Materials Science and Engineering: C*, 79 (2017) 296-304.
- [17] L. Von Bahr, I. Batsis, G. Moll, M. Hägg, A. Szakos, B. Sundberg, M. Uzunel, O. Ringden, K. Le Blanc, Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation, *Stem cells*, 30 (2012) 1575-1578.
- [18] A.A. Farooqi, N.N. Desai, M.Z. Qureshi, D.R.N. Librelotto, M.L. Gasparri, A. Bishayee, S.M. Nabavi, V. Curti, M. Daglia, Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds, *Biotechnology advances*, 36 (2018) 328-334.
- [19] G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends, *Journal of Cell Biology*, 200 (2013) 373-383.
- [20] H. Deng, C. Sun, Y. Sun, H. Li, L. Yang, D. Wu, Q. Gao, X. Jiang, Lipid, protein, and microRNA composition within mesenchymal stem cell-derived exosomes, *Cellular reprogramming*, 20 (2018) 178-186.
- [21] A. Marote, F.G. Teixeira, B. Mendes-Pinheiro, A.J. Salgado, MSCs-derived exosomes: cell-secreted nanovesicles with regenerative potential, *Front Pharmacol*, 7 (2016) 231.

- [22] L. Cheng, K. Zhang, S. Wu, M. Cui, T. Xu, Focus on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Opportunities and Challenges in Cell-Free Therapy Focus on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Opportunities and Challenges in Cell-Free Therapy, *Focus*, (2021).
- [23] G. Van Niel, G. d'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nature reviews Molecular cell biology*, 19 (2018) 213.
- [24] S. Cosenza, K. Toupet, M. Maumus, P. Luz-Crawford, O. Blanc-Brude, C. Jorgensen, D. Noël, Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis, *Theranostics*, 8 (2018) 1399.
- [25] J. Burrello, S. Monticone, C. Gai, Y. Gomez, S. Kholia, G. Camussi, Stem cell-derived extracellular vesicles and immune-modulation, *Frontiers in cell and developmental biology*, 4 (2016) 83.
- [26] J. Rezaie, S. Ajezi, Ç.B. Avci, M. Karimipour, M.H. Geranmayeh, A. Nourazarian, E. Sokullu, A. Rezaabakhsh, R. Rahbarghazi, Exosomes and their application in biomedical field: difficulties and advantages, *Mol Neurobiol*, 55 (2018) 3372-3393.
- [27] J. Zhang, X. Liu, H. Li, C. Chen, B. Hu, X. Niu, Q. Li, B. Zhao, Z. Xie, Y. Wang, Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway, *Stem cell research & therapy*, 7 (2016) 1-14.
- [28] G. Borciani, G. Montalbano, N. Baldini, G. Cerqueni, C. Vitale-Brovarone, G. Ciapetti, Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches, *Acta biomaterialia*, 108 (2020) 22-45.
- [29] U. Topaloğlu, M.A. KETANİ, B.G. SARUHAN, Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10 (2017) 62-71.
- [30] R. Aaron, *Orthopaedic Basic Science: Foundations of Clinical Practice 5: Ebook without Multimedia*, Lippincott Williams & Wilkins 2019.
- [31] S. Tuzun, N. Eskiuyurt, U. Akarirmak, M. Saridogan, M. Senocak, H. Johansson, J.A. Kanis, Incidence of hip fracture and prevalence of osteoporosis in Turkey: the FRACTURK study, *Osteoporosis international*, 23 (2012) 949-955.

- [32] Y. Xie, Y. Gao, L. Zhang, Y. Chen, W. Ge, P. Tang, Involvement of serum-derived exosomes of elderly patients with bone loss in failure of bone remodeling via alteration of exosomal bone-related proteins, *Aging Cell*, 17 (2018) e12758.
- [33] D.M. Black, C.J. Rosen, Postmenopausal osteoporosis, *New England Journal of Medicine*, 374 (2016) 254-262.
- [34] F.D. Shuler, J. Conjeski, D. Kendall, J. Salava, Understanding the burden of osteoporosis and use of the World Health Organization FRAX, *Orthopedics*, 35 (2012) 798-805.
- [35] J.C. Villa, S. Husain, J.P. van der List, A. Gianakos, J.M. Lane, Treatment of pre-collapse stages of osteonecrosis of the femoral head: a systematic review of randomized control trials, *HSS Journal*, 12 (2016) 261-271.
- [36] C. Balçık, A. Şenköylü, N. Koç, M. Timuçin, P. Korkusuz, F. Korkusuz, Segmenter defekt içeren uzun kemik kırıklarının tedavisinde kullanılan gözenekli hidroksiapatit ve kalsiyum fosfat seramik bloklarının in vivo uyumluluğu, *Eklem Hastalık Cerrahisi*, 14 (2003) 39-44.
- [37] A. Hepgüler, D. Gökay, Osteoporozdan korunma ve tedavi yöntemleri, in: H.B. Şebnem Ataman (Ed.) *ROMATOLOJİ-e book*, TRASD, Ankara, 2019, pp. 1-43.
- [38] F. Korkusuz, E. Tomin, D.N. Yetkinler, M. Timuçin, A. Öztürk, P. Korkusuz, Yapay kemik dokusu, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi, TOTBİD Dergisi*, 10 (2011) 134-142.
- [39] F. Baino, G. Novajra, C. Vitale-Brovarone, Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3 (2015) 202.
- [40] A. Alsayed, S. Anil, J.A. Jansen, J.J. van den Beucken, Comparative evaluation of the combined application of titanium implants and calcium phosphate bone substitutes in a rabbit model, *Clinical oral implants research*, 26 (2015) 1215-1221.
- [41] S.K. Maiti, M. Shivakumar, D. Mohan, N. Kumar, K.P. Singh, Mesenchymal stem cells of different origin-seeded bioceramic construct in regeneration of bone defect in rabbit, *Tissue engineering and regenerative medicine*, 15 (2018) 477-492.
- [42] R. Wen, X. Wang, Y. Lu, Y. Du, X. Yu, The combined application of rat bone marrow mesenchymal stem cells and bioceramic materials in the regeneration of dental



pulp-like tissues, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13 (2020) 1492.

[43] Y. Haluza, V. Balatskyi, O. Piven, The usage of mesenchymal stem cells and bioceramics in bone tissue bioengineering, *Biopolymers & Cell*, 35 (2019).

[44] Y. Hedong, C. Yongji, M. Min, C. Shaojuan, N. Xiaobing, L. Weidong, L. Jie, Polyetheretherketone/biphasic bioceramic composite coated with vascular endothelial growth factor to repair mandibular defects, *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 23 (2019) 184.

