

**İNDÜKLENMİŞ MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERDEN
ELDE EDİLEN EKSOZOMLARIN İN VİTRO YARA
MODELİNDE İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EXOSOMES
OBTAINED FROM INDUCED MESENCHYMAL STEM
CELLS ON HEALING IN IN VITRO WOUND MODEL**

ELİF HATİCE AYTEN

DR. ÖĞR. ÜYESİ ESİN AKBAY ÇETİN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

ÖZET

İNDÜKLENMİŞ MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN EKSOZOMLARIN İN VİTRO YARA MODELİNDE İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Elif Hatice AYTEN

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Esin AKBAY ÇETİN

2023, 80 sayfa

Sunulan tez çalışmasında, UV ışığı ile indüklenmiş ve indüklenmemiş adipoz ve kemik iliği türevli mezenşimal kök hücre (MKH) eksozomlarının iki ve üç boyutlu yara modellerindeki iyileşme potansiyelleri tartışılmıştır. Bu amaçla, adipoz doku kaynaklı (AK) ve kemik iliği kaynaklı (Kİ) MKH'ler üzerinde farklı dozlarda (10, 25, 50, 100 ve 200 mJ/cm²) UV-B uygulaması yapılmıştır. Hücre canlılığı analizi için MTT yöntemi ve hücre ölümünü göstermek için Akridin Turuncusu / Propidyum İyodür ikili boyama yöntemi kullanılmıştır. Yapılan bu analizler sonucunda hücreler üzerinde toksik olmayan en uygun UV-B dozunun 25 mJ/cm² olduğu tespit edilmiştir. Seçilen UV-B dozunun uygulandığı ve uygulanmadığı MKH'lerden eksozom izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen eksozomların çeşitli yöntemlerle karakterizasyonları gerçekleştirilmiş, ardından içerdikleri büyüme faktörleri ve sitokin (IL-6, PDGF-BB, VEGF-A, TGF-β)

seviyelerinin tespiti için Elisa analizleri gerçekleştirilmiştir. İn vitro iki ve üç boyutlu yara modellerinin oluşturulması için, öncelikle insan keratinosit (HaCaT) ve insan fibroblast (HDF) hücre hatları çoğaltılmıştır. İki boyutlu yara modeli oluşturmak için fibroblast ve keratinosit hücreleri ko-kültürlendikten sonra ‘çizik yara modeli’ oluşturulmuş ve elde edilen eksozomların farklı dozları (1, 5 ve 10 µg/ml) yara modeline uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu takibi için 12, 24, 36 ve 48. saatlerde Alamar Blue analizi, yara kapanma miktarı analizi için ise inverted mikroskop ile çekilen fotoğraflar üzerinden Image J programı kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Çizik testi sonuçlarına göre AKMKH eksozomlarından yara iyileşme analizlerindeki en etkin dozun 10 µg/ml, KİMKH eksozomlarında ise 5 µg/ml olduğu sonucuna varılmıştır. Son olarak, üç boyutlu yara modeli için, transwell sistemde ‘Hava-Sıvı Arayüzü’ yöntemi ile önce deri modeli sonrasında yaralar oluşturulmuştur. Üç boyutlu yara modellerine uygulanan eksozom dozları, çizik yara modeli sonuçlarından elde edilen dozlar olmuştur. Bu modelde iyileşme aşamalarının incelenmesi için histolojik kesitlerden Image J ile rastgele alınan ölçümlerden iyileşme oranları elde edilmiştir. Sonuçlar iki boyutlu modeli destekler nitelikte bulunmuştur. Özellikle UV’li AKMKH eksozomlarının 10 µg/ml dozunda en yüksek yara kapanması gözlenirken, negatif kontrol grubunda en düşük yara kapanma oranı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, UV-B ile indüklenen MKH eksozomlarının hem iki boyutlu hem de üç boyutlu in vitro yara modellerinde iyileşme üzerindeki potansiyellerinde artış olduğu görülmüştür. UV ışığının MKH eksozomları üzerindeki etkilerinin daha detaylı incelenmesi için moleküler düzeyde analizler ile yara iyileşmesindeki etkisinin incelenebilmesi için in vivo deneyler yapılması bu alandaki çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Mezenşimal kök hücre, eksozom, UV ışığı, HaCaT, HDF, çizik testi, üç boyutlu yara modeli, Hava-Sıvı Arayüzü Kültürü

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EXOSOMES OBTAINED FROM INDUCED MESENCHYMAL STEM CELLS ON HEALING IN IN VITRO WOUND MODEL

Elif Hatice AYTEN

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Esin AKBAY ÇETİN

2023, 80 pages

The presented thesis discusses the healing potentials of UV light-induced and uninduced adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cell (MSC) exosomes in two- and three-dimensional wound models. For this purpose, different doses of UV-B (10, 25, 50, 100, and 200 mJ/cm²) were applied to MSCs originating from adipose tissue (AD) and bone marrow (BM). MTT method was used for cell viability analysis and Acridine orange / Propidium iodide dual staining method was used to show cell death. As a result of these analyses, it was determined that the most suitable non-toxic UV-B dose on cells was 25 mJ/cm². Exosome isolations were made from MSCs to which the selected UV-B dose was applied or not. The exosomes obtained were characterized by various methods, and then ELISA analyses were performed to determine the growth factors and cytokine (IL-

6, PDGF-BB, VEGF-A, TGF- β) levels they contain. Firstly, human keratinocyte (HaCaT) and human fibroblast (HDF) cell lines were amplified to create in vitro two- and three-dimensional wound models. After co-culturing the fibroblast and keratinocyte cells to create a two-dimensional wound model, a 'scratch wound model' was created and different doses (1, 5, and 10 $\mu\text{g/ml}$) of the obtained exosomes were applied to the wound model. For cell proliferation monitoring, Alamar Blue analysis at 12, 24, 36, and 48 hours, and for wound closure analysis, measurements were made on photographs taken with an inverted microscope using the Image J program. According to the results of the scratch assay, it was concluded that the most effective dose in wound healing analyses from ADMSC exosomes was 10 $\mu\text{g/ml}$, and 5 $\mu\text{g/ml}$ in BMMSC exosomes. Finally, for the three-dimensional wound model, first, the skin model and then the wounds were created with the 'Air-Liquid Interface' method in the transwell system. The exosome doses applied to the three-dimensional wound models were the doses obtained from the scratch wound model results. In this model, recovery rates were obtained from measurements taken randomly with Image J from histological sections to examine the healing stages. The results were found to support the two-dimensional model. In particular, the highest wound closure was observed at 10 $\mu\text{g/ml}$ of UV-induced ADMSC exosomes, while the negative control group had the lowest wound closure rate.

In conclusion, it was observed that UV-B-induced MSC exosomes have increased potential for healing in both two-dimensional and three-dimensional in vitro wound models. In order to examine the effects of UV light on MSC exosomes in more detail, molecular level analyses and in vivo experiments to examine its effect on wound healing will shed light on the studies in this field.

Keywords: Mesenchymal stem cell, exosome, UV light, HaCaT, HDF, scratch assay, Three-dimensional wound model, ALI Culture

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleşmesine büyük katkısı olan, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na teşekkür ederim. Bu çalışma, FYL-2022-19720 proje numarası ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimince desteklenmiştir. Katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan, bana inanarak güvenen, desteğini ve sevgisini her zaman üzerimde hissettiğim, sadece akademik bilgi ve deneyimi ile değil hayata dair bana çok şey katan ve öğreten, iyi ki karşılaşmışım dediğim çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi sayın Esin AKBAY ÇETİN'e,

Bilim insanı olmaya karar vermemdeki en büyük etken olan ve tecrübesiyle bana yeni ufuklar kazandırıp yol gösteren hocam Prof. Dr. sayın Mehmet Ali ONUR'a,

Herhangi bir sorunumda her zaman yardımcı olmaya çalışan, güler yüzlü oluşlarıyla beni motive eden hocalarım Dr. Öğr. Üyesi sayın Handan SEVİM AKAN ve Doç. Dr. sayın Özer Aylın GÜRPINAR'a,

Tezimin eksozom izolasyonu aşamalarında laboratuvarlarını kullandığım ve analizlerimi gerçekleştirmemde katkısı olan Doç. Dr. sayın Açelya YILMAZER AKTUNA ve Ömür BUL'a, tezimin DIS analizlerini laboratuvarlarında gerçekleştirdiğim Prof. Dr. sayın Süleyman Ali TUNCEL ve ekibine, tezimdeki BCA analizi kısmında bana imkan ve tecrübeleriyle yardımcı olan hocam Arş. Gör. Özbeyen ATALAY'a,

Tez çalışmam süresince her konuda bana destek olan ekip arkadaşlarım İbrahim KAMACI, Şebnem ERFEN, Alp Yiğit ÖZDEMİR ve Buse BEKAR'a,

Bu süreç boyunca ihtiyaç duyduğum her anımda, her konuda yanımda olan canım arkadaşlarım Meltem KOCAKUŞAK ve Şefika ÖZCAN'a,

Beni bugünlere getiren, bana her zaman inanan, koşulsuz ve şartsız sevgilerini ve desteklerini daima hissettiğim anneme ve babama, sadece varlığıyla bana mutluluk veren ve kendisi farkında olmasa da bana çok destek olan Yaman'a,

Son olarak, bana olan inancını ve sevgisini her anımda hissettiğim, varlığımı bir şans olarak gördüğüm hayat arkadaşım Yusuf AYTEN'e

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Deri.....	3
2.1.1. Deride Yaralanma.....	5
2.1.2. Deri Yara İyileşme Süreçleri.....	7
2.1.2.1. Hemostaz.....	7
2.1.2.2. İnflamatuvar Faz.....	7
2.1.2.3. Proliferatif Faz.....	7
2.1.2.4. Yeniden Şekillenme Aşaması.....	8
2.2. Kök Hücreler ve Sınıflandırılmaları.....	9
2.2.1. Mezenşimal Kök Hücreler.....	11
2.3. Ultraviyole (UV) Işığı.....	13
2.3.1. UV Işığı ve Kök Hücrelerin İlişkisi.....	14
2.4. Eksozomlar.....	15
2.4.1. MKH'lerden Elde Edilen Eksozomlar.....	18
2.5. İn Vitro Yara Modelleri.....	19
2.5.1. İki Boyutlu (2B) İn Vitro Yara Modelleri.....	20

2.5.2. Üç Boyutlu (3B) İn Vitro Yara Modelleri.....	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	24
3.2. Sıçan AKMKH ve KİMKH'lerinin İzolasyonu ve Kültürü	24
3.2.1. Sıçan AKMKH ve KİMKH'lerinin Karakterizasyonu.....	26
3.2.2. Sıçan AKMKH ve KİMKH'lerinin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi.....	26
3.3. UV-B'nin Uygun Dozunun Tespiti.....	27
3.3.1. Hücre Canlılık Analizi.....	27
3.3.2. AT/Pİ Boyaması.....	28
3.4. UV-B Uygulanmış ve Uygulanmamış AKMKH ve KİMKH'lerden Eksozom İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İçerik Analizleri.....	28
3.4.1. AKMKH ve KİMKH'lerden Süpernatant Eldesi ve Eksozom İzolasyon Aşamaları.....	28
3.4.2. Eksozomların Karakterizasyon Analizleri.....	30
3.4.2.1. Akış Sitometri Analizi.....	30
3.4.2.2. Dinamik Işık Saçılması (DIS) Analizi.....	31
3.4.2.3. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Analizi.....	31
3.4.2.4. Nanopartikül İzleme Analizi (NİA).....	31
3.4.3. Eksozomların Miktar Tayini.....	32
3.4.4. Eksozomlarda Büyüme Faktörü ve Sitokin Analizleri.....	32
3.5. "Çizik Testi" Yöntemi ile Yara Modeli Oluşturulması.....	32
3.5.1. İnsan Keratinosit (HaCaT) ve İnsan Fibroblast (HDF) Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Büyüme Eğrisinin Oluşturulması.....	32
3.5.2. "Çizik Testi" Yöntemi ile Oluşturulan Yara Modeline Eksozomların Uygulanması ve Yara İyileşme Potansiyelinin İncelenmesi.....	33
3.6. Üç Boyutlu (3B) Deri Yara Modelinin Oluşturulması ve Analizleri	34

3.6.1. 3B Deri Modelinin Oluşturulması ve İncelenmesi.....	35
3.6.2. 3B Deri Modelinde Yaranın Oluşturulması, Eksozom Uygulaması ve İyileşmenin Histolojik Olarak İncelenmesi.....	36
3.7. İstatistik Analiz.....	38
4. SONUÇLAR.....	39
4.1. AKMKH ve KİMKH Çoğaltılması, Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	39
4.2. UV-B'nin Uygun Dozunun Bulunması.....	40
4.2.1 MTT Analizi.....	40
4.2.2 AT/Pİ Boyaması.....	42
4.3. UV-B Uygulanmış ve Uygulanmamış AKMKH ve KİMKH'lerden Eksozom İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İçerik Analiz Sonuçları.....	43
4.3.1. Eksozom İzolasyonu.....	43
4.3.2. Eksozomların Karakterizasyon Sonuçları.....	44
4.3.2.1. Akış Sitometri Analizi.....	44
4.3.2.2. DIS Analiz Sonuçları.....	46
4.3.2.3. TEM Analiz Sonuçları.....	46
4.3.2.4. NİA Sonuçları.....	48
4.3.3. Eksozomların Büyüme Faktörü ve Sitokin Analiz Sonuçları.....	48
4.5. "Çizik Testi" Yöntemi ile Yara Modeli Oluşturulması, Eksozomların Uygulanması ve Yara İyileşme Potansiyelinin İncelenmesi.....	50
4.5.1. HaCaT ve HDF Hücrelerinin Büyüme Eğrilerinin Elde Edilmesi.....	50
4.5.2. "Çizik Testi" Yara Modelinin Oluşturulması.....	52
4.5.3. Yara İyileşme Potansiyelinin İncelenmesi.....	52
4.6. Üç boyutlu (3B) Deri Yara Modelinin Oluşturulması, Eksozom Uygulaması ve Histolojik Analiz Sonuçları.....	60
5. TARTIşMA.....	68

6. KAYNAKLAR.....	74
EKLER.....	79
EK 1 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
ÖZGEÇMİŞ.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan derisinin şematize edilmiş şekli. ESM: Ekstraselüler matriks.....	4
Şekil 2.2. Yara iyileşme sürecinin dört aşamasının zamana göre gerçekleştirdiği olaylar..	6
Şekil 2.3. Yara iyileşmesinde zaman içerisinde değişen hücre ve süreçlerin şematize görüntüsü.....	6
Şekil 2.4. Yara iyileşme aşamalarının şematize edilmiş hali.....	9
Şekil 2.5. Kök hücrelerin farklılaşma yolları.....	11
Şekil 2.6. UV ışınları spektrumu.....	13
Şekil 2.7. UV ışınlarının deriye nüfuz etme dereceleri.....	14
Şekil 2.8. Ekstraselüler veziküllerin şematize edilmiş hali. MVC: Multiveziküler cisimcikler.....	16
Şekil 2.9. A. Eksozomların hücrede oluşum mekanizması ve hücre dışına salınması. B. Eksozomların TEM mikroskop görüntüsü.....	17
Şekil 2.10. İn vitro yara modellerinin oluşturulması için kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.11. 2B in vitro yara modellerinin şematik gösterimi.....	21
Şekil 3.1. Tüm deneysel çalışmaların akış şeması.....	23
Şekil 3.2. AKMKH ve KİMKH'lere UV uygulanması ve inkübasyon aşamalarının şematik gösterimi.....	29
Şekil 3.3. 3B deri modelinin şematik gösterimi.....	35
Şekil 3.4. 3B deri yara modelinin oluşturulma aşamaları. A. Dermatolojik punch yardımı ile yaranın oluşturulması. B. Punch ile çıkarılan doku parçasının uzaklaştırılması. C. Deri modelinde oluşturulmuş yara modeli. D. Oluşturulan deri yara modelinin iyileşmesinin takip edilmesi için HDF'li kollajen jel üzerine yerleştirilmiş görüntüsü. E. Eksozomların yara modellerine uygulanması.....	37

Şekil 4.1. A. AKMKH'lerin primer izolasyonunun ikinci günü (x10 büyütme), B ve C. AKMKH'lerin pasaj iki görüntüleri (sırasıyla x4 ve x10 büyütme), D. KİMKH'lerin pasaj iki görüntüsü (x4 büyütme).....	39
Şekil 4.2. MKH'lerin adipojenik farklılaşma potansiyelleri. A. ve B. AKMKH kontrol grupları, C. Oil-Red O boyama ile yağ damlacıklarının gözlenmesi.....	40
Şekil 4.3. AKMKH'lere UV-B'nin farklı doz uygulamalarından sonra % canlılık analizleri. UV grupları kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık: *; $p \leq 0,05$	41
Şekil 4.4. KİMKH'lere UV-B'nin farklı doz uygulamalarından sonra % canlılık analizleri. UV grupları kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık: ***; $p \leq 0,001$	41
Şekil 4.5. AKMKH'lerin farklı dozlarda UV-B uygulamaları sonrası AT/Pİ boyama görüntüleri. A. Kontrol grubu, B. 10 mJ/cm ² , C. 25 mJ/cm ² , D. 50 mJ/cm ² , E. 100 mJ/cm ² , F. 200 mJ/cm ² (x10 büyütme).....	42
Şekil 4.6. KİMKH'lerin farklı dozlarda UV-B uygulamaları sonrası AT/Pİ boyama görüntüleri. A. Kontrol grubu, B. 10 mJ/cm ² , C. 25 mJ/cm ² , D. 50 mJ/cm ² , E. 100 mJ/cm ² , F. 200 mJ/cm ² (x10 büyütme).....	43
Şekil 4.7. Akış sitometri analiz sonuçları. A. UV'siz AKMKH eksozomları, B. UV'li AKMKH eksozomları, C. UV'siz KİMKH eksozomları, D. UV'li KİMKH eksozomları.....	45
Şekil 4.8. A. UV'siz AKMKH'lerin DIS ölçüm sonucu, B. UV'li AKMKH'lerin DIS ölçüm sonucu, C. UV'siz KİMKH'lerin DIS ölçüm sonucu, D. UV'li KİMKH'lerin DIS ölçüm sonucu.....	46
Şekil 4.9. UV'li ve UV'siz AKMKH ve KİMKH eksozomlarının TEM görüntüleri. A. UV'siz AKMKH eksozomları. Ölçek çubukları; sırasıyla 100 nm ve 50 nm'dir. B. UV'li AKMKH eksozomları. Ölçek çubukları; sırasıyla 100 nm ve 200 nm'dir. C. UV'siz KİMKH eksozomları. Ölçek çubuğu 100 nm'dir. D. UV'li KİMKH eksozomları. Ölçek çubukları; sırasıyla 100 nm ve 150 nm'dir.....	47