[45] Z. Bal, F. Korkusuz, H. Ishiguro, R. Okada, J. Kushioka, R. Chijimatsu, J. Kodama, D. Tateiwa, Y. Ukon, S. Nakagawa, A novel nano-hydroxyapatite/synthetic polymer/bone morphogenetic protein-2 composite for efficient bone regeneration, *The Spine Journal*, (2021).

[46] J. Buckwalter, R. Cooper, Bone structure and function, *Instructional course lectures*, 36 (1987) 27-48.

[47] R. Florencio-Silva, G.R.d.S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simões, P.S. Cerri, Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells, *Biomed Res Int*, 2015 (2015).

[48] X. Lin, S. Patil, Y.-G. Gao, A. Qian, The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration, *Front Pharmacol*, 11 (2020).

[49] M.H. Ross, W. Pawlina, T.A.B. Sunderland, *Atlas of Descriptive Histology*. By, *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*, 83 (2010) 47-51.

[50] N.K. Wittig, M. Laugesen, M.E. Birckbak, F.L. Bach-Gansmo, A. Pacureanu, S. Bruns, M.H. Wendelboe, A. Brüel, H.O. Sørensen, J.S. Thomsen, Canalicular junctions in the osteocyte lacuno-canalicular network of cortical bone, *ACS nano*, 13 (2019) 6421-6430.

[51] S.M. Ott, Cortical or trabecular bone: what's the difference?, *American journal of nephrology*, 47 (2018) 373-376.

[52] B. Clarke, Normal bone anatomy and physiology, *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3 (2008) S131-S139.

[53] R.H. Christenson, Biochemical markers of bone metabolism: an overview, *Clinical biochemistry*, 30 (1997) 573-593.

- [54] G. Banfi, G. Lombardi, A. Colombini, G. Lippi, Bone metabolism markers in sports medicine, *Sports Medicine*, 40 (2010) 697-714.
- [55] D. Konukoglu, Bone markers, *Int J Med Biochem*, 2 (2019) 65-78.
- [56] A. Singh, G. Gill, H. Kaur, M. Amhmed, H. Jakhu, Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review, *Progress in orthodontics*, 19 (2018) 1-8.
- [57] D. Fodor, C. Bondor, A. Albu, S.-p. Simon, A. Craciun, L. Muntean, The value of osteopontin in the assessment of bone mineral density status in postmenopausal women, *Journal of Investigative Medicine*, 61 (2013) 15-21.
- [58] A. Narayanan, N. Srinaath, M. Rohini, N. Selvamurugan, Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation, *Life sciences*, 232 (2019) 116676.
- [59] Z. Tang, X. Li, Y. Tan, H. Fan, X. Zhang, The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics, *Regenerative biomaterials*, 5 (2018) 43-59.
- [60] C.H. Linder, B. Ek-Rylander, M. Krumpel, M. Norgård, S. Narisawa, J.L. Millán, G. Andersson, P. Magnusson, Bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase: potential co-regulators of bone mineralization, *Calcified tissue international*, 101 (2017) 92-101.
- [61] E.E. Golub, K. Boesze-Battaglia, The role of alkaline phosphatase in mineralization, *Current opinion in Orthopaedics*, 18 (2007) 444-448.
- [62] S.K. Bhadada, S.D. Rao, Role of phosphate in biomineralization, *Calcified tissue international*, (2020) 1-9.
- [63] S. Vimalraj, Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization, *Gene*, (2020) 144855.
- [64] T. Hasegawa, Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization, *Histochemistry and cell biology*, 149 (2018) 289-304.
- [65] A.L. Boskey, R. Coleman, Aging and bone, *Journal of dental research*, 89 (2010) 1333-1348.
- [66] E. Seeman, Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis, *Osteoporosis international*, 14 (2003) 2-8.

- [67] Q. Liu, S. Huang, J.P. Matinlinna, Z. Chen, H. Pan, Insight into biological apatite: physiochemical properties and preparation approaches, *Biomed Res Int*, 2013 (2013).
- [68] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, *Materials*, 2 (2009) 399-498.
- [69] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphates in dentistry, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24 (2013) 1335-1363.
- [70] S.N. Danilchenko, A.N. Kalinkevich, R.A. Moskalenko, V.N. Kuznetsov, A.V. Kochenko, E.V. Husak, V.V. Starikov, F. Liu, J. Meng, J. Lü, Structural and crystal-chemical characteristics of the apatite deposits from human aortic walls, *Interventional Medicine and Applied Science*, 10 (2018) 110-119.
- [71] Q. Daniela, B. Federica, F.D. Lofaro, The biology of vascular calcification, *International Review of Cell and Molecular Biology*, Elsevier2020, pp. 261-353.
- [72] A. Talal, S.K. Hamid, M. Khan, A.S. Khan, Structure of biological apatite: bone and tooth, *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites*, Elsevier2020, pp. 1-19.
- [73] N. Eliaz, N. Metoki, Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications, *Materials*, 10 (2017) 334.
- [74] H. Orimo, The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease, *Journal of Nippon Medical School*, 77 (2010) 4-12.
- [75] M. Murshed, Mechanism of bone mineralization, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8 (2018) a031229.
- [76] M. Vallet-Regi, J.M. González-Calbet, Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in solid state chemistry*, 32 (2004) 1-31.
- [77] Y.-R.V. Shih, Y. Hwang, A. Phadke, H. Kang, N.S. Hwang, E.J. Caro, S. Nguyen, M. Siu, E.A. Theodorakis, N.C. Gianneschi, Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (2014) 990-995.
- [78] G.-Y. Jung, Y.-J. Park, J.-S. Han, Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21 (2010) 1649-1654.

- [79] S. Khoshniat, A. Bourguine, M. Julien, M. Petit, P. Pilet, T. Rouillon, M. Masson, M. Gatius, P. Weiss, J. Guicheux, Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium, *Bone*, 48 (2011) 894-902.
- [80] B. Acharya, S.Y. Chun, S.Y. Kim, C. Moon, H.I. Shin, E.K. Park, Surface immobilization of MEPE peptide onto HA/ $\beta$ -TCP ceramic particles enhances bone regeneration and remodeling, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100 (2012) 841-849.
- [81] Y. Takeda, Y. Honda, S. Kakinoki, T. Yamaoka, S. Baba, Surface modification of porous alpha-tricalcium phosphate granules with heparin enhanced their early osteogenic capability in a rat calvarial defect model, *Dental materials journal*, 37 (2018) 575-581.
- [82] C. Wang, H. He, L. Wang, Y. Jiang, Y. Xu, Reduced miR-144-3p expression in serum and bone mediates osteoporosis pathogenesis by targeting RANK, *Biochemistry and Cell Biology*, 96 (2018) 627-635.
- [83] C.-H. Cheng, Y.-H. Lai, Y.-W. Chen, C.-H. Yao, K.-Y. Chen, Immobilization of bone morphogenetic protein-2 to gelatin/avidin-modified hydroxyapatite composite scaffolds for bone regeneration, *Journal of biomaterials applications*, 33 (2019) 1147-1156.
- [84] N. Ardjomandi, J. Huth, D. Stamov, A. Henrich, C. Klein, H.-P. Wendel, S. Reinert, D. Alexander, Surface biofunctionalization of  $\beta$ -TCP blocks using aptamer 74 for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 67 (2016) 267-275.
- [85] C. Chen, H. Li, X. Kong, S.-M. Zhang, I.-S. Lee, Immobilizing osteogenic growth peptide with and without fibronectin on a titanium surface: effects of loading methods on mesenchymal stem cell differentiation, *International journal of nanomedicine*, 10 (2015) 283.
- [86] L.M. Alvarez, J.J. Rivera, L. Stockdale, S. Saini, R.T. Lee, L.G. Griffith, Tethering of epidermal growth factor (EGF) to beta tricalcium phosphate ( $\beta$ TCP) via fusion to a high affinity, multimeric  $\beta$ TCP-binding peptide: Effects on human multipotent stromal cells/connective tissue progenitors, *PLoS One*, 10 (2015) e0129600.
- [87] B. Duan, M. Wang, Customized Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: design, fabrication, surface modification and sustained release of growth factor, *Journal of the Royal Society Interface*, 7 (2010) S615-S629.

- [88] K.M. Hennessy, B.E. Pollot, W.C. Clem, M.C. Phipps, A.A. Sawyer, B.K. Culpepper, S.L. Bellis, The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces, *Biomaterials*, 30 (2009) 1898-1909.
- [89] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8 (2006) 315-317.
- [90] M. Nakano, K. Kubota, E. Kobayashi, T.S. Chikenji, Y. Saito, N. Konari, M. Fujimiya, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by increasing the expression of microRNA-146a in hippocampus, *Scientific reports*, 10 (2020) 1-15.
- [91] H.-K. Yip, W.-F. Fang, Y.-C. Li, F.-Y. Lee, C.-H. Lee, S.-N. Pei, M.-C. Ma, K.-H. Chen, P.-H. Sung, M.S. Lee, Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for acute respiratory distress syndrome, *Critical care medicine*, 48 (2020) e391-e399.
- [92] C.J. Rogers, R.J. Harman, B.A. Bunnell, M.A. Schreiber, C. Xiang, F.-S. Wang, A.F. Santidrian, B.R. Miney, Rationale for the clinical use of adipose-derived mesenchymal stem cells for COVID-19 patients, *Journal of translational medicine*, 18 (2020) 1-19.
- [93] J. Ha, D. Bharti, Y.-H. Kang, S.-Y. Lee, S.-J. Oh, S.-B. Kim, C.-H. Jo, J.-H. Son, I.-Y. Sung, Y.-C. Cho, Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cell Potential to Differentiate into Smooth Muscle-Like Cells In Vitro, *Biomed Res Int*, 2021 (2021).
- [94] K.-H. Kim, E.-Y. Kim, G.J. Kim, J.-J. Ko, K.Y. Cha, M.K. Koong, K.-A. Lee, Human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate ovarian function via miR-145 and bone morphogenetic protein signaling in aged rats, *Stem cell research & therapy*, 11 (2020) 1-14.
- [95] C. Merino-González, F.A. Zuñiga, C. Escudero, V. Ormazabal, C. Reyes, E. Nova-Lamperti, C. Salomón, C. Aguayo, Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potencial clinical application, *Frontiers in physiology*, 7 (2016) 24.
- [96] M.R. Iaquinta, E. Mazzoni, I. Bononi, J.C. Rotondo, C. Mazziotta, M. Montesi, S. Sprio, A. Tampieri, M. Tognon, F. Martini, Adult stem cells for bone regeneration and repair, *Frontiers in cell and developmental biology*, 7 (2019) 268.

- [97] S.K. Maiti, A.R. Ninu, P. Sangeetha, D.D. Mathew, P. Tamilmahan, D. Kritaniya, N. Kumar, J. Hescheler, Mesenchymal stem cells-seeded bio-ceramic construct for bone regeneration in large critical-size bone defect in rabbit, *Journal of stem cells & regenerative medicine*, 12 (2016) 87.
- [98] K.A.-E. Saad, A.G.T. Abu-Shahba, E.A.-E. El-Drieny, M.S. Khedr, Evaluation of the role of autogenous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for the repair of mandibular bone defects in rabbits, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 43 (2015) 1151-1160.
- [99] B. Zhang, Q. Luo, A. Halim, Y. Ju, Y. Morita, G. Song, Directed differentiation and paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells: potential implications for tendon repair and regeneration, *Current stem cell research & therapy*, 12 (2017) 447-454.
- [100] R. Rohban, T.R. Pieber, Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential, *Stem cells international*, 2017 (2017).
- [101] Y. Han, X. Li, Y. Zhang, Y. Han, F. Chang, J. Ding, Mesenchymal stem cells for regenerative medicine, *Cells*, 8 (2019) 886.
- [102] Y. Qin, J. Guan, C. Zhang, Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration, *Postgraduate medical journal*, 90 (2014) 643-647.
- [103] W.S. Park, S.Y. Ahn, S.I. Sung, J.-Y. Ahn, Y.S. Chang, Strategies to enhance paracrine potency of transplanted mesenchymal stem cells in intractable neonatal disorders, *Pediatric research*, 83 (2018) 214-222.
- [104] I. Linero, O. Chaparro, Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration, *PLoS One*, 9 (2014) e107001.
- [105] P.R. Baraniak, T.C. McDevitt, Stem cell paracrine actions and tissue regeneration, *Regenerative medicine*, 5 (2010) 121-143.
- [106] G. Lou, Z. Chen, M. Zheng, Y. Liu, Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases, *Experimental & molecular medicine*, 49 (2017) e346-e346.
- [107] H.-H. Wu, O.K. Lee, Exosomes from mesenchymal stem cells induce the conversion of hepatocytes into progenitor oval cells, *Stem cell research & therapy*, 8 (2017) 1-11.