Şekil 4.10. AKMKH ve KİMKH eksozomlarının nanopartikül izleme analiz (NİA) sonuçları. A. UV' siz AKMKH, B. UV' li AKMKH, C. UV' siz KİMKH, D. UV' li KİMKH.....	48
Şekil 4.11. UV'li ve UV'siz AKMKH ve KİMKH eksozomlarının büyüme faktörü ve sitokin analiz sonuçları. A. IL-6 analiz sonuçları, B. VEGF-A analiz sonuçları, C. TGF- β analiz sonuçları, D. PDGF-BB analiz sonuçları. UV'siz AKMKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık; *, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,00$, UV'siz KİMKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık; ++, $p \leq 0,01$, +++, $p \leq 0,001$, UV'li AKMKH ve UV'li KİMKH grubu arasındaki istatistiksel farklılık; ###; $p \leq 0,00$	50
Şekil 4.12. A. HaCaT'ların büyüme eğrisi grafiği. B. HDF'lerin büyüme eğrisi grafiği..	51
Şekil 4.13. HaCaT ve HDF'ler ile oluşturulan ko-kültür sonrası 'çizik testi' yöntemi ile oluşturulan yara görüntüleri. A. Yara oluşturulduktan hemen sonra. B. Yara oluşturulduktan sonraki 36. saatte hücrelerin göçünün gözlemlendiği görsel.....	52
Şekil 4.14. AKMKH UV'li ve UV'siz eksozom gruplarının A. 12. saat, B. 24. saat, 36. ve 48. saat Alamar Blue sonuçlarının grafikleri. (By: Besiyeri) Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; ***, $p \leq 0,001$. Allantoin grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; +++, $p \leq 0,001$. UV'li 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grubuna göre anlamlı farklılık; #; $p \leq 0,05$	54
Şekil 4.15. KİMKH UV'li ve UV'siz eksozom gruplarının A. 12. saat, B. 24. saat, 36. ve 48. saat Alamar Blue sonuçlarının grafikleri. (By: Besiyeri) Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; *, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$. Allantoin grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; ++, $p \leq 0,01$, +++, $p \leq 0,001$. UV'li 5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grubuna göre istatistiksel anlamda farklılık; #; $p \leq 0,05$, ##; $p \leq 0,01$	55
Şekil 4.16. AKMKH eksozomlarının "çizik testi" yara modelinde 12., 24., 36. ve 48. saatlerdeki yüzde yara iyileşme grafiği. Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$ (Grafikte istatistiksel semboller gösterilmemiştir). Allantoin grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; ++, $p \leq 0,01$, +++, $p \leq 0,001$. %10 FBS grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; #; $p \leq 0,05$, ##; $p \leq 0,01$, ###; $p \leq 0,001$	57

- Şekil 4.17.** KİMKH eksozomlarının “çizik testi” yara modelinde 12., 24., 36. ve 48. saatlerdeki yüzde yara iyileşme grafiği. Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; ***; $p \leq 0,001$ (Grafikte istatistiksel semboller gösterilmemiştir). Allantoin grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; +; $p \leq 0,05$, ++; $p \leq 0,01$, +++; $p \leq 0,001$. UV’li 5 µg/ml-UV’li 10 µg/ml, UV’li 5 µg/ml-UV’siz 1 µg/ml grupları arasındaki istatistiksel anlamda farklılık; *, $p \leq 0,05$, ***; $p \leq 0,001$ (Grafikte istatistiksel semboller gösterilmemiştir).....59
- Şekil 4.18.** Oluşturulan deri modeli katmanlarının mikroskop görüntüleri. A. Deri modelinin aselüler tabakası (1. katman) B. Deri modelinin HDF ile kültürlenmiş tabakası (2. katman).....60
- Şekil 4.19.** Oluşturulan üç boyutlu deri modelinin H&E boyama yapılmış mikroskop görüntüleri. A, B. Modelin 7. gün alınan kesitlerinin boyama görüntüleri. C, D. Modelin 14. gün alınan kesitlerinin boyama görüntüleri. E, F. Modelin 21. gün alınan kesitlerinin boyama görüntüleri (Oklar oluşan katmanları göstermektedir).....61
- Şekil 4.20.** Yara oluşturulduktan hemen sonra çekilmiş stereo mikroskop görüntüsü (Ölçek kağıdındaki her bir kare 1 mm’dir).....62
- Şekil 4.21.** 3. ve 7. günlerdeki 3B yara gruplarının stereo mikroskop görüntüleri. (Oklar yara açıklıklarının olduğu bölgeleri göstermektedir, Ölçek kağıdındaki her bir kare 1 mm’dir).....64
- Şekil 4.22.** Yara gruplarının 3. ve 7. günlerdeki H&E boyama görüntüleri. 3. gün ölçekler sırasıyla; 50 µm, 50 µm, 100 µm, 50 µm, 500 µm, 200 µm’dir. 7. gün ölçekler sırasıyla; 50 µm, 100 µm, 500 µm, 100 µm, 50 µm, 100 µm’dir.....65
- Şekil 4.23.** Yara oluşturulduktan hemen sonra fikse edilen ve H&E boyaması yapılan dokudan Image J programı ile yara ölçümünün örnek gösterimi.....66
- Şekil 4.24.** 3B yara modellerinin yüzde yara iyileşme sonuçlarını gösteren grafik. Negatif kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklılık; ***; $p \leq 0,001$67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. AKMKH ve KİMKH süpernatantlarından elde edilen eksozom konsantrasyonları.....	44
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
ml	Mililitre
°	Santigrat
g	Gram
sn	Saniye
mJ	Milijoule
%	Yüzde
nm	Nanometre
mm	Milimetre
pg	Pikogram
ng	Nanogram

Kısaltmalar

Dk	Dakika
No	Numara
AT/Pİ	Akridin Turuncusu/ Propidyum İyodür
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimetil sülfoksit

EDTA	Etildiaminotetraasetik Asit
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizi
FBS	Fetal Bovine Serum
IgG	İmmüoglobülin G
IL-1	İnterlökin 1
IL-8	İnterlökin 8
IL- 10	İnterlökin 10
IL- 1 β	İnterlökin- 1 beta
IL- 6	İnterlökin- 6
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
P/S	Penisilin/ Streptomisin
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PİZ	Popölasyon İkilenme Zamanı
pH	Potansiyel hidrojen
RPM	Dakikadaki Dönme Sayısı
TGF- β 1	Transforme Edici Büyüme Faktörü- beta 1
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör- alfa
VEGF-A	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü
PDGF-BB	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü-BB
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
O ₂	Oksijen
CO ₂	Karbondioksit

1. GİRİŞ

Deri, temel olarak üç katmandan oluşan vücudun en büyük organıdır. Üst katmanda keratinosit katmanı olan epidermis, orta katmanda, bir ekstraselüler matriks elemanı olan kollajence zengin dermis tabakası, en alt katmanda ise yağ dokudan oluşan bir hipodermis tabakası yer almaktadır [1]. Derinin organizma bütünlüğü açısından birçok önemli görevi bulunmaktadır. Dış darbelerle karşı koruma, termal düzenleme, duyuşsal algılama, hemostazı sağlama bunlardan sadece birkaçıdır. Bu sebeple ciltte oluşan yaralar hayati önem taşıyabilmektedir. Cilt yaraları; mekanik travmalar, dolaşım problemleri, cerrahi müdahaleler, yaşlanma gibi sebeplerle oluşabilir. Tedavileri ise oldukça maliyetli ve uzun süreli olabilmektedir [2, 3].

Yara iyileşmesi; çeşitli büyüme faktörleri, hücreler ve hücre dışı ortam gibi birden fazla etkenin rol aldığı karmaşık ve koordineli bir süreçtir. Yara iyileşmesi için yapılan farklı çalışmalarla birlikte en çok dikkat çeken mezenşimal kök hücreler (MKH) ile tedavi yaklaşımlarının olduğu gözlenmiştir [4]. MKH'ler; çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve ekstraselüler veziküller salgılayan, farklılaşma kapasitesine sahip multipotent kök hücrelerdir. MKH'lerin klinik uygulamalardaki potansiyelinin, daha çok salgıladıkları ekstraselüler veziküllerden olan eksozomlar olduğu gösterilmektedir [5].

Eksozomlar; endositotik yolla oluşan, tipik olarak yuvarlak ve 30-200 nm çapa sahip veziküllerdir. Salgılandıkları hücrenin özelliklerini yansıtmaıyla bilinirler. Hücreler arası iletişimde rol almaları sebebiyle birçok rejeneratif süreçte aktif olarak yer almaktadırlar [6]. Eksozomların MKH'lere göre birçok avantajı bulunmaktadır. Nano boyutta oluşlarından kaynaklı biyomolekül veya ilaç taşınımındaki kolaylıklar, daha düşük immün yanıt oluşturmaları, çekirdekte bulunmaları, daha stabil bir yapı göstermeleri ve daha kolay üretime sahip olmaları ile çalışmalardaki kullanımları ön plana çıkmaktadır [7].

UV ışığı; kanser terapileri, sedef ve atopik dermatit gibi çeşitli cilt hastalıklarının tedavilerinde kullanılan bir ışık çeşididir. UV ışığının çeşidi ve maruziyet süresi tedavi uygulamalarında kritik bir noktadır. UV ışığına fazla maruziyet vücutta ciddi hasarlara sebep olmaktadır [8, 9]. MKH'lerin UV ışığının yol açtığı hasarlara karşı koruyucu ve iyileştirici bir potansiyelde olduğu, çalışmalar tarafından gösterilmektedir [9, 10]. Yapılan çeşitli çalışmalarda, UV ışığına maruz bırakılan MKH'lerin koruyucu ve

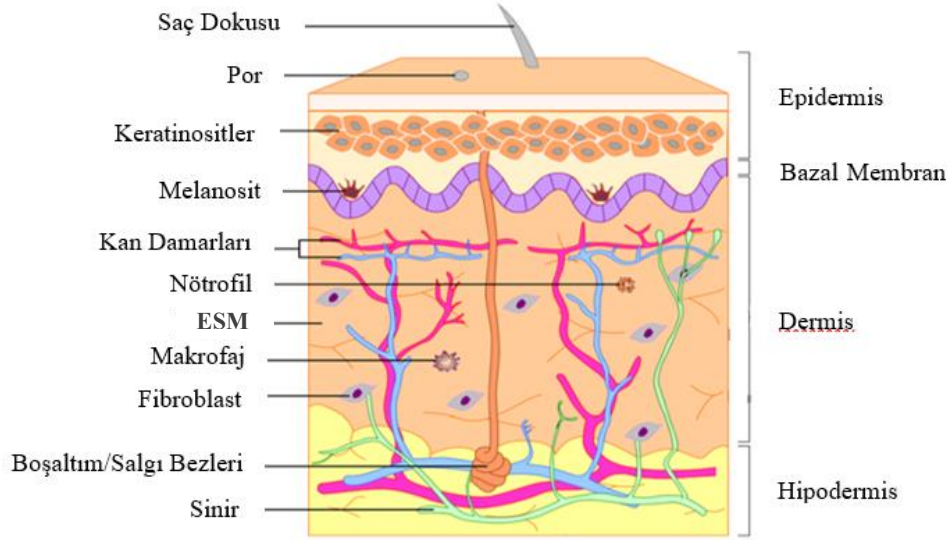
iyileştirici salgı maddelerini daha fazla salgıladıkları ve bununla birlikte potansiyellerinde artış görülmüştür [9-11].

Literatür incelendiğinde UV ışığı ile indüklenen MKH eksozomlarının yara iyileşmesindeki etkilerinin araştırıldığına dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bilgiye dayanarak yapılan bu tez çalışması kapsamında; UV-B ışığı ile indüklenmiş ve indüklenmemiş adipoz doku ve kemik iliği kökenli MKH'lerden eksozom izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen eksozomların karakterizasyonu yapıldıktan sonra büyüme faktörü ve sitokinler açısından potansiyelleri incelenmiştir. İki ve üç boyutlu in vitro yara modelleri oluşturulmuş ve elde edilen eksozomların farklı konsantrasyonlarının yara iyileşmesi üzerindeki etkileri incelenerek karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Deri, insan vücudunun en büyük organıdır ve vücudu dış ortamdan ayırarak bir bariyer görevi görmektedir [12, 13]. İnsan derisinin temel görevleri arasında; vücudu fiziksel ve kimyasal etkilere karşı koruma, vücut ısısının düzenlenmesine katkı, hormon sentezi, bağışıklık işlevi ve duyuşsal algılama gibi özellikler bulunmaktadır [12-14]. Deri, üç ayrı tabakadan oluşmaktadır. Epitel dokusundan oluşan epidermis en dış tabakayı, bağ dokusundan oluşan dermis orta tabakayı ve deri altı tabakası olarak adlandırılan hipodermis ise en iç tabakayı oluşturmaktadır. Epidermis, keratinosit hücrelerinin çekirdeksizleşmesi ve yassılaşması sonucu oluşmaktadır ve keratinositler bu durumda “korneosit” adını almaktadır [12, 13]. Epidermiste keratinosit hücrelerinin yanı sıra Langerhans hücreleri, merkel hücreleri ve melanositler gibi hücreler de yer almaktadır [14]. Epidermin kalınlığı yaklaşık 10-20 µM civarındadır [13] ve “stratum corneum”, “stratum lucidum”, “stratum granulosum”, “stratum spinosum” ve “stratum bazale” olmak üzere beş farklı katmanı bulunmaktadır [15]. “Stratum lucidum” tabakası vücutta yalnızca avuç içi ve ayak tabanında, derinin en kalın olduğu bölgelerde yer almaktadır [16]. “Stratum corneum” tabakası vücudu dış patojenlere karşı koruma görevini üstlenmesinden ötürü epidermin en önemli katmanıdır. Bu yapının bütünlüğü kıl, ter gözenekleri gibi yapılar nedeniyle kesintiye uğramaktadır [12, 14, 15] (Şekil 1). Bu katmanların “stratum corneum” ve “stratum lucidum” kısımları ölü tabakadır, diğer üç katman ise epidermin canlı katmanlarıdır. “Stratum corneum” tabakası “tuğla-harç” yapısına benzetilir; tuğla kısmı korneositleri, harç kısmı ise korneositler arasındaki lipitleri ifade etmektedir [12, 17].



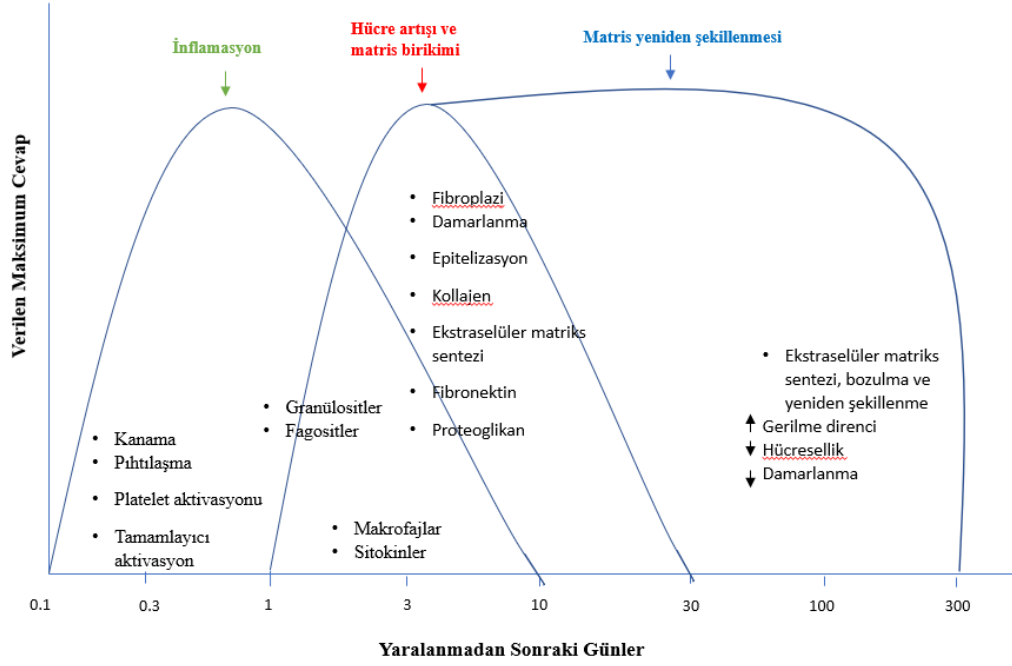
Şekil 2.1. İnsan derisinin şematize edilmiş şekli [14]. ESM: Ekstraselüler matriks

Epidermis, bazal membran aracılığıyla dermise bağlanmaktadır [15]. Dermis; 1-4 mm kalınlığında lifli ve elastik yapılu bir dokudur [13]. Dermis, papiller ve retiküler dermis olarak iki alt tabakaya ayrılmaktadır. Papiller tabaka; gevşek bağ dokusundan, retiküler tabaka ise sıkı ve yoğun bağ dokusundan meydana gelmektedir [14, 15, 18]. Dermis, Şekil 1’de de gösterildiği gibi esas olarak ekstraselüler matriksten (ESM) oluşur, bunun yanı sıra kollajen ve elastin lifleri, lenf damarları, sinir uçları, mast hücreleri, kan damarları, fibroblastlar, kıl folikülleri, salgı ve boşaltım bezleri, bağışıklık hücreleri gibi birçok yapının bir araya gelmesiyle oluşan bir yapıdır [12-15]. Lifli ve elastik yapısından dolayı cildi mekanik etkilere karşı koruma, epidermin beslenmesini sağlama, ter bezleri sayesinde ısı düzenlenmesinde görev alma, bağışıklık hücreleri sayesinde ise immün yanıt oluşturmak gibi birçok işleve sahiptir [14, 17, 18].

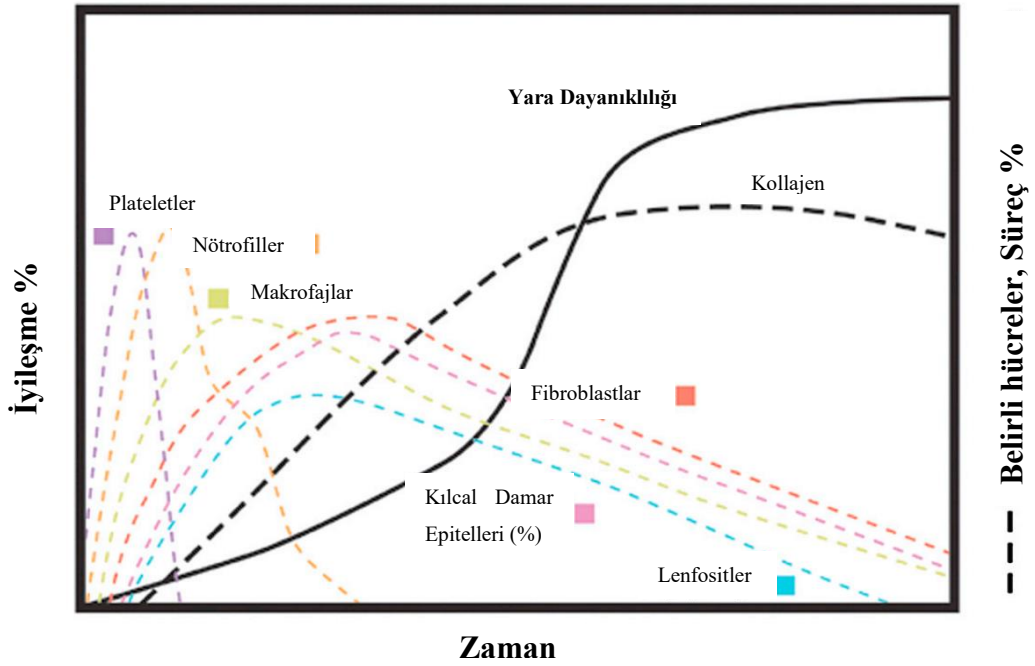
Dermisin altında bulunan ve derinin en alt tabakası olan hipodermis ise daha da gevşek bir bağ doku ve yağ dokudan oluşmaktadır. Hipodermisin kalınlığı cinsiyet, beslenme gibi özelliklere göre değişiklik göstermektedir. Yapısında oldukça fazla kılcıl damar ağı bulunmaktadır [19]. Bulundurduğu yağ doku sayesinde cilde mekanik olarak destek sağlayarak cildi fiziksel darbelere karşı korumaktadır. Aynı zamanda yalıtım ve enerji depolaması sağlamaktadır [14, 17].