- [108] I. Huang-Doran, C.-Y. Zhang, A.J.T.i.E. Vidal-Puig, *Metabolism, Extracellular vesicles: novel mediators of cell communication in metabolic disease*, 28 (2017) 3-18.
- [109] L. Rauschenberger, D. Staar, K. Thom, C. Scharf, S. Venz, G. Homuth, R. Schlüter, L.O. Brandenburg, P. Ziegler, U. Zimmermann, *Exosomal particles secreted by prostate cancer cells are potent mRNA and protein vehicles for the interference of tumor and tumor environment*, *The Prostate*, 76 (2016) 409-424.
- [110] H. Wei, Y. Xu, Q. Chen, H. Chen, X. Zhu, Y. Li, *Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-223 regulates neuronal cell apoptosis*, *Cell death & disease*, 11 (2020) 1-11.
- [111] E.S. Salem, G.-C. Fan, *Pathological effects of exosomes in mediating diabetic cardiomyopathy*, *Exosomes in Cardiovascular Diseases*, (2017) 113-138.
- [112] H. Yu, Z. Wang, *Cardiomyocyte-derived exosomes: biological functions and potential therapeutic implications*, *Frontiers in physiology*, 10 (2019) 1049.
- [113] N.P. Hessvik, A. Llorente, *Current knowledge on exosome biogenesis and release*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75 (2018) 193-208.
- [114] X.B. Li, Z.R. Zhang, H.J. Schluesener, S.Q. Xu, *Role of exosomes in immune regulation*, *Journal of cellular and molecular medicine*, 10 (2006) 364-375.
- [115] D.W. Greening, S.K. Gopal, R. Xu, R.J. Simpson, W. Chen, *Exosomes and their roles in immune regulation and cancer*, *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier, 2015, pp. 72-81.
- [116] R. Kalluri, V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes*, *Science*, 367 (2020).
- [117] N. Javeed, D. Mukhopadhyay, *Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: a comprehensive review*, *Journal of biomedical research*, 31 (2017) 386.
- [118] R.L. Maus, J.W. Jakub, T.J. Hieken, W.K. Nevala, T.A. Christensen, S.L. Sutor, T.J. Flotte, S.N. Markovic, *Identification of novel, immune-mediating extracellular vesicles in human lymphatic effluent draining primary cutaneous melanoma*, *Oncoimmunology*, 8 (2019) e1667742.
- [119] R.C. Ching, P.J. Kingham, *The role of exosomes in peripheral nerve regeneration*, *Neural Regeneration Research*, 10 (2015) 743.

- [120] K.J. McKelvey, K.L. Powell, A.W. Ashton, J.M. Morris, S.A. McCracken, Exosomes: mechanisms of uptake, *Journal of circulating biomarkers*, 4 (2015) 7.
- [121] M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, C. Théry, Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication, *Nature cell biology*, 21 (2019) 9-17.
- [122] B. Derkus, K.C. Emregul, E. Emregul, A new approach in stem cell research—exosomes: their mechanism of action via cellular pathways, *Cell biology international*, 41 (2017) 466-475.
- [123] Z.C. Hao, J. Lu, S.Z. Wang, H. Wu, Y.T. Zhang, S.G. Xu, Stem cell-derived exosomes: A promising strategy for fracture healing, *Cell Proliferation*, 50 (2017) e12359.
- [124] J. Wang, A. Hendrix, S. Hernot, M. Lemaire, E. De Bruyne, E. Van Valckenborgh, T. Lahoutte, O. De Wever, K. Vanderkerken, E. Menu, Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells, *Blood*, 124 (2014) 555-566.
- [125] V. Egea, S. Zahler, N. Rieth, P. Neth, T. Popp, K. Kehe, M. Jochum, C. Ries, Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (2012) E309-E316.
- [126] J. Wei, H. Li, S. Wang, T. Li, J. Fan, X. Liang, J. Li, Q. Han, L. Zhu, L. Fan, let-7 enhances osteogenesis and bone formation while repressing adipogenesis of human stromal/mesenchymal stem cells by regulating HMGA2, *Stem cells and development*, 23 (2014) 1452-1463.
- [127] J. Gao, T. Yang, J. Han, K. Yan, X. Qiu, Y. Zhou, Q. Fan, B. Ma, MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, *Journal of cellular biochemistry*, 112 (2011) 1844-1856.
- [128] W. Liu, M. Qi, A. Konermann, L. Zhang, F. Jin, Y. Jin, The p53/miR-17/Smurf1 pathway mediates skeletal deformities in an age-related model via inhibiting the function of mesenchymal stem cells, *Aging (Albany NY)*, 7 (2015) 205.
- [129] A.M. Schaap-Oziemlak, R.A. Raymakers, S.M. Bergevoet, C. Gilissen, B.J. Jansen, G.J. Adema, G. Kögler, C. le Sage, R. Agami, B.A. van der Reijden, MicroRNA hsa-



miR-135b regulates mineralization in osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells, *Stem cells and development*, 19 (2010) 877-885.

[130] S. Xu, G.C. Santini, K. De Veirman, I.V. Broek, X. Leleu, A. De Becker, B. Van Camp, K. Vanderkerken, I. Van Riet, Upregulation of miR-135b is involved in the impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients, *PLoS One*, 8 (2013) e79752.

[131] R. Bhushan, J. Grünhagen, J. Becker, P.N. Robinson, C.-E. Ott, P. Knaus, miR-181a promotes osteoblastic differentiation through repression of TGF- $\beta$  signaling molecules, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45 (2013) 696-705.

[132] Y. Qin, L. Wang, Z. Gao, G. Chen, C. Zhang, Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo, *Scientific reports*, 6 (2016) 1-11.

[133] Y.J. Kim, S.W. Bae, S.S. Yu, Y.C. Bae, J.S. Jung, miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue, *Journal of Bone and Mineral Research*, 24 (2009) 816-825.

[134] X.-D. Liu, F. Cai, L. Liu, Y. Zhang, A.-L. Yang, MicroRNA-210 is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promotion of VEGF expression and osteoblast differentiation, *Biological chemistry*, 396 (2015) 339-347.

[135] M.Q. Hassan, Y. Maeda, H. Taipaleenmaki, W. Zhang, M. Jafferji, J.A. Gordon, Z. Li, C.M. Croce, A.J. Van Wijnen, J.L. Stein, miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (2012) 42084-42092.

[136] Q. Wang, J. Cai, X.-h. Cai, L. Chen, miR-346 regulates osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, *PLoS One*, 8 (2013) e72266.

[137] J. Huang, L. Zhao, L. Xing, D. Chen, MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation, *Stem cells*, 28 (2010) 357-364.

[138] J.-F. Xu, G.-h. Yang, X.-H. Pan, S.-J. Zhang, C. Zhao, B.-S. Qiu, H.-F. Gu, J.-F. Hong, L. Cao, Y. Chen, Altered microRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *PLoS One*, 9 (2014) e114627.

- [139] H. Luo, H. Gao, F. Liu, B. Qiu, Regulation of Runx2 by microRNA-9 and microRNA-10 modulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *International journal of molecular medicine*, 39 (2017) 1046-1052.
- [140] T. Li, H. Li, Y. Wang, T. Li, J. Fan, K. Xiao, R.C. Zhao, X. Weng, microRNA-23a inhibits osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by targeting LRP5, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 72 (2016) 55-62.
- [141] L. Deng, G. Hu, L. Jin, C. Wang, H. Niu, Involvement of microRNA-23b in TNF- $\alpha$ -reduced BMSC osteogenic differentiation via targeting runx2, *Journal of bone and mineral metabolism*, 36 (2018) 648-660.
- [142] H. Liu, Q. Sun, C. Wan, L. Li, L. Zhang, Z. Chen, MicroRNA-338-3p regulates osteogenic differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells by targeting Runx2 and Fgfr2, *Journal of cellular physiology*, 229 (2014) 1494-1502.
- [143] L. Chen, K. Holmstrøm, W. Qiu, N. Ditzel, K. Shi, L. Hokland, M. Kassem, MicroRNA-34a inhibits osteoblast differentiation and in vivo bone formation of human stromal stem cells, *Stem cells*, 32 (2014) 902-912.
- [144] S. Lauvrak, E. Munthe, S. Kresse, E. Stratford, H. Namløs, L. Meza-Zepeda, O. Myklebost, Functional characterisation of osteosarcoma cell lines and identification of mRNAs and miRNAs associated with aggressive cancer phenotypes, *British journal of cancer*, 109 (2013) 2228-2236.
- [145] A.W. James, Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation, *Scientifica*, 2013 (2013).
- [146] P. Cheng, C. Chen, H.B. He, R. Hu, H.D. Zhou, H. Xie, W. Zhu, R.C. Dai, X.P. Wu, E.Y. Liao, miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B, *Journal of Bone and Mineral Research*, 28 (2013) 1180-1190.
- [147] T. Furuta, S. Miyaki, H. Ishitobi, T. Ogura, Y. Kato, N. Kamei, K. Miyado, Y. Higashi, M. Ochi, Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model, *Stem cells translational medicine*, 5 (2016) 1620-1630.
- [148] S. Fang, C. Xu, Y. Zhang, C. Xue, C. Yang, H. Bi, X. Qian, M. Wu, K. Ji, Y. Zhao, Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs suppress

myofibroblast differentiation by inhibiting the transforming growth factor- $\beta$ /SMAD2 pathway during wound healing, *Stem cells translational medicine*, 5 (2016) 1425-1439.

[149] L. Sun, D. Li, K. Song, J. Wei, S. Yao, Z. Li, X. Su, X. Ju, L. Chao, X. Deng, Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro, *Scientific reports*, 7 (2017) 1-13.

[150] C. Ding, L. Zhu, H. Shen, J. Lu, Q. Zou, C. Huang, H. Li, B. Huang, Exosomal miRNA-17-5p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improves ovarian function in premature ovarian insufficiency by regulating SIRT7, *Stem Cells*, 38 (2020) 1137-1148.

[151] Y.-J. Kim, S. mi Yoo, H.H. Park, H.J. Lim, Y.-L. Kim, S. Lee, K.-W. Seo, K.-S. Kang, Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin, *Biochemical and biophysical research communications*, 493 (2017) 1102-1108.

[152] B. Zhang, L. Shen, H. Shi, Z. Pan, L. Wu, Y. Yan, X. Zhang, F. Mao, H. Qian, W. Xu, Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells: identification, purification, and biological characteristics, *Stem cells international*, 2016 (2016).

[153] G. Sun, G. Li, D. Li, W. Huang, R. Zhang, H. Zhang, Y. Duan, B. Wang, hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation, *Materials Science and Engineering: C*, 89 (2018) 194-204.

[154] S.-F. Ko, H.-K. Yip, Y.-Y. Zhen, C.-C. Lee, C.-C. Lee, C.-C. Huang, S.-H. Ng, J.-W. Lin, Adipose-derived mesenchymal stem cell exosomes suppress hepatocellular carcinoma growth in a rat model: apparent diffusion coefficient, natural killer T-cell responses, and histopathological features, *Stem cells international*, 2015 (2015).

[155] S.R. Baglio, K. Rooijers, D. Koppers-Lalic, F.J. Verweij, M.P. Lanzón, N. Zini, B. Naaijken, F. Perut, H.W. Niessen, N. Baldini, Human bone marrow-and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species, *Stem cell research & therapy*, 6 (2015) 127.

[156] A. J Salgado, R. L Reis, N. Sousa, J. M Gimble, Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine, *Current stem cell research & therapy*, 5 (2010) 103-110.

- [157] Y. Zhu, Y. Wang, B. Zhao, X. Niu, B. Hu, Q. Li, J. Zhang, J. Ding, Y. Chen, Y. Wang, Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis, *Stem cell research & therapy*, 8 (2017) 1-11.
- [158] S.C. Tao, S.C. Guo, M. Li, Q.F. Ke, Y.P. Guo, C.Q. Zhang, Chitosan wound dressings incorporating exosomes derived from microRNA-126-overexpressing synovium mesenchymal stem cells provide sustained release of exosomes and heal full-thickness skin defects in a diabetic rat model, *Stem cells translational medicine*, 6 (2017) 736-747.
- [159] X. Qi, J. Zhang, H. Yuan, Z. Xu, Q. Li, X. Niu, B. Hu, Y. Wang, X. Li, Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats, *International journal of biological sciences*, 12 (2016) 836.
- [160] M. Ge, Y. Wu, R. Ke, T. Cai, J. Yang, X. Mu, Value of osteoblast-derived exosomes in bone diseases, *Journal of Craniofacial Surgery*, 28 (2017) 866-870.
- [161] Y. Qin, R. Sun, C. Wu, L. Wang, C. Zhang, Exosome: a novel approach to stimulate bone regeneration through regulation of osteogenesis and angiogenesis, *International journal of molecular sciences*, 17 (2016) 712.
- [162] R. Narayanan, C.-C. Huang, S. Ravindran, Hijacking the cellular mail: exosome mediated differentiation of mesenchymal stem cells, *Stem cells international*, 2016 (2016).
- [163] H.-S. Kim, D.-Y. Choi, S.J. Yun, S.-M. Choi, J.W. Kang, J.W. Jung, D. Hwang, K.P. Kim, D.-W. Kim, Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells, *Journal of proteome research*, 11 (2012) 839-849.
- [164] W.-B. Zhang, W.-J. Zhong, L. Wang, A signal-amplification circuit between miR-218 and Wnt/ $\beta$ -catenin signal promotes human adipose tissue-derived stem cells osteogenic differentiation, *Bone*, 58 (2014) 59-66.
- [165] L. Holliday, K. McHugh, J. Zuo, J. Aguirre, J. Neubert, W. Rody Jr, Exosomes: novel regulators of bone remodelling and potential therapeutic agents for orthodontics, *Orthodontics & craniofacial research*, 20 (2017) 95-99.