2.1.1. Deride Yaralanma

Yara oluşumu, cildin normal doku ve fonksiyonunu kaybetmesidir [20, 21]. Yaralanmalar, dış faktörler (yanma, darbe alma gibi), cerrahi müdahaleler ve çeşitli hastalıkların (diyabet, obezite, damar hastalıkları gibi) sonucunda oluşabilmektedir [3, 14, 21]. Yaralanmalar, iyileşme süreleri ve nedenlerine göre akut ve kronik olarak ikiye ayrılabilir. Akut yaralar, nispeten kısa bir süre içerisinde cildin yeniden anatomik ve fizyolojik özelliklerini kazanmasıdır [14]. Kronik yaralarda ise süreç tekrarlayabilmekte ve çok daha uzun bir zaman alabilmektedir. Bunun yanı sıra cilt normal anatomik ve fizyolojik bütünlüğünü sağlayamamaktadır [3]. Genellikle kronik yaralar diyabet ve obezite gibi hastalıklarla ilişkilendirilmektedir [14]. Cilt yaralandıktan hemen sonra hasarı ortadan kaldırmak için yara iyileşmesi süreci başlamaktadır. Bu oldukça önemli bir evrimsel mekanizmadır [22]. Cilt daha fazla hasar oluşumunu, kan kaybını, sıvı kaybını ve enfeksiyonu önleyerek hayatta kalmak için oldukça karmaşık ve dinamik bir süreç olan yara iyileşme sürecine girmektedir. Bu süreçte birçok farklı mekanizma, büyüme faktörleri, enzimler, birçok hücre tipi, hücreler arası yollar ve aracıları etkili olmaktadır (Şekil 2.2 ve 2.3) [22, 23].



Şekil 2.2. Yara iyileşme sürecinin dört aşamasının zamana göre gerçekleştirdiği olaylar [24].



Şekil 2.3. Yara iyileşmesinde zaman içerisinde değişen hücre ve süreçlerin şematize görüntüsü.

2.1.2. Deri Yara İyileşme Süreçleri

Yara iyileşme süreci hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme aşaması olmak üzere dört aşamada incelenmektedir (Şekil 2.4) [24, 25].

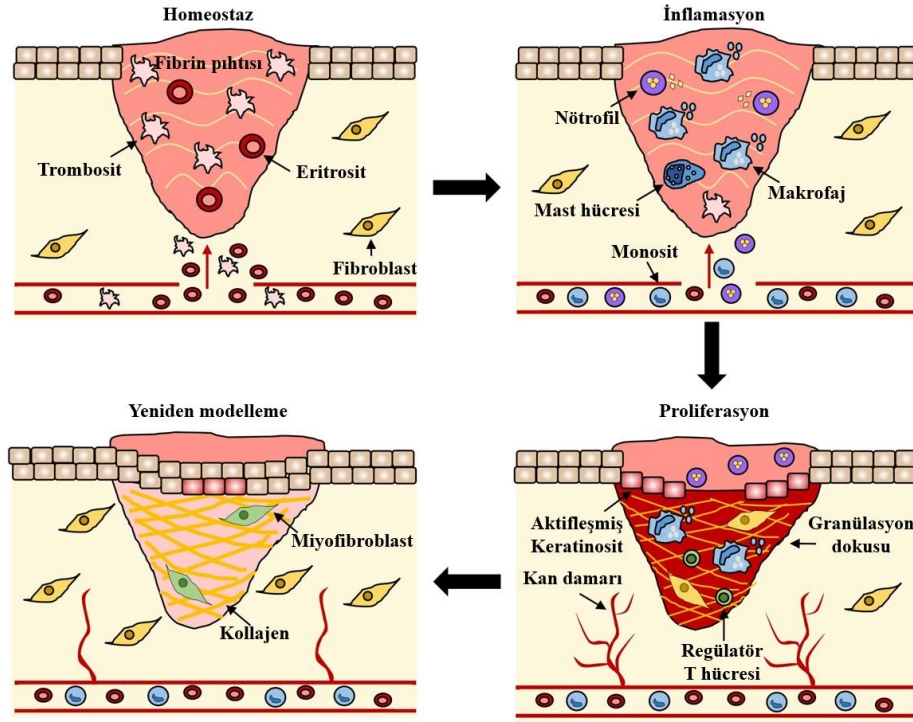
2.1.2.1. Hemostaz: Cilt yaralandıktan hemen sonra hemostaz süreci, bölgeye çok sayıda trombositin akın etmesiyle başlamaktadır. Trombositler aktive olarak granüllerini serbest bırakır ve pıhtılaşma kaskadını başlatır. Oluşan pıhtı bölgeye göç edecek lökositler, nötrofiller, keratinositler ve fibroblastlar için iskele görevi görür [24, 25]. Aynı zamanda kan kaybının önlenmesi için çevredeki kan damarlarının 5-10 dk sürecek vazokonstriksiyonu gerçekleştirir [25]. Trombositler çok sayıda sitokin ve kemokin salgılayarak; anjiyogenezi başlatmakta, kollajen sentezini uyarmakta ve bölgeye özellikle nötrofil, makrofaj akışı başlamaktadır. Böylelikle bir sonraki aşama olan inflamatuvar faz başlamış olur [24, 25].

2.1.2.2. İnflamatuvar Faz: Bu aşama hemostaz aşaması devam ederken başlamaktadır. Öncelikle bölgeye nötrofiller gelir ve 2-5 gün boyunca burada kalırlar. Nötrofiller TNF, IL-6 ve IL-1 salgılayarak VEGF ve IL-8'i uyarır, inflamatuvar yanıtı güçlendirirler [25]. Nötrofiller iyileşmenin bu aşamasında oldukça önemli olan enfeksiyon için fazlaca antimikrobiyal madde salgırlar. Yara oluşumundan yaklaşık 2-3 gün sonra bölgeye makrofajlar da akın eder ve bu faz tamamlanana kadar bölgede kalırlar. Makrofajlar TGF, FGF, VEGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerini salgılayarak yara iyileşmesinde ve onarımında, hücre çoğalmasında, inflamasyonda etkili olmaktadır. Bu faz enfeksiyonla mücadele aşaması olduğundan, yara iltihaplanmasında herhangi bir kesinti veya uzama (üç haftadan uzun) olursa yara kronikleşebilir veya daha ciddi yara izi oluşabilir. Yara bölgesi yabancı cisimlerden, hasarlı ve enfekte dokulardan arındırıldığında sona ermekte ve proliferatif faz başlamaktadır [24, 25].

2.1.2.3. Proliferatif Faz: Yaralanmadan yaklaşık 3-10 gün sonra başlamaktadır [25]. Bu faz; epitelizasyon, anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumu şeklinde üç ayrı fazdan oluşmaktadır. Epitelizasyon, keratinositler ile sağlanır. Kıl kökleri ve apokrin bezlerin kök ampullerindeki epitel kök hücreler farklılaşarak keratinositlere destek olmaktadır [24, 25]. Bu işlem yaranın enfeksiyon ve kuruluştan korunması için yüzeyinin kapatılmasını sağlamaktadır. Epitelizasyon devam ederken çeşitli büyüme faktörleri (VEGF, PDGF, bFGF ve serin proteaz trombini) mevcut damarların endotel hücrelerindeki reseptörlere

bağlanarak hücre içi sinyal yollarını aktive etmekte ve anjiyogenezin başlamasını sağlamaktadırlar [25]. Anjiyogenez tamamlanmadan granülasyon dokusu oluşmaya başlamaktadır. Bu aşamada çok fazla fibroblast etkin rol almaktadır. Fibroblastların yanı sıra granülositler, makrofajlar, kılcal damarlar ve kollajen tip III bu aşamada görev almaktadır. Bu fazın sonlarına doğru fibroblastlar miyofibroblastlara farklılaşır ve sonrasında apoptoza uğrayarak bölgeden uzaklaştırılır. Granülasyon dokusunu oluşturmadaki amaç yara bölgesinde kalan kusurlu kısımları bu doku ile doldurmaktır. Tüm süreçler birbiri ile örtüştüğü gibi yine bu aşama bitmeden yara iyileşmesinin son aşaması olan yeniden şekillenme fazı başlamaktadır [24, 25].

2.1.2.4. Yeniden Şekillenme Aşaması: Yara iyileşmesinin son aşamasıdır. Bu aşama yaralanmadan sonra yaklaşık 21. günde başlar ve sonlanması aylar hatta yıllar sürebilir. Asıl değişiklik tip III kollajen yerine tip I kollajenin geçmesidir. Bu sayede yara dokusu çok daha dayanıklı bir hale gelmektedir. Granülasyon doku oluşumu hücrelerin apoptoza uğraması ile sonlandığından bu aşamada yara dokusu aselüler (hücresiz) ve avasküler (damarsız) hale gelmektedir. Bu sebeple ciddi bir yaralanma sonucu deride bulunan kıl folikülleri ve ter bezlerinin oluşumu ve gelişimi yok olmaktadır [24, 25]. Tüm bu aşamalar sonucu olarak “skarlaşma” meydana gelmekte ve yara izi oluşmaktadır [22].



Şekil 2.4. Yara iyileşme aşamalarının şematize edilmiş hali [26].

Tüm bu aşamalarda anlatılan iyileşme süreçleri, yara türünün ve ciddiyetinin dışında kişinin yaşı, metabolik aktiviteleri, cinsiyeti ve ilaç kullanma durumuna göre değişiklik gösterebilmektedir. Yara tedavisi oldukça maliyetli ve ciddi sonuçlar doğurabilir [3]. Amerika Birleşik Devletleri'nin yara tedavileri için her yıl 25 milyar dolar harcadığı tahmin edilmektedir [14]. Hem hastanın refahı hem de yüksek maliyetlerden dolayı daha etkili ve yeni yara tedavileri geliştirmek önemlidir.

2.2. Kök Hücreler ve Sınıflandırılmaları

Kök hücreler; kendini yenileyebilen, bir organizmanın tüm hücre tiplerine farklılaşma özelliği gösteren ve bu özelliklerinden dolayı tedavilerde sıklıkla kullanılan hücrelerdir [27, 28]. Kök hücre araştırmalarının tarihi 1800'lerin ortalarında başlamıştır ve 1900'lerde ise bazı hücrelerin kan hücrelerini üretmesinin keşfiyle ilk kez "kök hücre" terimi kullanılmıştır [27]. Kök hücreler 'embriyonik kök hücreler' ve 'yetişkin kök hücreler' olarak ikiye ayrılmaktadır. Doğum sonrası bir organizmadan elde edilen tüm

kök hücreler 'yetişkin kök hücre' kategorisinde yer alır. Sınıflandırılmaları Şekil 2.5'te de şematize edildiği gibi aşağıda anlatılan farklılaşma potansiyellerine göre yapılabilmektedir [27, 28].

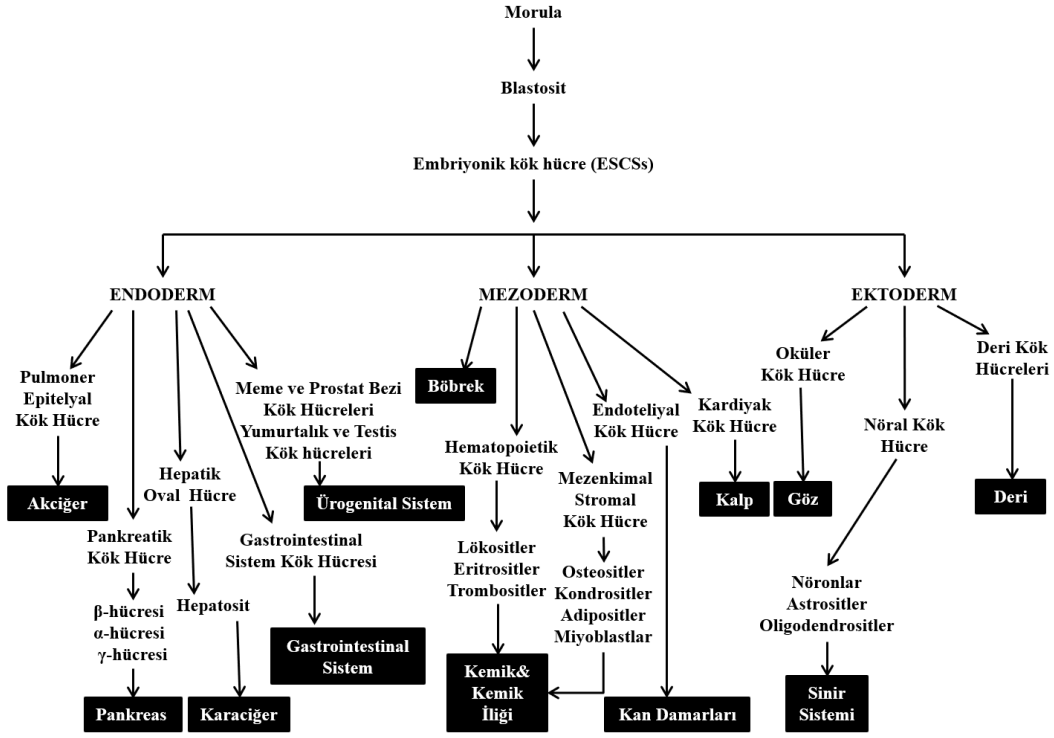
Totipotent Kök Hücreler: Bir organizmanın tüm hücre tiplerine dönüşebilme özelliği gösteren kök hücreleridir. Sperm ve yumurtanın birleşmesiyle oluşan zigot, totipotent kök hücreye örnek verilebilir.

Pluripotent Kök Hücreler: Embriyonun, endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarından doku oluşturma potansiyeline sahip kök hücrelerdir.

Multipotent Kök Hücreler: Yakın ilişkide olduğu bir hücre ailesine farklılaşma potansiyeli olan kök hücrelerdir. Örneğin; mezenşimal kök hücre (MKH)'ler ve hematopoetik kök hücreler örnek (HKH) verilebilir. HKH'ler, kemik iliğinde bulunan ve yapışık olmayan kan hücrelerinin yapımını sağlayan öncül hücrelerdir. Bu iki kök hücre türü multipotent kök hücrelerin en çok bilinen ve çalışılanlarıdır. MKH'ler kemik, kırıkta, tendon ve kas tamirinde, endokrinolojik ve kardiyolojik amaçlı klinik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. HKH'ler ise yine en fazla kardiyoloji çalışmalarında olmakla birlikte, karaciğer, diyabet ve nörolojik hastalıklar gibi tedavi alanlarında sıklıkla kullanılmaktadırlar [29].

Oligopotent Kök Hücreler: Sadece birkaç hücre türüne farklılaşabilen kök hücrelerdir. Örnek olarak yetişkin lenfoid ve myeloid kök hücreler verilebilir.

Unipotent Kök Hücreler: Yalnızca kendi türünden tek bir hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Progenitör hücreler olarak da adlandırılırlar. Örnek olarak yetişkin kası kök hücreleri verilebilir [28, 29].



Şekil 2.5. Kök hücrelerin farklılaşma yolları [30].

2.2.1. Mezenşimal Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler sınıfına dahil olan MKH'lerin varlığına dair ilk çalışma 1970'te Friedenstein ve ark. tarafından yapılmıştır [31]. Bu çalışmada kısaca; farelere transplante edilen kemik iliğinin osteojenik hücreleri oluşturduğu aynı zamanda fibroblastik hücre morfolojisi sergilediği gözlenmiştir, bu da kemik iliğinin hematopoetik kök hücreler dışında osteojenik öncüller içerdiğini de göstermiş ve 'osteojenik kök hücreler' adını almıştır. Yapılan farklı çalışmalarda MKH'ler birçok farklı isimle ifade edilmektedir. Dokuların bağ doku bölgelerinde bulunan yetişkin kök hücreler olduklarından 'stromal kök hücreler' olarak da adlandırılmaktadırlar. Günümüzde ise stromal kök hücre terimi yerine MKH kullanılmaktadır. Bu ifadeyi ilk kabul eden ve kullanan kişi ise Al Caplan (1991) olmuştur [32].

1999'da Pittenger ve ark., kemik iliği hücrelerini osteojenik hücrelere dönüştürmenin yanı sıra adipositlere ve kondrositlere de farklılaştırmışlardır [33]. Yapılan tüm çalışmaların sonucunda; yüzeye yapışma özelliği gösteren, in vitro kültürde çoğalabilen, kendi kendini yenileme kapasitesine sahip, uygun büyüme faktörü ve koşullar altında

mezodermal dokulara (osteositler, adipositler ve kondrositler) farklılaşma kapasitesi gösteren hücrelere 'MKH' denir. MKH'ler aynı zamanda, kardiyomiyositler, hepatositler ve nöronlar gibi mezodermal olmayan dokulara da farklılaşabilmektedirler.

MKH'ler CD45, CD34, CD14, CD80, CD86 ve CD40 gibi molekülleri eksprese etmemesine karşın, değişken seviyelerde CD105, CD73, CD44, CD90, CD71, gangliosid GD2 ve CD271 ve monoklonal antikor STRO-1'i ifade etmektedirler. MKH'ler bu belirteçleri izole edildikleri kaynak ve türe bağlı olarak farklı seviyelerde ifade etmektedirler [32]. Örneğin; insan MKH'lerinde CD belirteçlerinden CD105, CD73 ve CD90 moleküllerinin ifadesi akış sitometri ölçümüne göre %95 ve üzeri, CD45, CD14, CD34, CD19 ve HLA II' nin ifadesi %2 ve daha aşağı seviyelerdedir [34].

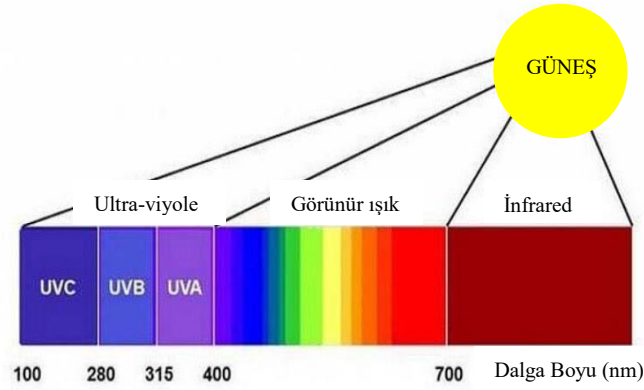
MKH'ler ilk olarak kemik iliğinden izole edilmiş olsalar da birçok farklı dokudan da izolasyonları yapılabilmektedir. Bu dokular arasında; adipoz doku, göbek kordonu, periferik kan ve iskelet kası gibi dokular bulunmaktadır [35].

MKH'lerin potansiyel terapötik etkileri uzun yıllardır çalışılmış ve çalışılmaya devam etmektedir. Klinik alandaki yüksek terapötik potansiyellerinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadırlar. Anti-inflamatuar ve immün modülatör etkileri, aynı zamanda bol miktarda büyüme faktörü ve sitokin salgılamaları dolayısıyla diğer hücre tiplerinden ayrılmaktadır [36].

Adipoz kökenli mezenşimal kök hücreler (AKMKH) ve kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreler (KMKH) uygun büyüme faktörleri ve koşullar altında kas hücrelerine, adipositlere, kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşmaktadırlar. AKMKH'ler yüksek terapötik potansiyelli oluşları ile klinik tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır [33]. Bu tez kapsamında da MKH'lerden, AKMKH ve KMKH'ler kullanılmıştır.