- [166] K.-C. Li, Y.-H. Chang, C.-L. Yeh, Y.-C. Hu, Healing of osteoporotic bone defects by baculovirus-engineered bone marrow-derived MSCs expressing MicroRNA sponges, *Biomaterials*, 74 (2016) 155-166.
- [167] X. Wang, B. Guo, Q. Li, J. Peng, Z. Yang, A. Wang, D. Li, Z. Hou, K. Lv, G. Kan, miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation, *Nature medicine*, 19 (2013) 93-100.
- [168] D. Li, J. Liu, B. Guo, C. Liang, L. Dang, C. Lu, X. He, H.Y.-S. Cheung, L. Xu, C. Lu, Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation, *Nature communications*, 7 (2016) 1-16.
- [169] S. Salunkhe, M. Basak, D. Chitkara, A. Mittal, Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and in vivo imaging & tracking: Strategies and significance, *Journal of Controlled Release*, (2020).
- [170] A.D. Flynn, H. Yin, Lipid-Targeting Peptide Probes for Extracellular Vesicles, *Journal of cellular physiology*, 231 (2016) 2327-2332.
- [171] N. Kastelowitz, R. Tamura, A. Onasoga, T.J. Stalker, O.R. White, P.N. Brown, G.L. Brodsky, L.F. Brass, B.R. Branchford, J. Di Paola, Peptides derived from MARCKS block coagulation complex assembly on phosphatidylserine, *Scientific reports*, 7 (2017) 1-11.
- [172] L.A. Morton, H. Yang, J.P. Saludes, Z. Fiorini, L. Beninson, E.R. Chapman, M. Fleshner, D. Xue, H. Yin, MARCKS-ED peptide as a curvature and lipid sensor, *ACS chemical biology*, 8 (2013) 218-225.
- [173] S.A. Kooijmans, S. Stremersch, K. Braeckmans, S.C. de Smedt, A. Hendrix, M.J. Wood, R.M. Schiffelers, K. Raemdonck, P. Vader, Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles, *Journal of Controlled Release*, 172 (2013) 229-238.
- [174] X. Gao, N. Ran, X. Dong, B. Zuo, R. Yang, Q. Zhou, H.M. Moulton, Y. Seow, H. Yin, Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy, *Science translational medicine*, 10 (2018).
- [175] K. Nakamura, T. Mitamura, T. Takahashi, T. Kobayashi, E. Mekada, Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 18284-18290.

- [176] R.N. Prince, E.R. Schreiter, P. Zou, H.S. Wiley, A.Y. Ting, R.T. Lee, D.A. Lauffenburger, The heparin-binding domain of HB-EGF mediates localization to sites of cell-cell contact and prevents HB-EGF proteolytic release, *Journal of cell science*, 123 (2010) 2308-2318.
- [177] M.A. Lizarbe, J.I. Barrasa, N. Olmo, F. Gavilanes, J. Turnay, Annexin-phospholipid interactions. Functional implications, *International journal of molecular sciences*, 14 (2013) 2652-2683.
- [178] R. Huber, J. Römisch, E. Paques, The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes, *The EMBO journal*, 9 (1990) 3867-3874.
- [179] V. Gerke, C.E. Creutz, S.E. Moss, Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics, *Nature reviews Molecular cell biology*, 6 (2005) 449-461.
- [180] H.B. Pollard, C.J. Pazoles, C.E. Creutz, O. Zinder, Role of intracellular proteins in the regulation of calcium action and transmitter release during exocytosis, *Monographs in neural sciences*, 7 (1980) 106-116.
- [181] S. Chasserot-Golaz, N. Vitale, E. Umbrecht-Jenck, D. Knight, V. Gerke, M.-F. Bader, Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles, *Molecular biology of the cell*, 16 (2005) 1108-1119.
- [182] E. Morel, R.G. Parton, J. Gruenberg, Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis, *Developmental cell*, 16 (2009) 445-457.
- [183] J. Bandorowicz-Pikula, M. Wos, S. Pikula, Do annexins participate in lipid messenger mediated intracellular signaling? A question revisited, *Molecular membrane biology*, 29 (2012) 229-242.
- [184] A. Tomas, C. Futter, S.E. Moss, Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis, *The Journal of cell biology*, 165 (2004) 813-822.
- [185] A. Lewit-Bentley, S. Morera, R. Huber, G. Bodo, The effect of metal binding on the structure of annexin V and implications for membrane binding, *European journal of biochemistry*, 210 (1992) 73-77.

- [186] H.O. van Genderen, H. Kenis, L. Hofstra, J. Narula, C.P. Reutelingsperger, Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783 (2008) 953-963.
- [187] S. Martin, C. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R. Van Schie, D.M. LaFace, D.R. Green, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *The Journal of experimental medicine*, 182 (1995) 1545-1556.
- [188] S. Huerta, E.J. Goulet, S. Huerta-Yepe, E.H. Livingston, Screening and detection of apoptosis, *Journal of Surgical research*, 139 (2007) 143-156.
- [189] A. Twair, I. Kassem, H. Murad, A.Q. Abbady, Secretion of Recombinant Human Annexin V in Fusion with the Super Folder GFP for Labelling Phosphatidylserine-Exposing Membranes, *The Journal of Membrane Biology*, (2021) 1-13.
- [190] L. Iaccarino, A. Ghirardello, M. Canova, M. Zen, S. Bettio, L. Nalotto, L. Punzi, A. Doria, Anti-annexins autoantibodies: their role as biomarkers of autoimmune diseases, *Autoimmunity reviews*, 10 (2011) 553-558.
- [191] S.-H. Lee, P.-H. Lee, B.-G. Kim, J. Hong, A.-S. Jang, Annexin A5 protein as a potential biomarker for the diagnosis of asthma, *Lung*, 196 (2018) 681-689.
- [192] H. Sohma, S.-i. Imai, N. Takei, H. Honda, K. Matsumoto, K. Utsumi, K. Matsuki, E. Hashimoto, T. Saito, Y. Kokai, Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and dementia with lewy bodies, *Frontiers in aging neuroscience*, 5 (2013) 15.
- [193] R.C. Lai, S.K. Lim, Membrane lipids define small extracellular vesicle subtypes secreted by mesenchymal stromal cells, *Journal of lipid research*, 60 (2019) 318-322.
- [194] F. Bakan, A Systematic Study of the Effect of pH on the Initialization of Ca-deficient Hydroxyapatite to  $\beta$ -TCP Nanoparticles, *Materials*, 12 (2019) 354.
- [195] Ş. Şahin, E. Bilgiç, K. Salimi, A. Tuncel, B. Karaosmanoğlu, E.Z. Taşkiran, P. Korkusuz, F. Korkusuz, Development, characterization and research of efficacy on in vitro cell culture of glucosamine carrying hyaluronic acid nanoparticles, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52 (2019) 393-402.