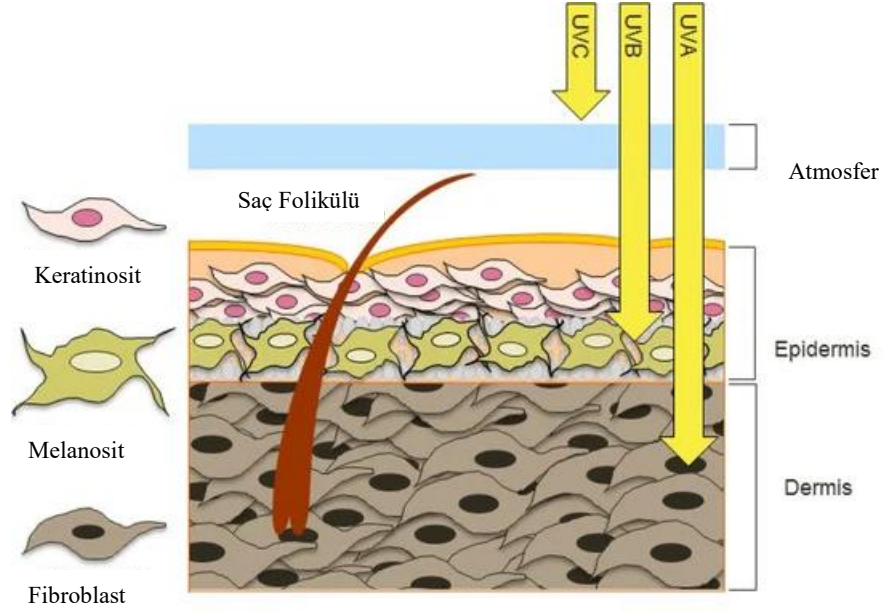
2.3. Ultraviyole (UV) Işığı

UV ışığı, foton dalga boyuna bağlı olarak üç çeşittir. UV-A en uzun dalga boyuna (315 - 400 nm), UV-B orta (290 - 320 nm) ve UV-C ise en kısa dalga boyuna sahip (100 - 280 nm) UV ışığıdır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. UV ışınları spektrumu.

Ortam ışığının %90-95' ini UV-A, %5-10' unu ise UV-B enerjisi oluşturmaktadır. UV-C ise çoğunluğu ozon tabakası tarafından emilmekte ve atmosfere ulaşamamaktadır. UV-A ışınları deride dermis tabakasına kadar, UV-B ışınları ise epidermis tabakasına kadar giriş yapabilmektedir (Şekil 2.7) [37].



Şekil 2.7. UV ışınlarının deriye nüfuz etme dereceleri.

UV ışığı, biyoteknoloji alanında hücreler üzerinde uyarıcı olarak sıklıkla kullanılan bir kaynaktır. UV ışığında dalga boyu ne kadar kısa olursa o kadar yüksek bir enerji yaymaktadır. Hücreler üzerinde uyarıcı olarak kullanılan UV ışınlarının enerjisi; ışığın çeşidi, uygulama süresi ve mesafesiyle değişmektedir [37].

2.3.1. UV Işığı ve Kök Hücrelerin İlişkisi

UV ışığına aşırı maruz kalındığında; eritem ve güneş yanığı gibi akut etkiler veya fotoyaşlanma ve kutanöz tümörler gibi kronik etkiler göstererek cilt hasarına neden olabilmektedir. UV ışığının etkisi; ışığın dalga boyu, türü, maruz kalma süresi gibi etkenlere bağlıdır [8].

UV ışınları ile tedavi günümüzde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Kanseri terapilerinde kullanılan UV ışınlanması ile sağlıklı dokulara zarar vermeden istenilen bölgede etki sağlamak hedeflenir. Tedaviden sonraki süreçte doku rejenerasyonunda daha çok kök hücreler rol oynamaktadır [38]. Kök hücrelerin pluripotent özellikleri, yüksek çoğalma ve kendini yenileme yetenekleri, onları doku hasarı ve yaralanmasının tedavisinde etkili kılmaktadır [39]. Yapılan bir çalışmada, atopik dermatit gibi deri hastalıklarının

tedavisinde MKH'lerin terapötik etkisinin üzerinde durulmuştur [9]. Aynı zamanda atopik dermatit gibi hastalıkların tedavisinde UV ışığı kullanımının olumlu etkisinin MKH'lerin UV maruziyeti ile artan potansiyele sahip olabileceği vurgulanmıştır [9].

Yapılan bir çalışmada, AKMKH'lerin insan fibroblastlarına uygulanan UV-B ışığının zararlı etkilerini tersine çevirdiği, bununla birlikte dermisin kalınlaşması ve tip I kollajen seviyesinin artmasını sağladığı gösterilmiştir [9]. MKH'ler fibroblast hücrelerini UV hasarına karşı koruyarak, deride UV ışınları maruziyeti ile kollajen seviyesini artırarak ciltte oluşan fotoyaşlanma etkilerini azaltmaktadırlar [9, 10].

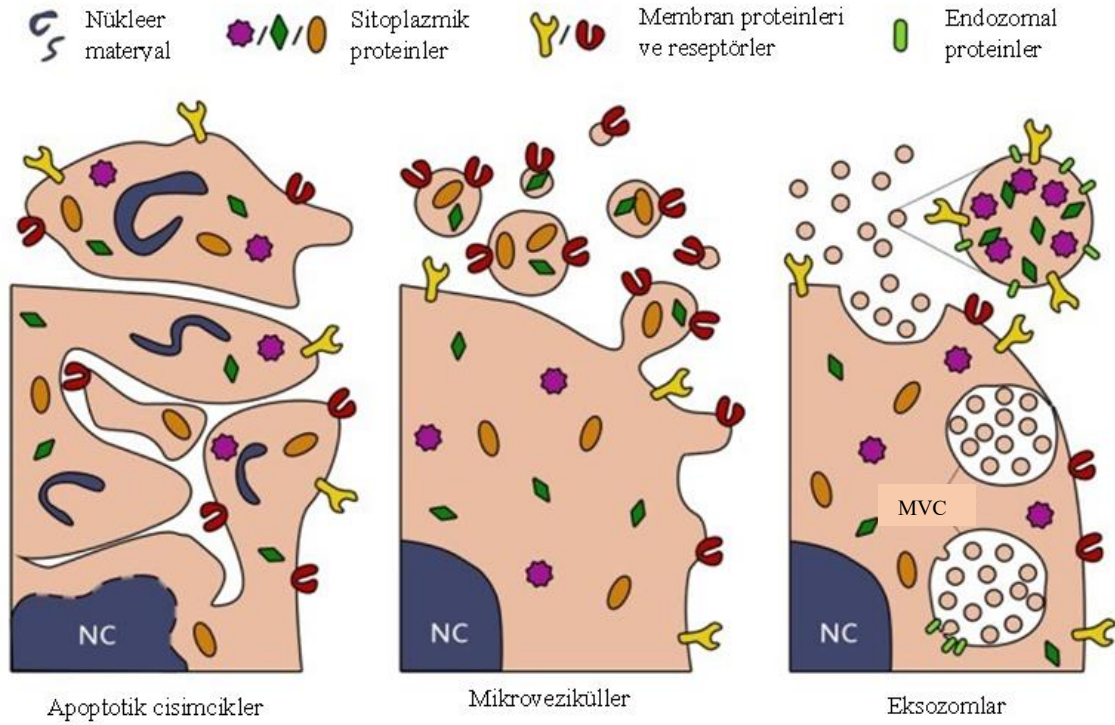
Literatürdeki başka bir çalışmada, UV ışığına maruz bırakılan fibroblast ve MKH'lerden kök hücrelerin fibroblastlara karşı daha dayanıklı olduğu ve aynı zamanda kök hücre özelliklerini koruduğu gösterilmiştir [11, 40].

MKH'ler UV-B'nin sebep olduğu cilt hasarının onarılmasında görev almaktadırlar. Yapılan bir çalışmada insan MKH'lerinin, dermal fibroblastlara kıyasla UV-B'ye karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada UV-B'nin MKH'lerin üzerinde morfolojik değişikliklere neden olmadığı ancak dermal fibroblastların göç etmeyle ilgili yeteneklerinde azalmalara sebep olduğu da gösterilmiştir [11].

2.4. Eksozomlar

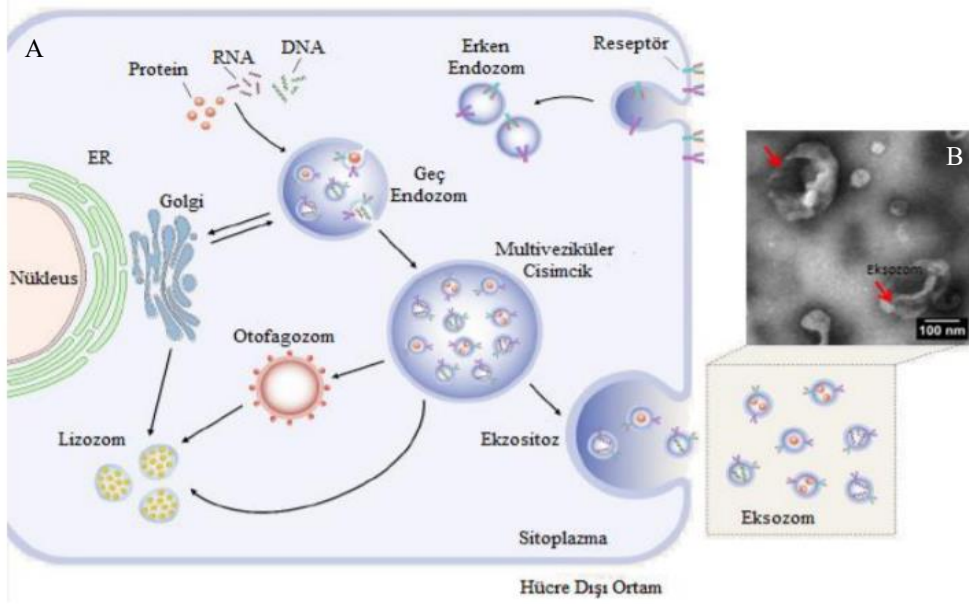
İn vitro çoğaltılan hücreler ve tüm biyolojik sıvılar farklı boyutlarda veziküller salgılamaktadır. Bu veziküller keşfedildiklerinden bugüne kadar çeşitli isimler almıştır, günümüzde ise genel bir isim olarak ekstraselüler veziküller (EV) olarak adlandırılmaktadırlar [41]. EV'ler hücreden salınım mekanizmalarına ve boyutlarına göre mikroveziküller, apoptotik cisimcikler ve eksozomlar olarak üçe ayrılmaktadır (Şekil 2.8). Mikroveziküller, hücrelerin plazma zarının direkt dışı doğru tomurcuklanması yoluyla salınırlar ve boyutları ise 100-1000 nm arasında değişmektedir. Apoptotik cisimcikler ise hücrenin geç apoptoz evresinde hücre parçalanması ile salınırlar, boyutları 50-5000 nm arasında değişebilmektedir. EV'lerin son üyesi olan eksozomlar 30-200 nm arasında değişen boyutlarla en küçük boyuta sahiptir [41-43]. Eksozomların keşfi ilk olarak Trams ve ark. tarafından 1980'li yıllarda olmuştur. 2007 yılına kadar eksozomların hücre dışına yok edilmek üzere çıkarılan atıklar olduğu düşünülmüştür fakat Valadi ve

ark. tarafından yapılan bir çalışmada eksozomların çeşitli nükleik asitler taşıdığı ve bunların alıcı hücrelerdeki davranışları modifiye edebileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda eksozomların hastalıkların tanı ve teşhisinde de rol alabileceği de aynı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir [44].



Şekil 2.8. Ekstraselüler veziküllerin şematize edilmiş hali [45]. MVC: Multiveziküler cisimcikler

Eksozomlar kan, idrar gibi çoğu vücut sıvısından ve neredeyse tüm hücrelerden salgılanan veziküllerdir [46]. Eksozomların salınım mekanizması endototik yol ile gerçekleşmektedir. Hücre zarının içe doğru tomurcuklanması ile oluşan erken endozomal yapılar hücre içerisinde çeşitli yapılarla birleşerek (RNA, DNA, proteinler gibi) geç endozomal yapılara dönüşürler. Geç endozomlar da plazma zarından içe doğru kıvrılarak çok sayıda küçük membran vezikülleri oluştururlar ve bu yapı “multiveziküler cisimcik (MVC)” adını alırlar. MVC’ler hücrede farklı metabolik yollar sergileyebilir fakat ekzositoz yoluyla içeriğini sitoplazmadan hücre dışı ortama salgılamasıyla çok potansiyelli “eksozomlar” oluşmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. A. Eksozomların hücrede oluşum mekanizması ve hücre dışına salınması. B. Eksozomların TEM mikroskop görüntüsü [47].

Eksozomlar salındıktan sonra hedef hücreye girişleri üç farklı yol ile olmaktadır:

1-Reseptör-ligand etkileşimi: Salınan eksozomun zarındaki transmembran proteinleri ile alıcı hücre zarındaki reseptörlerin direkt etkileşimi ile gerçekleşmektedir.

2-Membran füzyonu: Salınan eksozomun hedef hücrenin zarından doğrudan füzyon yoluyla hücrenin sitoplazmasına girişiyle gerçekleşmektedir.

3-Endositoz: Hedef hücrelerin eksozomları aktif bir süreçle içine almasıdır. En çok çalışılan endostotik yollar, makropinositoz, fagositoz, kltrin bağımlı endositoz ve kaveolin aracılı endositozdur [47].

Eksozomlar küçük, yuvarlak yapıları endozomal veziküllerdir. Görüntüleri en net biçimde transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile gözlenmektedir (Şekil 2.9). Eksozomlar lipit çift katmanlı yapıya sahiptir, herhangi bir organel içermezler ve sitozol oranları ise oldukça düşüktür. Sitoplazma ve zarlarında çeşitli ve bol miktarda proteinler (ısı şoku proteinleri (Hsc70), tetraspaninler (CD81, CD63, MHC I, MHC II, nükleik asitler (DNA, RNA), enzimler (ATPaz), mRNA, miRNA ve lipitler (kolesterol, sfingomiyelin) bulundurulur. Eksozomlar salındıkları hücre kaynaklarına göre spesifik protein ve nükleik asitler de salgılayabilmektedirler [48]. Hücre-hücre teması olmadan bu özellikleri

sayesinde hücreler arası iletişimde oldukça etkili rol oynamaktadırlar. Örneğin bağışıklık hücrelerinin salgıladığı eksozomlar, antijen sunumuna katılarak anti-inflamatuar özellik sergilemektedir. Tümör hücreleri eksozomları ise, kanserli hücrenin genetik bilgisini taşıdığından sağlıklı hücrelerde aktivite değişikliği ve tümör hücrelerini artıran bir mikro ortam oluşturabilmektedirler. Eksozomların bu gibi çeşitli özelliklerinden dolayı hastalıkların teşhis ve tedavilerinde sıklıkla kullanılmakta ve kullanımları da zaman içinde artmaktadır [43].

2.4.1. MKH'lerden Elde Edilen Eksozomlar

MKH'lerden elde edilen eksozomlar ilk olarak fare iskemi/reperfüzyon modelinde 2010 yılında çalışılmıştır [49]. Daha sonraki çalışmalarda çeşitli hastalık modellerinde de denemeler yapılmıştır. MKH eksozomlarının diğer hücelere göre (örneğin; miyoblastlar, insan embriyonik böbrek hücre dizisi) daha yüksek miktarda salım yaptığı gösterilmiştir. MKH eksozomları, yalnızca tüm eksozomların ortak yüzey belirteçlerinden olan CD81, CD9 gibi moleküllerin yanında MKH'lere özgü CD44, CD29 gibi belirteçleri de ifade etmektedirler [50].

MHK eksozomları ve diğer kaynaklardan elde edilen eksozomlar arasında, saklama koşulları, izole edilmeleri, morfoloji ve boyut açısından bir farklılık bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra MHK'lerden salınan eksozomların diğer kaynaklardaki eksozomlara göre potansiyel açıdan daha verimli oldukları çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir [51].

Terapötik etkinlikleri açısından MHK'ler ve salgıladıkları eksozomları karşılaştırıldığında MKH eksozomlarının daha avantajlı bir konumda olduğu görülmektedir. Bunu destekleyici birkaç özellik şu şekildedir; kök hücrelerin terapötik potansiyellerinin tümünü eksozomlar da göstermektedir, MKH eksozomları, MKH'lere göre daha yüksek verimli nükleik asitlere sahiptir, bağışıklık açısından MKH'ler immün reddi oluşturabilirken eksozomlarda böyle bir durum söz konusu değildir [50].

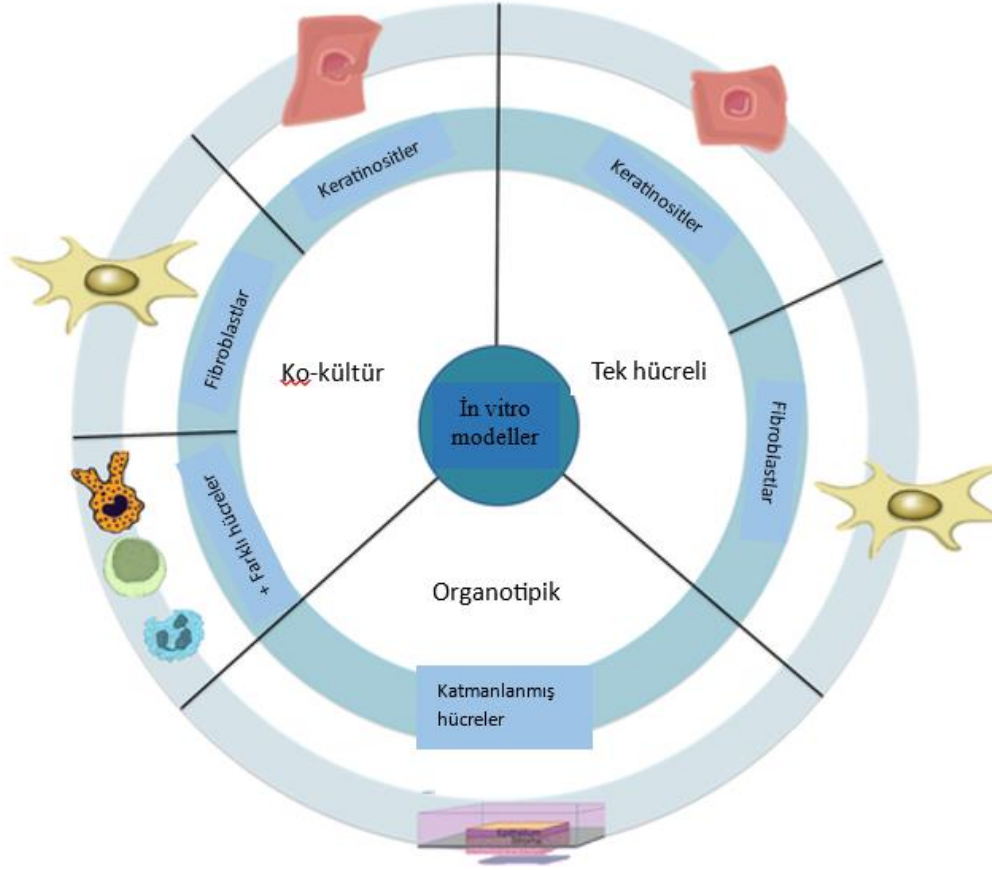
Yapılan çalışmalar, MKH'ler tarafından üretilen büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve diğer biyoaktif faktörlerin, salgıladıkları eksozomlarda ve mikro-parçacıklarda da bulunabileceğini göstermektedir [52, 53].

Hayvan modellerinde MKH eksozomlarının kullanımı, bağışıklık düzenleyici, onarım/rejenerasyon ve anti-inflamatuar özellikler göstermektedir. Bu özellikler ile bağışıklık hastalıkları, kanserler, nörolojik ve kalp hastalıkları gibi birçok alanda hücresiz tedavi uygulamalarında MKH eksozomlarının kullanımı önerilmektedir [54]. MKH eksozomları, onarımda da etkili rol aldığından kozmetik sektöründe de sıkça kullanılmaktadır [52, 54].

2.5. İn Vitro Yara Modelleri

Yara iyileşme çalışmaları, kronik yara ve ülserler gibi uzun bir süreç ve maliyet gerektiren yara biçimlerinden dolayı oldukça önem kazanmaktadır. Yara ve yara onarım modelleri; yeni terapötiklerin denenmesi, biyobelirteçlerin belirlenmesi ve doku onarımının mekanizmasını inceleyebilmek için gereklidir [55, 56].

Yara iyileşme çalışmalarında in siliko, in vivo, in vitro ve ex vivo gibi çeşitli modeller kullanılmaktadır. Hesaplamalı model olarak da adlandırılan in siliko modeller yara iyileşme süreçlerini anlamak ve tasarlamak için avantajlı olsa da biyolojik ortamda deneme yapılana kadar teorik olarak kalmaktadırlar. İn vivo modeller insan derisine en yakın deneme ortamını sunan modellerdir, dezavantajları ise etik sorunlar ve yüksek maliyetleridir. Ex vivo modeller, canlı ortamında çalışmayı sunan modellerdir fakat bir etkinin anında ve kısa vadeli oluşu dezavantajlarından biri olmaktadır. İn vitro yara modelleri hücre içi ve hücreler arası ilişkinin incelenebildiği uygun modellerdir [55-57]. İn vitro yara modelleri iki (2B) ve üç boyutlu (3B) olarak ayrılmaktadır (Şekil 2.10).

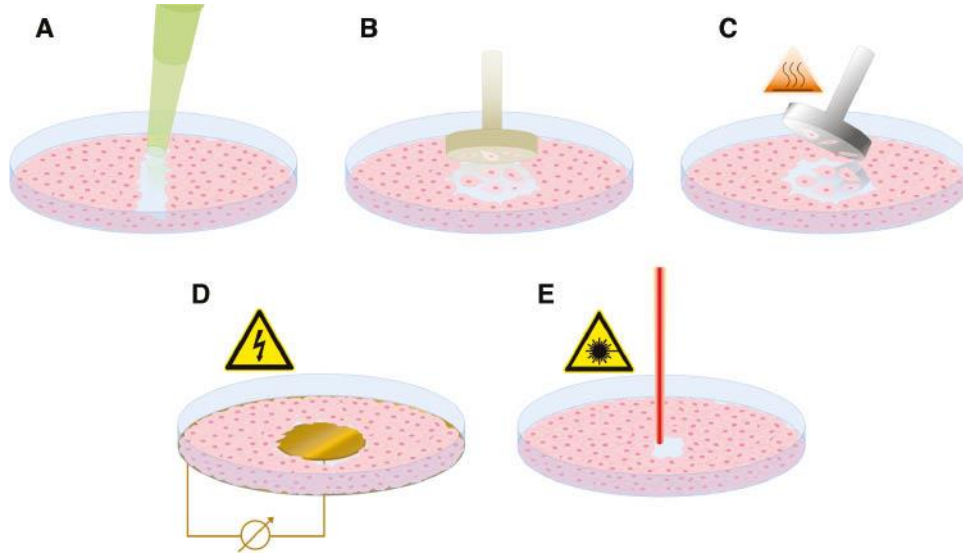


Şekil 2.10. İn vitro yara modellerinin oluşturulması için kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi [56].

2.5.1. İki Boyutlu (2B) İn Vitro Yara Modelleri

2B in vitro yara modellerinde, hücrelerin tek tabakalı veya birlikte, ortak şekilde kültürlenmesi (ko-kültür) ve Şekil 2.11'deki yöntemlerle yara oluşturularak incelenmesi yer almaktadır. Bu yöntemler arasında; çizik oluşturulması, damgalama, termal yaralama, elektrik ile yaralama ve lazer ışığı kullanılarak optik yaralama yer almaktadır. Çizik ile yaralama; pipet ucu gibi sivri bir alet kullanılarak hücrelerde yara oluşturulmasıdır. Damgalama yöntemi; konfluent hücreler üzerine bir damga kalıbı yerleştirerek manuel veya otomatik kuvvet uygulanarak damganın kapladığı alandaki hücrelerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Termal yaralama; genellikle sıcaklık ayarlı bir damgalama aleti kullanılarak yapılmakta ve deri yanık modellemesi için kullanılmaktadır. Elektrik ile yaralamada; hücrelerin bulunduğu plakanın altına bir elektrot yerleştirilerek ve yüksek bir akım darbesi uygulanarak oluşturulmaktadır. Optik yaralamada ise; hücreler üzerine

doğrudan lazer ışınları uygulanarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerde ortak olarak yara takibi, yara oluşturulduktan sonra alandaki ölü hücrelerin uzaklaştırılması ve hücre göçünün gözlenmesi biçiminde gerçekleştirilmektedir. Bu modellerde çoğunlukla fibroblast ve keratinosit hücreleri kullanılmaktadır. Tek tabakalı kültürde çoğaltılan hücrelerde pipet ucu ile çizik oluşturularak incelenen yara modeline ‘çizik testi’ adı verilmektedir [56, 58].



Şekil 2.11. 2B in vitro yara modellerinin şematik gösterimi [58].

2.5.2. Üç Boyutlu (3B) İn Vitro Yara Modelleri

2B kültür ortamında, hücreler ile ESM ilişkisi ve/veya hücre sinyal mekanizmaları gibi süreçlerin incelenmesine olanak olmaması sebebi ile 3B yara modellerinin in vitro çalışmalarda öne çıktığı görülmektedir. 3B in vitro yara modelleri ‘organotipik’ kültür olarak da bilinmektedir.

Fibroblast ve keratinositlerin tek tabakalı kültürlerinin transwell (gözenekli bir zar ile ayrılmış iki haznedan oluşan bir sistem) sistemler aracılığıyla etkileşiminin gözlenmesi de 3B model dahilindedir [56].

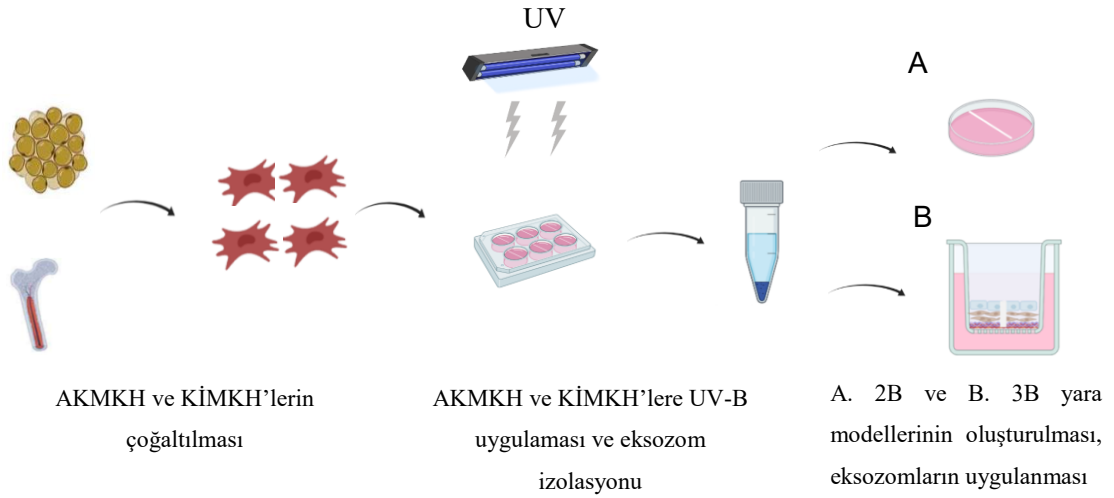
Bir diğer 3B yara modeline örnek olarak fibroblastların tip I kollajen jel içerisine gömülerek kültürlenmesi ve hücre dışı matriksin de etkisinin incelenmesi verilebilir.

Daha gelişmiş 3B yara modeline örnek olarak; transwell sistemler kullanılarak fibroblastlar, kollajen jeller içine gömülerek kültürlenmekte ve modele keratinositler de dahil edilmektedir. “Hava-sıvı arayüzü” denilen bir yöntem ile kollajen ile birlikte ekilmiş olan fibroblastların üst kısmına keratinositler de kültürlenerek transwell sistemde keratinositlerin üzeri açıkta bırakılmakta ve besiyeri ile besleme transwell’in dışından gerçekleştirilmektedir [59].

Bu tez çalışması kapsamında in vitro yara modeli olarak 2B yara modeli için ‘çizik testi’ tercih edilirken, 3B yara modeli için de kollajen jel ile oluşturulmuş olan ‘Hava-sıvı arayüzü’ yöntemi tercih edilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında yapılan tüm deneyler özetlenmiştir (Şekil 3.1). Çalışmada öncelikle hürelere uygulanacak UV-B dozu belirlenmiştir. Belirlenen UV-B dozu AKMKH ve KİMKH'lere uygulanmıştır. UV-B ile indüklenen ve indüklenmeyen AKMKH ve KİMKH süpernatantlarından eksozom izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen eksozomların karakterizasyon deneylerinden sonra Elisa analizleri ile eksozomların büyüme faktörü ve sitokin içerikleri incelenmiştir. 2B ve 3B yara modellerinde iyileşme etkisinin incelenebilmesi için HaCaT ve HDF hücre hatları kullanılmıştır. 2B modelde 'çizik testi' yöntemi ile yara modeli oluşturularak belirlenen eksozom dozları uygulanmış ve iyileşmenin takibi için hücre proliferasyonu ve yara kapanmasının ölçüm analizleri gerçekleştirilmiştir. 3B model oluşumu için kollajen jel kullanılarak hava-sıvı arayüzü yöntemi ile deri modeli oluşturulduktan sonra yaralar oluşturulmuştur. 3B yara modellerine, 2B yara iyileşmesinde en etkili eksozom dozlarının uygulaması yapılmış ve yara iyileşmesinin takibi için histolojik analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Tüm deneysel çalışmaların akış şeması.

3.1. Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal madde ve malzemeler aşağıda verilmiştir.

Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffered Saline: PBS) (P4417- 50TAB, SigmaAldrich, Almanya), Penisilin/ Streptomisin (P/S) (Katalog no: 3810-74-0 SigmaAldrich, Almanya), Fetal Sığır Serum (FBS) (Katalog no: S1810- 500, Biowest ABD), Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM- F12) (Katalog no :L0092-500, Biowest,ABD), Defined K-SFM Keratinocyte Serum Free Medium (Lot No: 2193049), Gibco), %0.25 Tripsin-EDTA (Katalog no: 9002-07-7,SigmaAldrich, Almanya), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Katalog no: D2650, SigmaAldrich, Almanya), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Katalog no: 298-93-1, SigmaAldrich, Almanya), Alamar Blue (Lot No: 2359501, Invitrogen), izopropil alkol (Katalog no: 109634, Merck Milipore), Akridin orange (AO) (Katalog no: 65-61-2, SigmaAldrich, Almanya), Propidyum iyodür (PI) (Katalog no: 25535-16-4, SigmaAldrich, Almanya), paraformaldehit (Katalog no: 30525-89-4, Merck Milipore), tripan mavisi (Katalog no: L 6323, Biochrom AG, Almanya), Allantoin (Katalog no: 97596, SigmaAldrich, Almanya), Sıçan Kuyruğu Tip I Liyofilize Kollajen (Lot No: 032022-2, Bugamed, Türkiye), RBC solüsyonu (Katalog no: 00-4333-57, Invitrogen), Deksametazon (Katalog no: 2392-39-4, SigmaAldrich, Almanya), İnsülin (Katalog no:19278, SigmaAldrich, Almanya), İndometazin (Katalog no: 53-86-1, SigmaAldrich, Almanya), BCA protein test kiti (ab207002, Abcam), Entellan (Katalog no:107961, Merck Millipore), Rat IL-6 Clia Kit (Katalog no: E-EL-R0015, Elabscience), TGF- β 1 ELISA Kit (Katalog no: E-EL-0162, Elabscience), VEGF-A ELISA Kit (Katalog no: E-EL-R2603), PDGF-BB ELISA Kit (Katalog no: ERA49RB).

3.2. Sıçan AKMKH ve KİMKH'lerinin İzolasyonu ve Kültürü

AKMKH ve KİMKH hücreleri laboratuvarımızda önceden izole edilmiş olup uygun koşullarda kullanılmaya hazır biçimde sıvı azotta (-196°C) saklanmıştır. ****Bu tez çalışması kapsamında önceden izole edilmiş ve uygun koşullar altında depolanmış hücreler kullanılmıştır (Kullanılmış olan hayvanlar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 22.06.2021 tarihli 2021/05-05 karar numarasıyla alınan onay ile temin edilmiştir). Önceki çalışmalarda uygulanan izolasyon basamakları kısaca aşağıda verilmiştir.***

AKMKH ve KMKH izolasyonu için *Wistar albino* sıçanlar kullanılmıştır. Etik kurallara uygun şekilde eter inhalasyonu ile ötenaziye alınan hayvanlarda steril koşullar altında flank ve gonadal adipoz dokuları toplanmıştır, akabinde arka ekstremitelerinde deri ve kas insizyonunu takiben tibia ve femur üzerinde bulunan tüm kas tabakaları uzaklaştırılmıştır. Nazikçe bu kemikler kesilerek vücuttan çıkarılmıştır. İzole edilen adipoz ve kemik dokular; içinde yüksek oranda antibiyotik içeren taşıma besiyeri (%4 P/S içeren DMEM/F12) içerisine alınmıştır. Tüm adipoz doku parçaları laminar kabin içinde taşıma besiyeri içeren petri kaplarında steril bir makas yardımıyla 4-5 mm olacak şekilde parçalara bölünmüştür. Taşıma besiyeri içinde olan kemik dokulardan ise kalan kas ve bağ dokular temizlenmiştir. Çıkarılan kemiklerin metafiz bölgeleri uzaklaştırıldıktan sonra içlerindeki kemik ilikleri 5 ml'lik enjektör yardımıyla %4 oranında P/S içeren taşıma besiyeri ortamına alınmıştır. 24 kuyucuklu kültür kaplarına alınan adipoz doku parçalarının üzerine birer damla primer besiyeri (%20 FBS ve %2 P/S içeren DMEM/F12) eklenmiş ve etüvde 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. 15 dk inkübasyon sonrasında doku kurumayacak şekilde doku çevresini kaplayacak kadar primer besiyeri eklenmiş ve dokular 24 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂-%95 O₂'de standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda her kuyucuğa 500 µL primer besiyeri eklenerek standart kültür koşullarında inkübasyona devam edilmiştir.

Alınan kemik iliği dokuları bisturi ucu ile olabildiğince küçük parçalara ayrılmıştır. Santrifüj tüplerine alınan dokular pipetleme ile homojenize edildikten sonra MKH'lerin kan hücrelerinden ayrılması için 1200 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Kök hücrelerin, kan hücrelerinden daha iyi ayrılabilmesi için 100x RBC (red blood cell lysis buffer) solüsyonu kullanılmıştır. Santrifüj sonunda elde edilen pelet 1:9 oranında RBC solüsyonu ve PBS ile süspanse edilerek 10 dk boyunca buz içerisinde bekletilmiştir. 10 dk sonunda tekrar yıkama gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemlerinin sonunda elde edilen pelet, %2 oranında P/S ve %20 FBS içeren DMEM-F12 içinde süspanse edilerek altı kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Kültür kapları 37°C'de ve %5 CO₂'de standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. İlk besiyeri değişikliği iki gün sonrasında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen MKH'ler üç kez pasajlanarak, 1., 2. ve 3. pasajlarda kademeli olarak dondurulmuş ve en son sıvı azotta saklanmıştır.

3.2.1. Sıçan AKMKH ve KİMKH'lerinin Karakterizasyonu

MKH'ler deneylerden önce immün boyama yöntemi ile karakterize edilmiştir. Bu hücrelere özgü pozitif ve negatif işaretleyici [CD90(+), CD105(+), CD29(+), CD44(+) ve CD45(-)] molekülleri ile standart immün boyama yöntemleri kullanılarak işaretlenmiştir.

Yapılmış olan boyama yöntemi kısaca aşağıda verilmiştir:

- AKMKH ve KİMKH'lerin 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekimleri yapılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında besiyerleri ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Soğuk metanol ile 5 dk boyunca fiksasyon gerçekleştirilmiştir.
- Yıkama işleminden sonra %10 engelleyici serum ile 20 dk inkübe edilmiştir.
- Yıkama işleminin ardından hücreler işaretleyicilere özgü primer antikolar ile bir saat boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra primer antikor solüsyonları uzaklaştırılarak hücreler sekonder antikor ile 45 dk boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon işleminden sonra sekonder antikor ortamdan uzaklaştırılarak hücreler inverted mikroskop (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japonya) aracılığıyla görüntülenmiştir.

3.2.2. Sıçan AKMKH ve KİMKH'lerinin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

AKMKH VE KİMKH'lerin adipojenik farklılaşma potansiyellerini incelemek için çeşitli büyüme faktörleri takviye edilmiş besiyeri kullanılmıştır. Kısaca, besiyerinde 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekimleri yapılan hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşmalarının ardından besiyerleri içerisine *adipojenik yönde farklılaşma uyarımı için*: 10^{-7} M deksametazon, 5 µg/mL insülin, 60 µM indometazin, 500 µM 3-izobütil-1-metilksantin ilavesi yapılmıştır. Farklılaştırma besiyeri 28 gün boyunca iki günde bir değiştirilmiştir. Farklılaştırma protokolünün sonunda; adipojenik farklılaşmanın görüntülenmesi için Oil Red O boyaması yapılmıştır.

3.3. UV-B'nin Uygun Dozunun Tespiti

AKMKH ve KİMKH'ler %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-F12 besiyeri içinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek inkübe edilmiştir (1×10^4 hücre/kuyucuk). İnkübasyonu takip eden 24. saatte hücrelerin üzerlerinden besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerini kapatacak şekilde steril PBS eklenmiştir. UV-B uygulaması yapılırken 96 kuyucuklu kültür kabının kapağı açık olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Hücrelere seçilen beş farklı UV-B dozu özel olarak tasarlanmış kutuya yerleştirilen Philips PL-S 9W/01 ampülü ile uygulanmıştır. Bu dozlar; UV-B kaynağının hücrelere olan uzaklığının sabit tutularak, uygulama süresinin değiştirilmesi ile ayarlanmıştır. UV kaynağından gelen ışığın yüzeye uyguladığı enerji, UV uygulama süresi ile değişmektedir [60]. Bu doğrultuda UV-B kaynağı ve hücreler arasındaki mesafe 16 cm olacak şekilde hesaplanmış ve hücrelere aşağıdaki gibi süre ve bu sürelerle karşılık gelen dozlarda uygulama yapılmıştır:

1. doz: 10 mJ/cm² (6.8 sn)

2. doz: 25 mJ/cm² (17 sn)

3. doz: 50 mJ/cm² (34 sn)

4. doz: 100 mJ/cm² (68 sn)

5. doz: 200 mJ/cm² (136 sn)

Farklı dozlarda UV-B enerjisine maruz bırakılmış AKMKH ve KİMKH'lerde MTT canlılık analizi yapılmıştır. Aynı zamanda hücrelerin UV-B'ye maruz bırakılmaları ile oluşabilecek apoptoz ve nekrozun incelenebilmesi için Akridin Turuncusu (AT)/Propidium İyodür (PI) çift boyama yöntemi kullanılmıştır.