- [196] G. Makowski, M. Ramsby, Differential effect of calcium phosphate and calcium pyrophosphate on binding of matrix metalloproteinases to fibrin: comparison to a fibrin-binding protease from inflammatory joint fluids, *Clinical & Experimental Immunology*, 136 (2004) 176-187.
- [197] J. Carmicheal, C. Hayashi, X. Huang, L. Liu, Y. Lu, A. Krasnoslobodtsev, A. Lushnikov, P.G. Kshirsagar, A. Patel, M. Jain, Label-free characterization of exosome via surface enhanced Raman spectroscopy for the early detection of pancreatic cancer, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 16 (2019) 88-96.
- [198] S. Singh, A. Deshmukh, P. Chaturvedi, C.M. Krishna, Raman spectroscopy in head and neck cancers: toward oncological applications, *Journal of cancer research and therapeutics*, 8 (2012) 126.
- [199] O.A. Graeve, A. Madadi, R. Kanakala, K. Sinha, Analysis of particle and crystallite size in tungsten nanopowder synthesis, *Metallurgical and Materials Transactions A*, 41 (2010) 2691-2697.
- [200] V. Rodríguez-Lugo, T. Karthik, D. Mendoza-Anaya, E. Rubio-Rosas, L. Villaseñor Cerón, M. Reyes-Valderrama, E. Salinas-Rodríguez, Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes: Effect of pH and sintering temperature on structural and morphological properties, *Royal Society open science*, 5 (2018) 180962.
- [201] R. Cuscó, F. Guitian, S. De Aza, L. Artus, Differentiation between hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate by means of  $\mu$ -Raman spectroscopy, *Journal of the European Ceramic Society*, 18 (1998) 1301-1305.
- [202] P. De Aza, F. Guitian, C. Santos, S. De Aza, R. Cusco, L. Artus, Vibrational properties of calcium phosphate compounds. 2. Comparison between hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate, *Chemistry of Materials*, 9 (1997) 916-922.
- [203] S.-C. Liou, S.-Y. Chen, Transformation mechanism of different chemically precipitated apatitic precursors into  $\beta$ -tricalcium phosphate upon calcination, *Biomaterials*, 23 (2002) 4541-4547.
- [204] Q. Tan, D. Xia, X. Ying, miR-29a in Exosomes from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit Fibrosis during Endometrial Repair of Intrauterine Adhesion, *International journal of stem cells*, 13 (2020) 414.
- [205] J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J.P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, C. Théry, Proteomic comparison defines novel markers to



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

[206] D.K. Jeppesen, A.M. Fenix, J.L. Franklin, J.N. Higginbotham, Q. Zhang, L.J. Zimmerman, D.C. Liebler, J. Ping, Q. Liu, R. Evans, Reassessment of exosome composition, *Cell*, 177 (2019) 428-445. e418.

[207] T. Skotland, N.P. Hessvik, K. Sandvig, A. Llorente, Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology, *Journal of lipid research*, 60 (2019) 9-18.

[208] A. Damania, D. Jaiman, A.K. Teotia, A. Kumar, Mesenchymal stromal cell-derived exosome-rich fractionated secretome confers a hepatoprotective effect in liver injury, *Stem cell research & therapy*, 9 (2018) 1-12.

[209] S. Sajeesh, T. Broekelman, R.P. Mecham, A. Ramamurthi, Stem cell derived extracellular vesicles for vascular elastic matrix regenerative repair, *Acta Biomaterialia*, 113 (2020) 267-278.

[210] G.R. Willis, A. Fernandez-Gonzalez, J. Anastas, S.H. Vitali, X. Liu, M. Ericsson, A. Kwong, S.A. Mitsialis, S. Kourembanas, Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 197 (2018) 104-116.

[211] T. Soares Martins, J. Catita, I. Martins Rosa, A.B.d.C.E.S. O, A.G. Henriques, Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches, *PLoS One*, 13 (2018) e0198820.

[212] J. Webber, A. Clayton, How pure are your vesicles?, *J Extracell Vesicles*, 2 (2013) 19861.

[213] D. Freitas, M. Balmaña, J. Poças, D. Campos, H. Osório, A. Konstantinidi, S.Y. Vakhrushev, A. Magalhães, C.A. Reis, Different isolation approaches lead to diverse glycosylated extracellular vesicle populations, *J Extracell Vesicles*, 8 (2019) 1621131.

[214] B. Mead, S. Tomarev, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes promote survival of retinal ganglion cells through mirna-dependent mechanisms, *Stem cells translational medicine*, 6 (2017) 1273-1285.

- [215] G. Lou, L. Chen, C. Xia, W. Wang, J. Qi, A. Li, L. Zhao, Z. Chen, M. Zheng, Y. Liu, MiR-199a-modified exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve hepatocellular carcinoma chemosensitivity through mTOR pathway, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39 (2020) 4.
- [216] M. Ono, N. Kosaka, N. Tominaga, Y. Yoshioka, F. Takeshita, R.-u. Takahashi, M. Yoshida, H. Tsuda, K. Tamura, T. Ochiya, Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells, *Science signaling*, 7 (2014) ra63-ra63.
- [217] Z. Lu, Y. Chen, C. Dunstan, S. Roohani-Esfahani, H. Zreiqat, Priming adipose stem cells with tumor necrosis factor- $\alpha$  preconditioning potentiates their exosome efficacy for bone regeneration, *Tissue Engineering Part A*, 23 (2017) 1212-1220.
- [218] Y. Wang, D. Yu, Z. Liu, F. Zhou, J. Dai, B. Wu, J. Zhou, B.C. Heng, X.H. Zou, H. Ouyang, Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix, *Stem cell research & therapy*, 8 (2017) 1-13.
- [219] J. Qi, Y. Zhou, Z. Jiao, X. Wang, Y. Zhao, Y. Li, H. Chen, L. Yang, H. Zhu, Y. Li, Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth through hedgehog signaling pathway, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42 (2017) 2242-2254.
- [220] N. Xu, Y. Shao, K. Ye, Y. Qu, O. Memet, D. He, J. Shen, Mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate phosgene-induced acute lung injury in rats, *Inhalation toxicology*, 31 (2019) 52-60.
- [221] S.R. Iyer, A.L. Scheiber, P. Yarowsky, R.F. Henn III, S. Otsuru, R.M. Lovering, Exosomes Isolated From Platelet-Rich Plasma and Mesenchymal Stem Cells Promote Recovery of Function After Muscle Injury, *The American Journal of Sports Medicine*, 48 (2020) 2277-2286.
- [222] J. Sun, H. Shen, L. Shao, X. Teng, Y. Chen, X. Liu, Z. Yang, Z. Shen, HIF-1 $\alpha$  overexpression in mesenchymal stem cell-derived exosomes mediates cardioprotection in myocardial infarction by enhanced angiogenesis, *Stem cell research & therapy*, 11 (2020) 1-13.