3.3.1. Hücre Canlılık Analizi

AKMKH ve KİMKH' lere farklı dozlardaki UV-B uygulamasının ardından hücrelerin üzerinde olan PBS uzaklaştırılmış ve %10' luk MTT solüsyonu içeren serumsuz besiyeri kuyucuklara eklenerek 4 saat boyunca 37°C, %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. 4 saatin sonunda hücrelerin üzerinden MTT solüsyonu uzaklaştırılmış ve izopropil alkol eklenmiştir. 570 nm'de ELISA okuyucu (μ QuantTM, BiotekW Instruments Inc, ABD) cihazında absorbans okutulmuştur.

3.3.2. AT/Pİ Boyaması

Farklı dozlarda UV uygulaması yapılmış AKMKH ve KİMKH'lerin 12 saat inkübasyonu sonunda AT/Pİ boyaması yapılmıştır. Kısaca boyama yöntemi aşağıda verilmiştir:

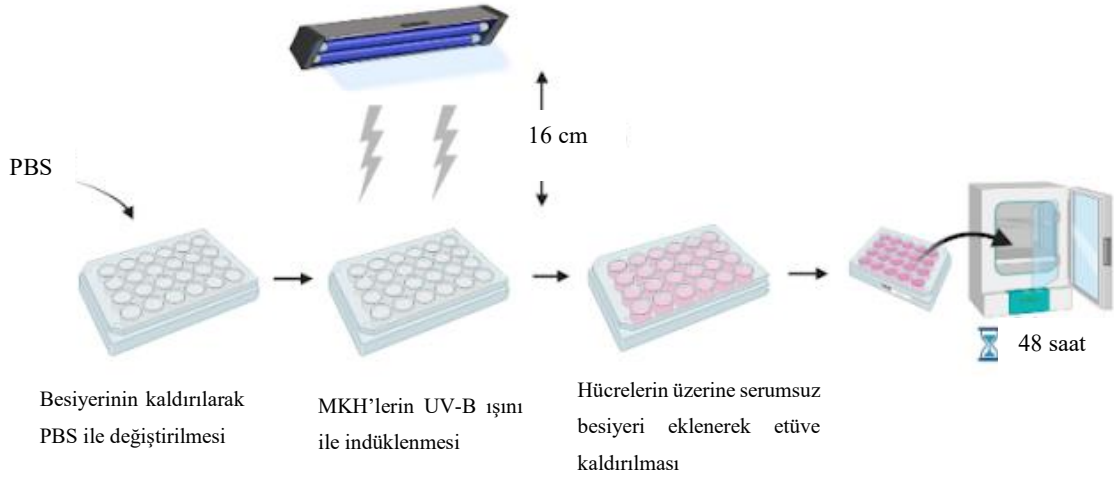
12 saat sonunda hücreler üzerindeki besi ortamları uzaklaştırılmıştır. 1:1 oranında hazırlanmış olan AT/Pİ boyası ile hücreler 1-2 dk boyunca boyaya maruz bırakılmıştır. Hücreler PBS ile iki defa yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonunda 460-490 nm dalga boyunda mikroskop altında inceleme yapılmış ve hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.4. UV-B Uygulanmış ve Uygulanmamış AKMKH ve KİMKH'lerden Ekzozom İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İçerik Analizleri

3.4.1. AKMKH VE KİMKH'lerden Süpernatant Eldesi ve Ekzozom İzolasyon Aşamaları

Sıvı azottan çıkarılan AKMKH ve KİMKH'ler 37°C'lik sıcak su banyosunda çözdürüldükten sonra 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda kryotüplerden üst faz uzaklaştırılmış ve hücre peleti %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-F12 içerisinde süspanse edilmiştir. **UV-B uygulaması yapılmayacak** hücreler süspanse edildikten sonra 75 cm² kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler PBS ile yıkanarak üzerlerine serumsuz DMEM-F12 besiyeri konularak 48 saat 37°C'de ve %5 CO₂'de inkübe edilmiştir.

UV-B uygulaması yapılacak hücreler ise; 6 kuyucuklu kültür kaplarına 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılmış ve hücrelerin yüzeyini kaplayacak kadar PBS eklenmiştir. 6 kuyucuklu kültür kabının kapağı açılarak UV-B'nin belirlenen en uygun dozu hücrelere uygulanmıştır. Hücrelerin üzerinden PBS solüsyonları uzaklaştırılarak serumsuz DMEM-F12 besiyeri konulmuş ve 48 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂'de inkübe edilmiştir (Şekil 3.2). 48 saat sonunda UV-B uygulanmış ve uygulanmamış hücreler üzerinden toplanan serumsuz besiyerleri 15 ml'lik tüplere alınarak ekzozom izolasyonuna kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. AKMKH ve KIMKH'lere UV-B uygulanması ve inkübasyon aşamalarının şematik gösterimi.

UV-B uygulaması yapılmış ve yapılmamış olan AKMKH ve KIMKH'lerinden toplanmış ve -80°C 'de muhafaza edilen süpernatantlar izolasyondan bir gün önce 4°C 'ye çıkarılmıştır. Eksozom izolasyonu için yüksek hızlı ultrasantrifüj cihazı (Thermo Scientific™, Sorvall™ WX+ Ultracentrifuge Series) kullanılmıştır. Kısaca aşağıdaki basamaklar takip edilerek izolasyon gerçekleştirilmiştir:

Hücre süpernatantları, soğutmalı santrifüj cihazında (Thermo Scientific™, Megafuge™ 16 Centrifuge Series) 4°C 'de, 300 g' de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar toplanarak 2000 g' de 20 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Hücre süpernatantları toplanarak ultrasantrifüj tüplerine alınmış ve 4°C 'de, 30 dk boyunca 10.000 g (9.800 rpm)'de santrifüj edilmiştir. Üst kısımda kalan süpernatantlar alınarak yeni santrifüj tüplerine konulmuştur ve 100.000 g'de 2 saat santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar toplanıp uzaklaştırılmıştır. Tüpler birkaç saniye vortekslenmiş ve 1 mL PBS ile süspansiyon edilerek tüm eksozom peletleri toplanmıştır. Toplanan eksozom peletleri yeni bir ultrasantrifüj tüpüne aktarılmıştır, 2 saat 100.000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış, pelet 200 μL PBS içinde süspansiyon edilerek -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Eksozom izolasyonları Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Eksozomların Karakterizasyon Analizleri

3.4.2.1. Akış Sitometri Analizi

UV-B uygulaması yapılmış ve yapılmamış olan AKMKH ve KİMKH'lerin eksozomları için toplam dört grupta, eksozom yüzey belirteçleri olan CD81 ve CD9 antikorlarının boyaması yapılmış ve akış sitometri cihazında (NOVOCYTE, ACEA Biosciences) okumaları gerçekleştirilmiştir. Bu analizler Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.

Üç gün süren protokol kısaca aşağıdaki basamakları takip ederek uygulanmıştır:

1. gün:

- 5 µL karboksil lateks boncuklar üzerine 25 µL PBS eklenerek 15.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 10 µL CD81 antikoru (Purified anti-mouse/rat CD81 Antibody, Biolegend) ve 12,5 µL PBS eklenerek 30 dk boyunca 4°C'de karıştırıcıda tutulmuştur. PBS ile miktar 125 µL'ye tamamlanarak gece boyu 4°C' de karıştırıcıda bırakılmıştır.

2. gün:

- Karıştırıcıdan alınan CD81 bağlı lateks boncuklar, 15.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet üzerine içerisinde %5 BSA (Bovine Serum Albumin) bulunan, 250 µL PBS eklenmiş ve 4 saat 4°C' de karıştırıcıda tutulmuştur. Bu işlemin sonunda 15.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak 50 µL %1 BSA eklenmiştir. Her bir grup örnek için 'boyanan-stain' ve 'boyanmayan-unstain' olarak ikişer tüp hazırlanmıştır. Tüplerin her birine 1 µL CD81 bağlı lateks boncuklar ve grubuna göre 1 µg eksozom örneği konulmuştur. Tüpler PBS ile 50 µL'ye tamamlanarak 30 dk karıştırıcıda tutulmuştur. 30 dk sonunda tüpler tekrar PBS ile 500 µL'ye tamamlanarak gece boyu 4°C'de karıştırıcıda bırakılmıştır.

3. gün:

- Karıştırıcıdan alınan tüpler 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Her tüpe 50 µL PBS eklenmiştir. "Stain" etiketli olan tüplere 2 µL FITC-CD9 (FITC anti-rat CD9 Antibody,

Cat no:206505, Biolegend) eklenmiştir. “Unstain” etiketli tüplere ise herhangi bir ekleme yapılmamıştır. Karanlık ortamda 2 saat boyunca 4°C’de karıştırıcıda inkübe edildikten sonra 100 µL PBS eklenerek akış sitometri cihazında okuma yapılmıştır.

3.4.2.2. Dinamik Işık Saçılımı (DIS) Analizi

UV-B uygulanmış ve uygulanmamış AKMKH ve KİMKH süpernatantlarından elde edilen eksozom örneklerinde DIS cihazı (Zetasizer Nano-S, MALVERN) ile eksozomların boyut analizleri Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nde yapılmıştır. Aşamalar kısaca aşağıdaki verilen basamaklar takip edilerek yapılmıştır:

Eksozom örnekleri sonikatör-vorteks aşamasından geçirilerek 1:100 oranında seyreltilmiştir. 10 µL eksozom örneği, 990 µL PBS içinde süspansiyon edilmiştir. DIS analiz programında eksozomlar için olan ‘refractive index (RI)’ = 1.38 ve ‘absorption coefficient (k)’ = 0.01 değerleri programa kaydedilmiştir. PBS içindeki 1 mL’lik eksozom örnekleri DIS cihazı kuvetine aktarılarak cihazda okuma yapılmıştır.

3.4.2.3. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

UV-B uygulanmış ve uygulanmamış AKMKH ve KİMKH’lerden elde edilen eksozom örneklerinin Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskopu analizleri, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında hizmet alımı kapsamında yapılmıştır. Analizden bir gün önce, örneklerden 10 µL alınarak özel TEM gridlerine yerleştirilmiş ve bir gün boyunca kurumaları beklenmiştir. Kuruyan örneklerden ertesi gün TEM görüntüleri farklı objektiflerde alınmıştır.

3.4.2.4 Nanopartikül İzleme Analizi (NİA)

UV-B uygulanmış ve uygulanmamış AKMKH ve KİMKH’lerden elde edilen eksozom örneklerinin NİA analizleri, Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi biriminde hizmet alımı kapsamında gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Eksozomların Miktar Tayini

UV-B uygulaması yapılmış ve yapılmamış AKMKH ve KİMKH'lerden izole edilen eksozomların konsantrasyon miktar tayinleri BCA protein test kiti ile yapılmıştır. Yöntem kısaca aşağıdaki protokole uygun şekilde yapılmıştır:

Kitten çıkan reaktifler 25:25:1 (A:B:C) oranında karıştırılmıştır. BSA standart konsantrasyonları seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu kültür kabına, hazırlanmış olan BSA standart konsantrasyonları ve 1:20 dilüe edilen (25 µL eksozom + 475 µL PBS) eksozomlar üçer tekrarlı ve 150'şer µL olarak kuyucuklara eklenmiştir. BSA standartları ve örneklerin olduğu kuyucukların üzerine 150'şer µL BCA reaktifi ilave edilmiş ve 30 sn hafifçe sallanarak karışması sağlanmıştır. Karanlık ortamda, 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 96 kuyucuklu kültür kabı oda sıcaklığına getirilmiş ve kuyucuklarda kabarcık olmadığından emin olunarak 562 nm'de mikropate okuyucuda (Epoch Microplate Spectrophotometer) absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.4.4. Eksozomlarda Büyüme Faktörü ve Sitokin Analizleri

Eksozomlar izole edildikten ve karakterizasyonları yapıldıktan sonra UV-B uygulaması yapılmış ve yapılmamış eksozomlardan büyüme faktörü ve sitokin analizleri yapılarak karşılaştırma yapılmıştır. IL-6 analizi için Rat IL-6 Clia Kit, TGF-β için TGF-β1 Elisa Kit, VEGF-A için Rat VEGF-A Elisa Kit ve PDGF-BB için Rat PDGF-BB Elisa Kit kullanılmıştır. Tüm Elisa deneyleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Elde edilen "standart eğri" grafiği ile belirlenen denklemlerden örneklerin absorbans değerleri hesaplanarak tüm grafikler oluşturulmuştur.

3.5. "Çizik testi" Yöntemi ile Yara Modeli Oluşturulması

3.5.1. İnsan Keratinosit (HaCaT) ve İnsan Fibroblast (HDF) Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Büyüme Eğrisinin Oluşturulması

HDF hücreleri %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM-F12 besiyeri içerisinde, HaCaT hücreleri ise %10 FBS ve %1 P/S içeren keratinosit besiyeri içerisinde 75 cm² hücre kültür kaplarına ekimleri yapılmıştır. Hücreler %80-85 yoğunluğa ulaştıklarında,

üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kültür kabının yüzeyini kaplayacak miktarda PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra hücreler üzerine %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine tripsin inaktivasyonu için %10 FBS içeren besiyeri eklenmiştir. Süspansede haldeki hücreler toplanarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan hücre peleti üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış, pelet taze besiyeri ile süspansede edilerek hücrelerin yoğunluğuna göre yeni kültür kaplarına ekimleri yapılmıştır.

Ko-kültür metodunda kullanılacak hücrelerin ikilenme zamanlarının belirlenebilmesi için büyüme eğrisi grafiği çıkarılmıştır. Grafiği oluşturmak için her iki hücre hattının da 96 kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^3 hücre/kuyucuk şeklinde ekimleri yapılmıştır. İlk hücre sayımı hücre ekiminden dört saat sonra gerçekleştirilmiş olup t0 olarak kabul edilmiştir ve 10 gün süre ile her 24 saatte bir hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Diğer hücreler sayılacakları güne kadar iki günde bir besiyeri değiştirilerek inkübe edilmiştir. Hücre sayımı için tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerin sayımdan önce tripsin ile muamele edilerek buldukları hücre kültür kabından kalkmaları sağlanmıştır. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra 1:1 oranında tripan mavisi ile süspansede edilerek Neubauer lamında ışık mikroskobu (Leica Microsystems, DM300) ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Her bir sayım üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3.5.2. “Çizik Testi” Yöntemi ile Oluşturulan Yara Modeline Eksozomların Uygulanması ve Yara İyileşme Potansiyelinin İncelenmesi

Büyüme eğrisi oluşturulan ve ikilenme zamanları bulunan HDF ve HaCaT'lar 24 kuyucuklu kültür kaplarına %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM F-12 besiyeri ile ekilmiştir. İlk olarak HDF hücreleri kuyucuk başına 2×10^4 hücre olarak ekilmiş, ekimi takip eden 24. saatte HaCaT'lar yine kuyucuk başına 2×10^4 hücre olacak şekilde HDF'lerin üzerine ekilmişlerdir. HaCaT'ların ekiminden 24 saat sonra hücreler kuyucuklarda konfluent hale gelmişlerdir. Konfluent haldeki hücrelerde ‘çizik testi’ yara modeli oluşturmak için hücreler üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmadan 200 µL'lik pipet ucu ile çizik oluşturulmuştur. Çizik oluşturulduktan sonra ölü hücrelerin uzaklaştırılması için hücreler PBS ile yıkanmıştır. Negatif kontrol grubu için FBS içermeyen DMEM F-12 kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu için yara iyileşmesinde yaygın olarak kullanılan

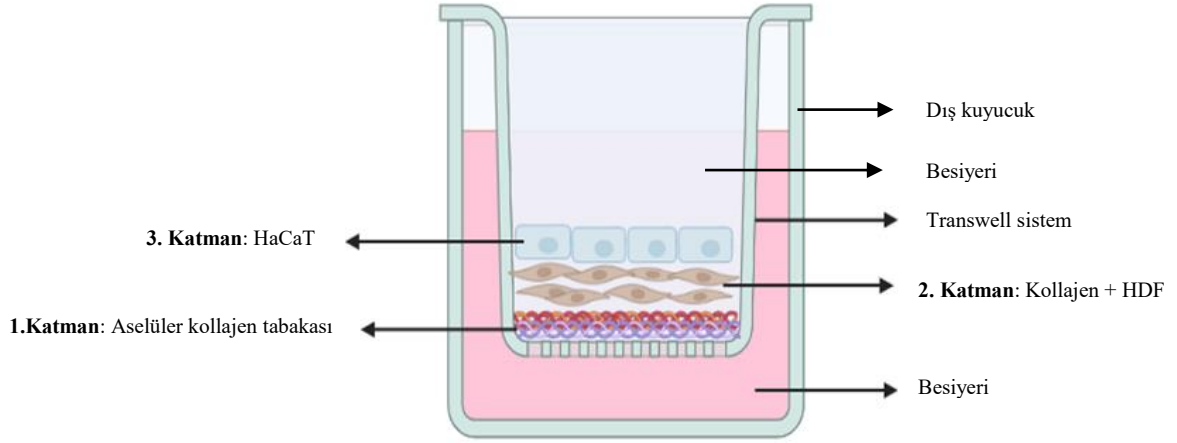
bir kimyasal olan allantoin (0,5 µg/ml) kullanılmıştır [61]. Eksozomlar; UV'li ve UV'siz AKMKH ve KİMKH gruplarının her biri için üç farklı doz (1, 5 ve 10 µg/ml) şeklinde denenmiştir.

HDF ile HaCaT'ların ko-kültürü ve yara modeli sonrası deney grupları oluşturulduktan sonra hücre göçünün görüntülenmesi için 12, 24, 36 ve 48. saatlerde fotoğraf çekimi inverted mikroskop ile yapılmıştır. Eş zamanlı olarak hücre proliferasyonunu gözlemek için Alamar Blue testi kullanılmıştır. Gruplarda kuyucuklardaki besiyerleri içerisine %10 oranında Alamar Blue uygulanarak 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler üzerindeki solüsyon toplanarak 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılmış ve iki farklı dalga boyunda (570 nm ve 620 nm) okuma yapılmıştır.

3.6. Üç Boyutlu (3B) Deri Yara Modelinin Oluşturulması ve Analizleri

3B deri modelinin oluşturulması için liyofilize “sıçan kuyruğu tip I kollajeni” kullanılmıştır. Model, üç katmandan oluşturulmuştur (Şekil 3.3). Birinci katman: ‘aselüler kollajen tabakası’ için; 0.006 g liyofilize kollajen, 250 µL %0.1 asetik asit (AA) içerisinde çözdürülmüştür. Jel kıvamına gelen kollajen üzerine sırasıyla 125 µL 10X PBS, 30 µL sodyum bikarbonat (NaOH), 125 µL distile su ve 470 µL FBS-DMEM F-12 (1:1) eklenerek pipetaj yapılmıştır [Gibco by life technologies, Collagen I Rat Tail]. Hazırlanan stok kollajen solüsyonundan transwell içerisine 150 µL ekilmiştir. Ekim yapıldıktan sonra 1-2 saat 37 °C’de laminar kabinde jelleşme için beklenmiştir. Etüve kaldırılmadan önce jel üzerine 100 µL %10 FBS’li DMEM F-12 besiyeri ilave edilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra ikinci katman için, ilk katman için hazırlanan jel yine aynı şekilde hazırlanmış bu defa her transwell için 1×10^5 HDF, kollajen jel içerisine ilave edilmiştir. Bir gün önce ekilen birinci katman üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak hazırlanan HDF’li kollajen jel 75 µL olacak şekilde birinci katman üzerine dikkatlice ekilmiştir. Ekimden sonra kültür kabı hareket ettirilmeden laminar kabin içerisinde 1-2 saat bekletildikten sonra jel üzerine 100 µL ve transwellerin dış kuyucuğuna 1,5 ml olacak şekilde %10 FBS’li DMEM F-12 besiyeri eklenerek etüve kaldırılmıştır. Bu aşamadan sonra jel katmanları 7 gün boyunca etüvede inkübe edilmiştir. Bu süreçte her iki günde bir transwell içindeki ve dışındaki besiyeri, %10 FBS’li DMEM F-12 ile değiştirilmiştir. 7. gün transwell içi ve dışındaki besiyeri uzaklaştırılarak jellerin orta kısmına dikkatlice 50 µL

içerisinde HaCaT'lar (2×10^5 hücre/transwell) %5 FBS içeren keratinosit besiyeri [(GIBCO, Keratinosit SFM (1X)] ile ekilmiştir. Kültür kabı hareket ettirilmeden laminar kabin içerisinde bir saat bekletilerek hücrelerin tutunması sağlanmıştır. Transwell'in iç ve dış kısmına %5 FBS içeren keratinosit besiyeri konularak etüve kaldırılmıştır. HaCaT ekimini takip eden 7 gün boyunca iki günde bir besiyerinin FBS oranı azaltılarak (%5, %2, %0) besiyeri değişimi yapılmıştır. 14. günde modeller hava-sıvı arayüzüne alınmıştır. Bunun için transwell içindeki besiyeri tamamen uzaklaştırılmış, dış kuyucuktaki besiyeri miktarı 500 μ L %5 FBS'li keratinosit besiyeri ile değiştirilmiştir. Yara modeli oluşturulacak olan deney gruplarının 21. güne kadar iki günde bir besiyeri değişikliği yapılmıştır.



Şekil 3.3. 3B deri modelinin şematik gösterimi.

3.6.1. 3B Deri Modelinin Oluşturulması ve İncelenmesi

Deri modellerinin oluşumunun ve gelişiminin incelenebilmesi için 7, 14 ve 21. günlerde dokular fikse edilerek histolojik boyama yapılarak inverted mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. Histolojik boyama için oluşturulan 3B deri dokuları %10' luk formaldehit solüsyonu içerisinde 1-2 saat bekletilerek fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra 30 dk distile su ile yıkama yapıldıktan sonra dokular alkol serisine alınmış ve sırasıyla aşağıdaki basamaklardan geçirilmiştir.

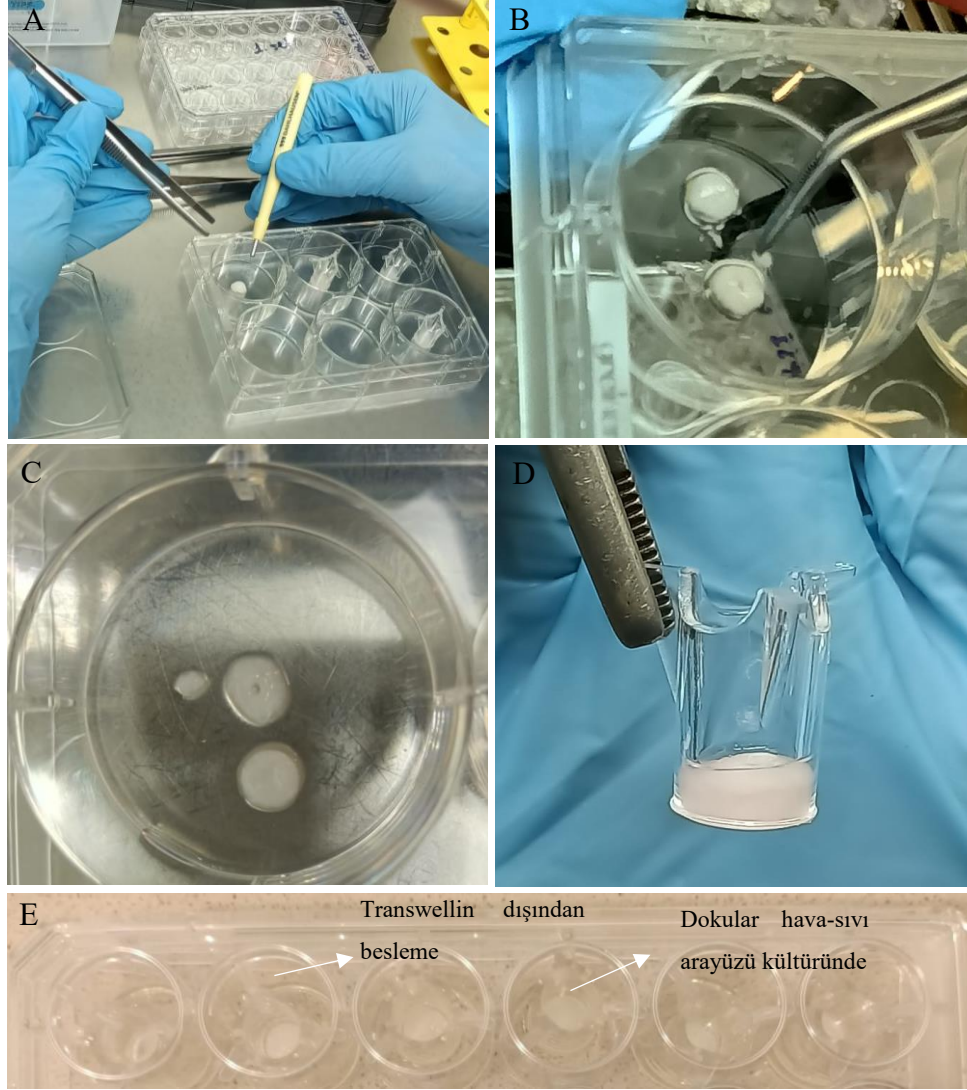
- 1- %70'lik alkolde 1 saat
- 2- %80'lik alkolde 1 saat
- 3- %90'lık alkolde 1 saat
- 4- %95'lik alkolde 1 saat
- 5- %95'lik alkolde 1 saat
- 6- %100'lük alkolde 1 saat
- 7- %100'lük alkolde 1 saat bekletilmiştir.

Alkol serileri sonrasında şeffaflaştırma işlemi için bir saat oda sıcaklığında ksilol içerisinde bekletilmiştir. Dokular parafine alınarak 60-65°C'de yaklaşık bir saat bekletilmiştir. Parafin değişimi yapılarak yarım saat daha bekletilmiş ve dokular doku gömme kasetine gömülerek 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Parafine gömülü olan dokulardan mikrotom (Leica RM2125RT) yardımıyla 5-10 µm'lik kesitler alınmıştır. Alınan kesitler 45°C'lik sıcak su banyosunda lam üzerine alınarak etiketlemeleri yapılmıştır. Sonrasında rutin hematoksilin-eozin (H&E) boyama yöntemi ile dokular boyanmıştır. Boyama sonunda preparatlar entellan yardımı ile kapatılmıştır.

3.6.2. 3B Deri Modelinde Yaranın Oluşturulması, Eksozom Uygulaması ve İyileşmenin Histolojik Olarak İncelenmesi

3B deri modelleri oluşturulduktan sonra (inkübasyonunun 21. günü) yara modeli oluşturulmuştur. Deri modelleri transweller içinden steril bir pens ile nazikçe çıkarıldıktan sonra altı well kuyucuğuna alınmıştır (Şekil 3.4-A). Deri modelleri tam orta kısmından steril dermatolojik biyopsi punch aleti (2mm-Dahlhausen) ile yaralanmıştır (Şekil 3.4-B). Yara oluşturulan deri modelleri, daha öncesinden 'yara destek kollajeni (HDF içeren kollajen)' olarak kültürlenmiş jellerin üzerine alınmıştır (Şekil 3.4-D). Yara modelleri için AKMKH ve KİMKH eksozomlarının uygulanacağı gruplara sırasıyla "çizik testi" sonuçlarına göre belirlenen 10 µg/ml ve 5 µg/ml dozlar serumsuz besiyeri içerisinde uygulanmıştır. Besiyeri uygulaması sadece transwell dışından gerçekleştirilerek "hava sıvı arayüzü" kültürüne devam edilmiştir (Şekil 3.4-E). Yara iyileşmelerinin analizleri, yarayı oluşturduktan sonraki 3. ve 7. günlerde yapılmıştır. 7 günlük yara iyileşmesi takibi için 4. gün dokuların besiyeri tazelenmiştir. 3. ve 7. günlerde, yöntem 3.6.1'de açıklandığı gibi doku fiksasyonu ve H&E boyama yapılarak

incelenmiştir. Görüntülerde katmanlar ve iyileşme yara bölgelerinde hücrelerin infiltrasyonu ile tespit edilmiştir.



Şekil 3.4. 3B deri yara modelinin oluşturulma aşamaları. A. Dermatolojik punch yardımı ile yaranın oluşturulması. B. Punch ile çıkarılan doku parçasının uzaklaştırılması. C. Deri modelinde oluşturulmuş yara modeli. D. Oluşturulan deri yara modelinin iyileşmesinin takip edilmesi için HDF’li kollajen jel üzerine yerleştirilmiş görüntüsü. E. Eksozomların yara modellerine uygulanması.

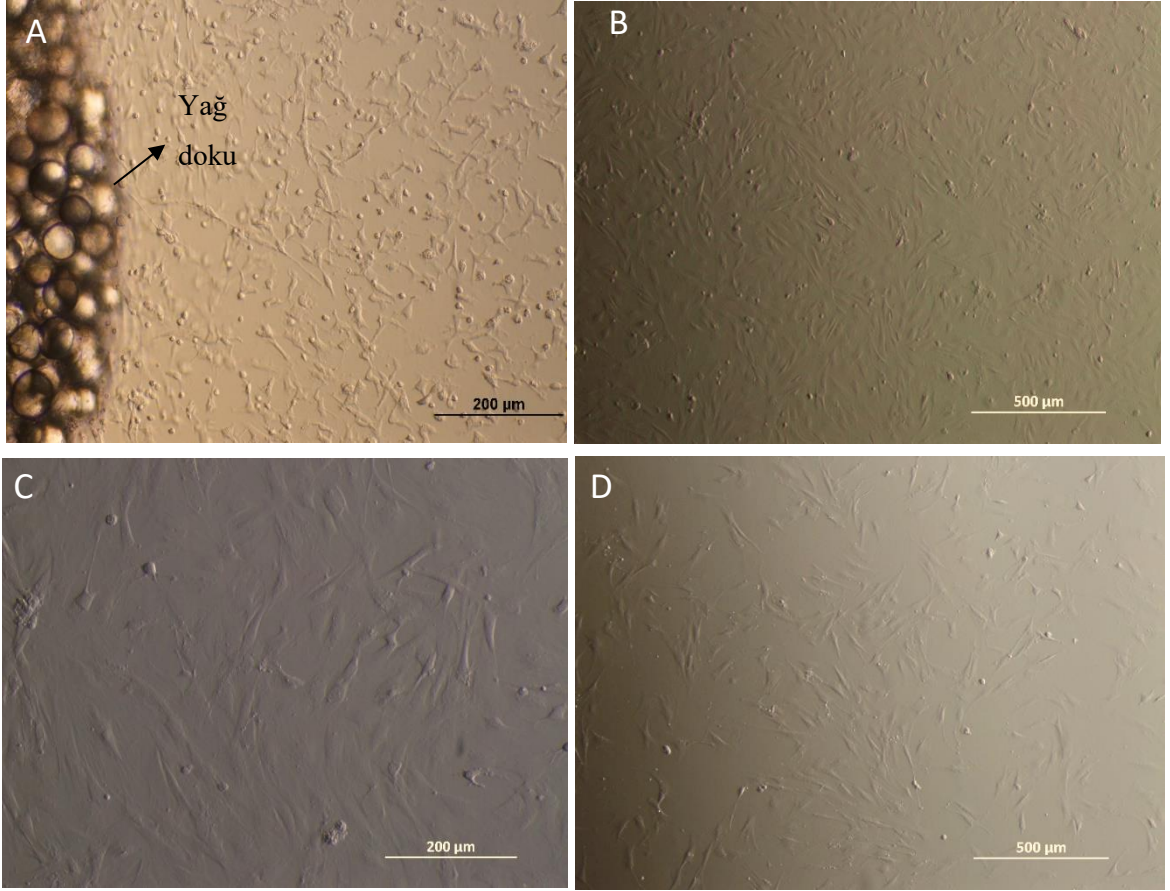
3.7. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasındaki tüm istatistiksel analizler Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) yazılım programı ile gerçekleştirilmiştir. Farklı gruplar arasındaki karşılaştırmalar Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile yapılmış ve p değerinin 0,005'ten küçük olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR

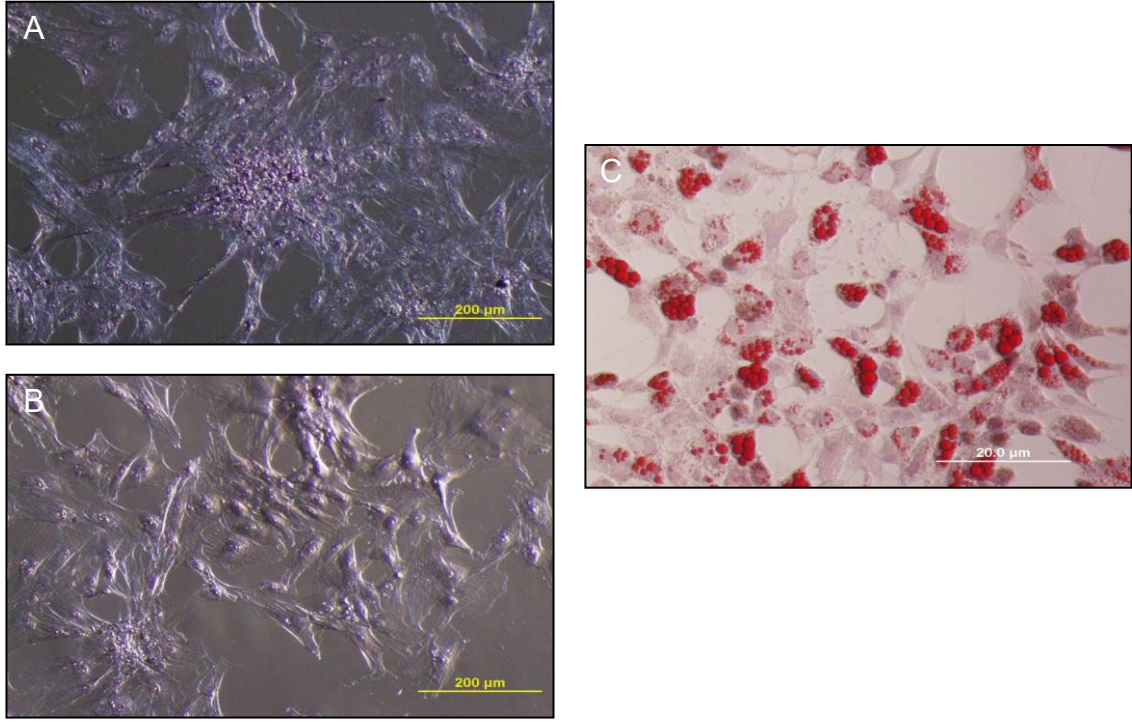
4.1. AKMKH ve KMKH Çoğaltılması, Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

AKMKH'lerin yağ dokularından ayrılması Şekil 4.1 A'da ve pasajlanması sonucunda elde edilen morfolojik görüntüleri Şekil 4.1 B ve C' de verilmiştir. KMKH'ler izolasyon sonrasında elde edilen morfolojik görüntüsü ise Şekil 4.1 D' de verilmiştir.



Şekil 4.1. A. AKMKH'lerin primer izolasyonunun ikinci günü (x10 büyütme), B ve C. AKMKH'lerin pasaj iki görüntüleri (sırasıyla x4 ve x10 büyütme), D. KMKH'lerin pasaj iki görüntüsü (x4 büyütme)

MKH'lerin adipojenik hücrelere farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir. Adipojenik farklılaşma kapasitesi; nötral lipid vakuollerinin Oil-red O boyanması ile hücrelerdeki birikimi gösterilerek incelenmiştir (Şekil 4.2). Adipojenik farklılaşma potansiyelleri hücrelerin yağ damlacıklarının kırmızı boyanması ile tespit edilmiştir.



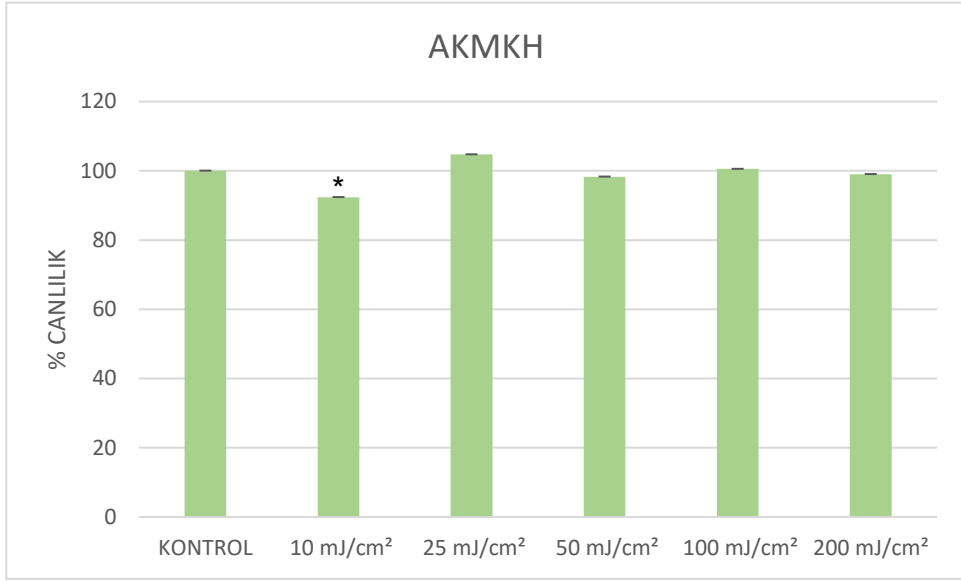
Şekil 4.2. MKH'lerin adipojenik farklılaşma potansiyelleri. A. ve B. AKMKH kontrol grupları, C. Oil-Red O boyama ile yağ damlacıklarının gözlenmesi.

MKH'lerin karakterizasyonu için immün boyama yöntemi sonuçlarına göre, bu hücelere özgü pozitif ve negatif işaretleyici [CD90(+), CD105(+), CD29(+), CD44(+), ve CD45(-)] moleküllerin floresan boyama sonucunda ifade edildiği görülmüştür. Hücreler boyanma sonucunda floresan aydınlatma ile inverted mikroskopta görüntülenmiştir.