- [223] H. Cheng, S. Chang, R. Xu, L. Chen, X. Song, J. Wu, J. Qian, Y. Zou, J. Ma, Hypoxia-challenged MSC-derived exosomes deliver miR-210 to attenuate post-infarction cardiac apoptosis, *Stem cell research & therapy*, 11 (2020) 1-14.
- [224] M. Barilani, V. Peli, A. Cherubini, M. Dossena, V. Dolo, L. Lazzari, NG2 as an Identity and Quality Marker of Mesenchymal Stem Cell Extracellular Vesicles, *Cells*, 8 (2019) 1524.
- [225] G.R. Willis, A. Fernandez-Gonzalez, M. Reis, V. Yeung, X. Liu, M. Ericsson, N.A. Andrews, S.A. Mitsialis, S. Kourembanas, Mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles restore lung architecture and improve exercise capacity in a model of neonatal hyperoxia-induced lung injury, *J Extracell Vesicles*, 9 (2020) 1790874.
- [226] R. Ghosh, V. Satarifard, A. Grafmüller, R. Lipowsky, Spherical nanovesicles transform into a multitude of nonspherical shapes, *Nano letters*, 19 (2019) 7703-7711.
- [227] P. Korkusuz, S. Köse, N. Yersal, S. Önen, Magnetic-based cell isolation technique for the selection of stem cells, *Skin Stem Cells*, Springer2018, pp. 153-163.
- [228] V. Mussack, G. Wittmann, M.W. Pfaffl, Comparing small urinary extracellular vesicle purification methods with a view to RNA sequencing—Enabling robust and non-invasive biomarker research, *Biomol Detect Quantif*, 17 (2019) 100089.
- [229] A. Purushothaman, Exosomes from Cell Culture-Conditioned Medium: Isolation by Ultracentrifugation and Characterization, *The Extracellular Matrix*, Springer2019, pp. 233-244.
- [230] C. Gorgun, D. Reverberi, G. Rotta, F. Villa, R. Quarto, R.J.C.p.i.s.c.b. Tasso, Isolation and Flow Cytometry Characterization of Extracellular-Vesicle Subpopulations Derived from Human Mesenchymal Stromal Cells, 48 (2019) e76.
- [231] C. Lässer, M. Eldh, J.J.J. Lötval, Isolation and characterization of RNA-containing exosomes, (2012) e3037.
- [232] M. Macías, V. Rebmann, B. Mateos, N. Varo, J.L. Perez-Gracia, E. Alegre, Á. González, Comparison of six commercial serum exosome isolation methods suitable for clinical laboratories. Effect in cytokine analysis, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 57 (2019) 1539-1545.

- [233] K.O. Böker, N. Lemus-Diaz, R.R. Ferreira, L. Schiller, S. Schneider, J. Gruber, The impact of the CD9 tetraspanin on lentivirus infectivity and exosome secretion, *Molecular Therapy*, 26 (2018) 634-647.
- [234] S.R. Ryu, I. Noda, Y.M. Jung, What is the origin of positional fluctuation of spectral features: true frequency shift or relative intensity changes of two overlapped bands?, *Applied spectroscopy*, 64 (2010) 1017-1021.
- [235] M.M. Roessler, E. Salvadori, Principles and applications of EPR spectroscopy in the chemical sciences, *Chemical Society Reviews*, 47 (2018) 2534-2553.
- [236] J. Xu, T. Yu, C.E. Zois, J.-X. Cheng, Y. Tang, A.L. Harris, W.E. Huang, Unveiling Cancer Metabolism through Spontaneous and Coherent Raman Spectroscopy and Stable Isotope Probing, *Cancers*, 13 (2021) 1718.
- [237] D.E. Garfin, One-dimensional gel electrophoresis, *Methods in Enzymology*, 463 (2009) 497-513.
- [238] E.E. Burkova, A.E. Grigor'eva, D.V. Bulgakov, P.S. Dmitrenok, V.V. Vlassov, E.I. Ryabchikova, S.E. Sedykh, G.A. Nevinsky, Extra purified exosomes from human placenta contain an unpredictable small number of different major proteins, *International journal of molecular sciences*, 20 (2019) 2434.
- [239] L. Santucci, M. Bruschi, G. Del Zotto, F. Antonini, G.M. Ghiggeri, I. Panfoli, G. Candiano, Biological surface properties in extracellular vesicles and their effect on cargo proteins, *Scientific reports*, 9 (2019) 1-12.
- [240] S. Yang, B. Zhu, P. Yin, L. Zhao, Y. Wang, Z. Fu, R. Dang, J. Xu, J. Zhang, N. Wen, Integration of human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomes with hydroxyapatite-embedded hyaluronic acid-alginate hydrogel for bone regeneration, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6 (2020) 1590-1602.
- [241] L. Wang, J. Wang, X. Zhou, J. Sun, B. Zhu, C. Duan, P. Chen, X. Guo, T. Zhang, H. Guo, A New Self-Healing Hydrogel Containing hucMSC-Derived Exosomes Promotes Bone Regeneration, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8 (2020) 1047.
- [242] M. Li, Q.-F. Ke, S.-C. Tao, S.-C. Guo, B.-Y. Rui, Y.-P. Guo, Fabrication of hydroxyapatite/chitosan composite hydrogels loaded with exosomes derived from miR-126-3p overexpressed synovial mesenchymal stem cells for diabetic chronic wound healing, *Journal of Materials Chemistry B*, 4 (2016) 6830-6841.

- [243] S. Chen, Y. Tang, Y. Liu, P. Zhang, L. Lv, X. Zhang, L. Jia, Y. Zhou, Exosomes derived from miR-375-overexpressing human adipose mesenchymal stem cells promote bone regeneration, *Cell proliferation*, 52 (2019) e12669.
- [244] X. Luan, K. Sansanaphongpricha, I. Myers, H. Chen, H. Yuan, D. Sun, Engineering exosomes as refined biological nanoplatfoms for drug delivery, *Acta Pharmacologica Sinica*, 38 (2017) 754-763.
- [245] X. Shao, W. Cui, X. Xie, W. Ma, Y. Zhan, Y. Lin, Treatment of Alzheimer's disease with framework nucleic acids, *Cell proliferation*, 53 (2020) e12787.
- [246] P. Horvath, N. Aulner, M. Bickle, A.M. Davies, E. Del Nery, D. Ebner, M.C. Montoya, P. Östling, V. Pietiäinen, L.S. Price, Screening out irrelevant cell-based models of disease, *Nature reviews Drug discovery*, 15 (2016) 751-769.
- [247] F. Cerignoli, Y.A. Abassi, B.J. Lamarche, G. Guenther, D. Santa Ana, D. Guimet, W. Zhang, J. Zhang, B. Xi, In vitro immunotherapy potency assays using real-time cell analysis, *PLoS One*, 13 (2018) e0193498.

# TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK BEYANI VE RAPORU