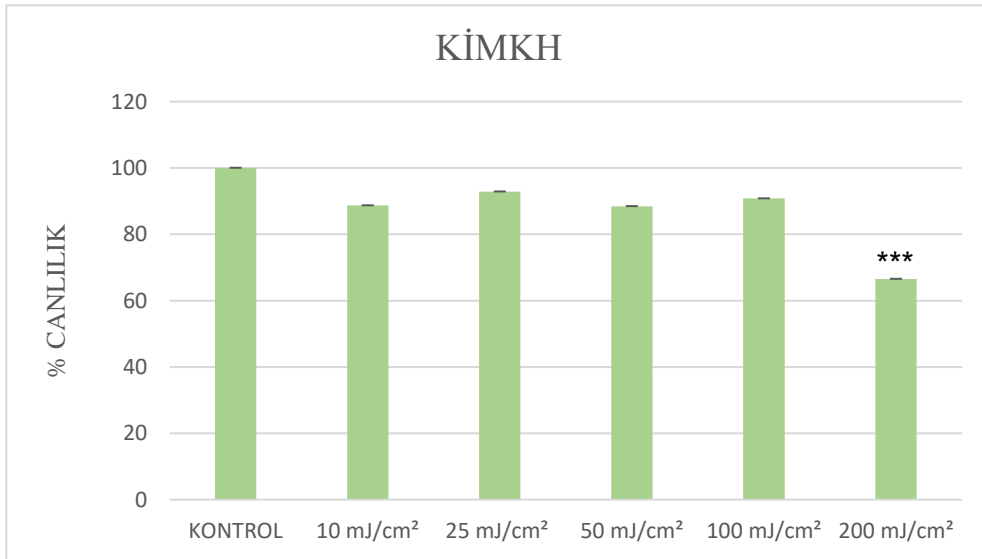
4.2. UV-B'nin Uygun Dozunun Bulunması

4.2.1 MTT Analizi

AKMKH ve KMKH'lerin MTT sonuçları değerlendirildiğinde 25 mJ/cm² UV-B doz uygulamasının en yüksek hücre canlılığı gösterdiği görülmüştür. AKMKH'lerde 10 mJ/cm² UV-B dozunda bir düşüş gözlenmiş olup bu düşüşün anlamlı derecede olduğu bulunmuştur (*; p ≤ 0,05). KMKH'lerde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş 200 mJ/cm²'de gözlenmiştir (***) (p ≤ 0,001) (Şekil 4.3 ve 4.4).



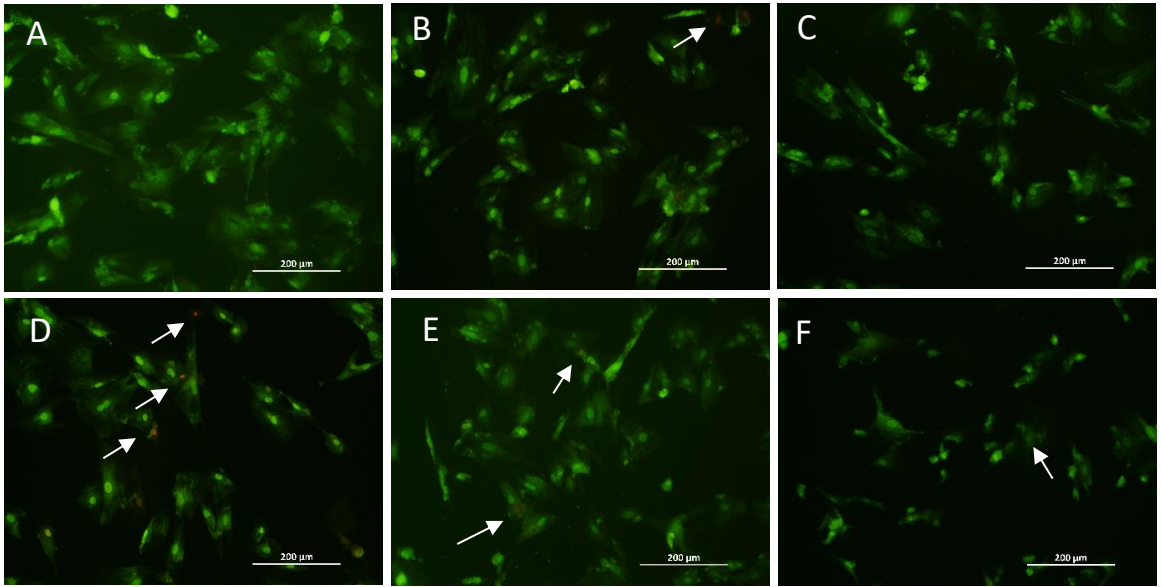
Şekil 4.3. AKMKH'lere UV-B'nin farklı doz uygulamalarından sonra % canlılık analizleri. UV grupları kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık: *; $p \leq 0,05$



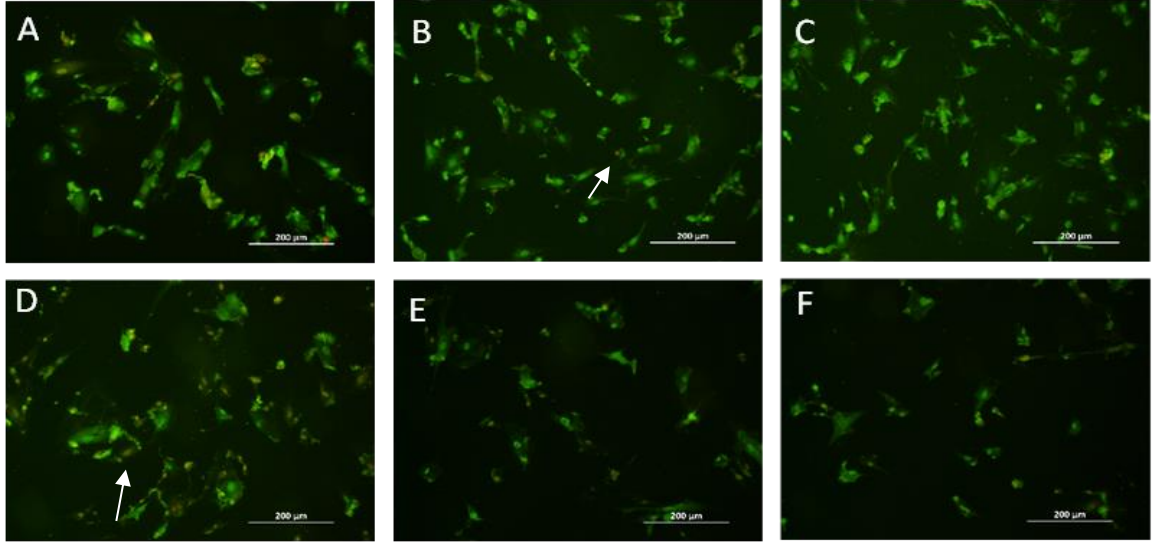
Şekil 4.4. KİMKH'lere UV-B'nin farklı doz uygulamalarından sonra % canlılık analizleri. UV grupları kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık: ***; $p \leq 0,001$

4.2.2 AT/Pİ Boyaması

Yapılan AT/Pİ boyamalarına göre AKMKH ve KİMKH'lere yapılan 25 mJ/cm² UV-B doz uygulamasında, MTT sonuçlarını destekler nitelikte diğer UV-B dozlarına kıyasla daha az ölü hücrelerin olduğu görülmüştür. Oklarla gösterilen hücrelerde PI boyasının hücre zarı parçalandığı için hücrenin içine girerek ölü hücrelerin turuncu olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6). Elde edilen sonuçlara göre özellikle hücre canlılığında ve sayısında düşüşün olmadığı doz olan 25 mJ/cm²'nin en uygun doz olduğuna karar verilerek tüm deneyler bu doz kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.5. AKMKH'lerin farklı dozlarda UV-B uygulamaları sonrası AT/Pİ boyama görüntüleri. A. Kontrol grubu, B. 10 mJ/cm², C. 25 mJ/cm², D. 50 mJ/cm², E. 100 mJ/cm², F. 200 mJ/cm² (x10 büyütme)



Şekil 4.6. KMKH'lerin farklı dozlarda UV-B uygulamaları sonrası AT/Pİ boyama görüntüleri. A. Kontrol grubu, B. 10 mJ/cm², C. 25 mJ/cm², D. 50 mJ/cm², E. 100 J/cm², F. 200 mJ/cm² (x10 büyütme)

4.3. UV-B Uygulanmış ve Uygulanmamış AKMKH ve KMKH'lerden Eksozom İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İçerik Analiz Sonuçları

4.3.1. Eksozom İzolasyonu

Yapılan eksozom izolasyonu sonucunda, PBS içinde süspanse halde olan eksozomların miktar analizi BCA kiti (ABCAM, ab207002) kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen miktarlar Çizelge 1'de verilmiştir:

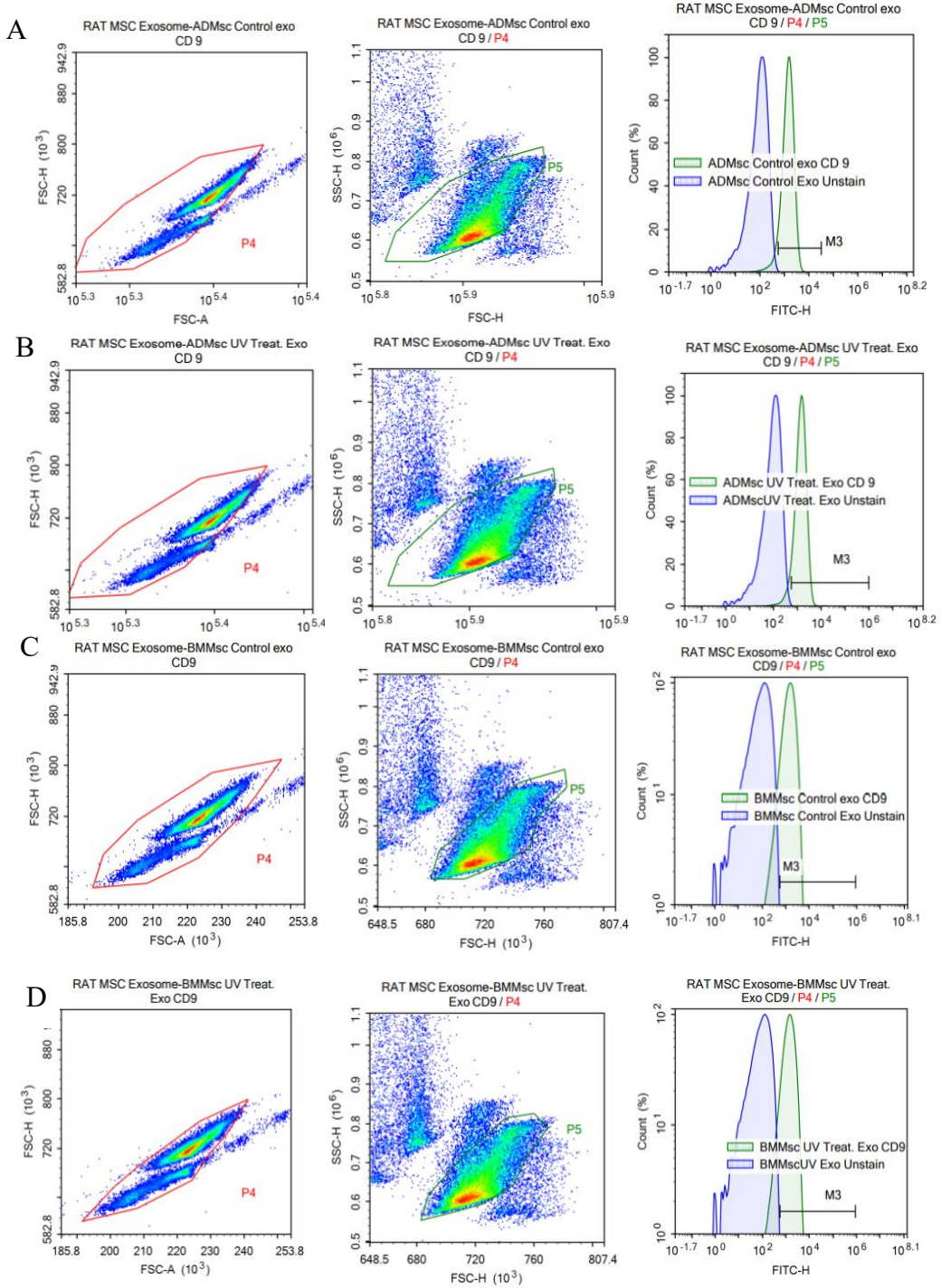
Çizelge 1: AKMKH ve KİMKH süpernatantlarından izole edilen eksozom konsantrasyonları.

Süpernatant Grupları	Elde Edilen Konsantrasyon
UV'siz AKMKH Süpernatantı	411.6 µg/ml (2.000.000 hücre süpernatantı)
UV'li AKMKH Süpernatantı	557.93 µg/ml (2.400.000 hücre süpernatantı)
UV'siz KİMKH Süpernatantı	362.8 µg/ml (2.000.000 hücre süpernatantı)
UV'li KİMKH Süpernatantı	370.8 µg/ml (2.400.000 hücre süpernatantı)

4.3.2. Eksozomların Karakterizasyon Sonuçları

4.3.2.1. Akış Sitometri Analizi

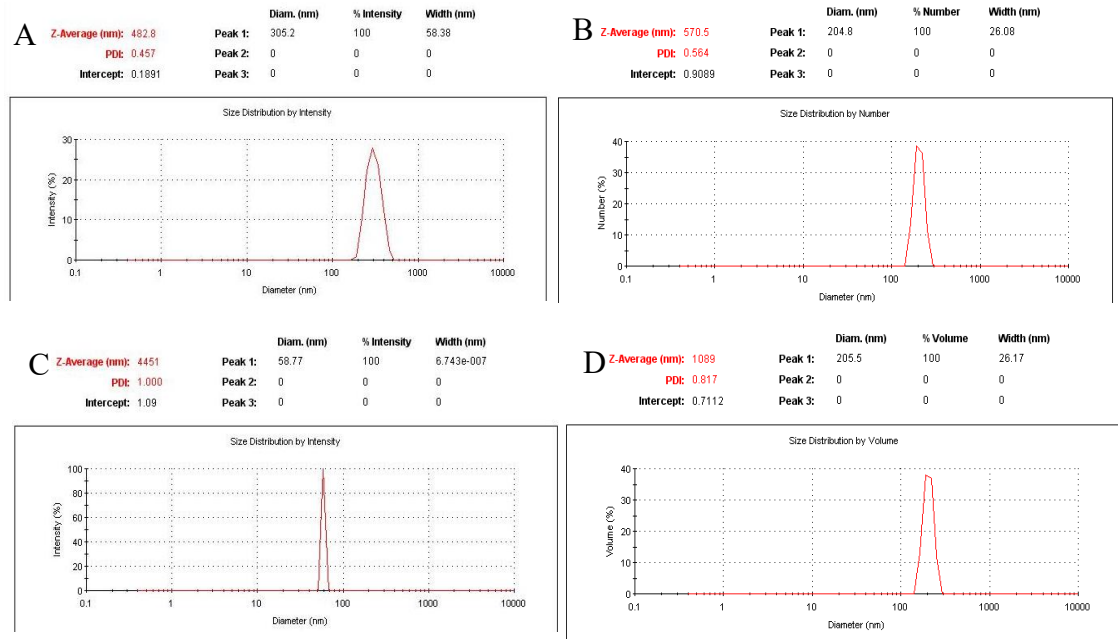
Akış sitometri analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.7); UV'siz AKMKH eksozomları %92,27, UV'li AKMKH eksozomları %91,93, UV'siz KİMKH eksozomları %92,20 ve UV'li KİMKH eksozomları ise %92,06 FITC-CD9 antikoruna ile boyanmıştır. Bu sayede AKMKH ve KİMKH'lerden elde edilen eksozomların tipik eksozom yüzey belirteci olan CD9 ve CD81'u ekspres ettiği doğrulanmıştır.



Şekil 4.7. Akış sitometri analiz sonuçları. A. UV'siz AKMKH eksozomları, B. UV'li AKMKH eksozomları, C. UV'siz KIMKH eksozomları, D. UV'li KIMKH eksozomları.

4.3.2.2. DIS Analiz Sonuçları

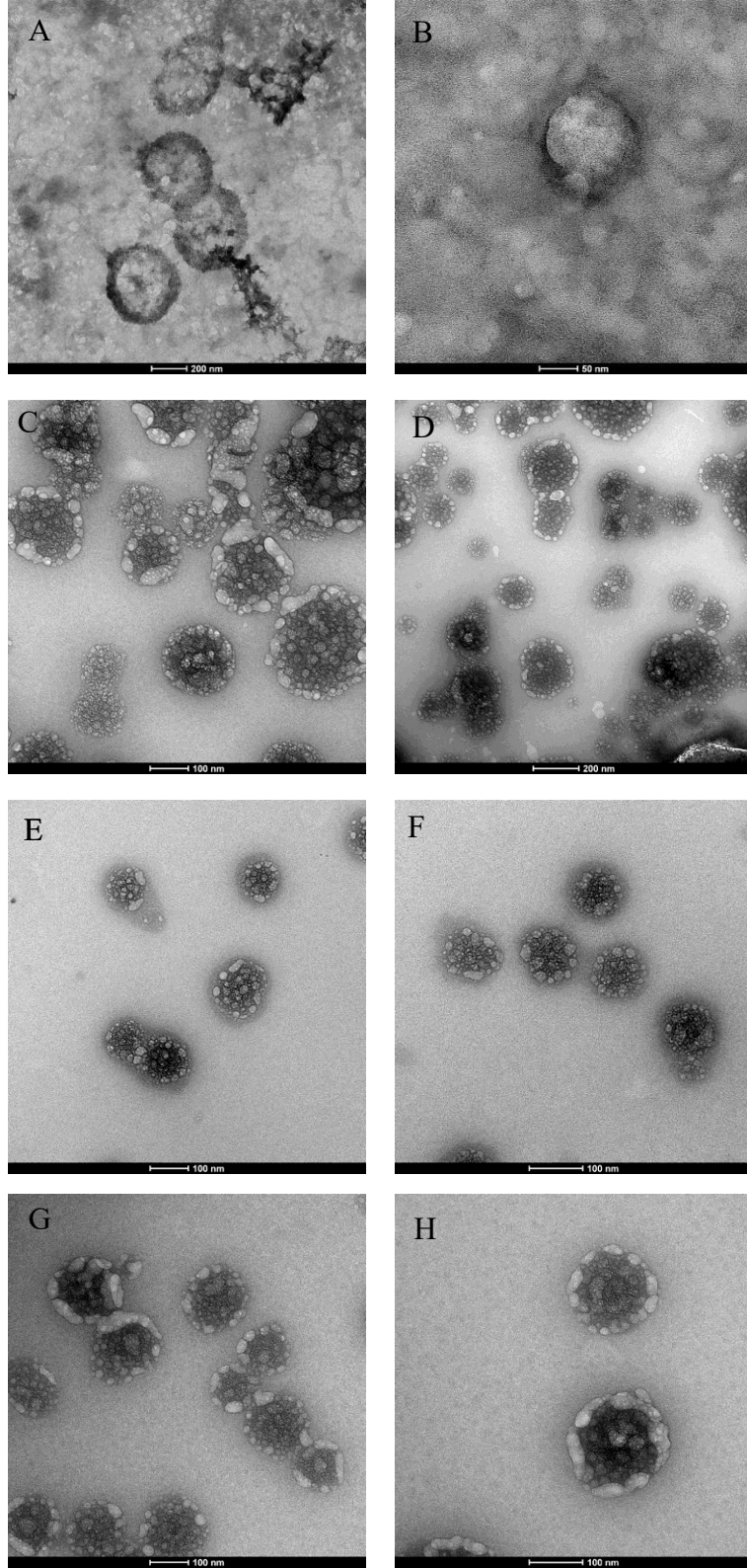
Yapılan DIS analizleri sonucunda ortalama partikül boyutları, UV'siz AKMKH'lerin 305.2 nm, UV'li AKMKH'lerin 204.8 nm, UV'siz KİMKH'lerin 58.77 nm ve UV'li KİMKH'lerin 205.5 nm olduğu görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. A. UV'siz AKMKH'lerin DIS ölçüm sonucu, B. UV'li AKMKH'lerin DIS ölçüm sonucu, C. UV'siz KİMKH'lerin DIS ölçüm sonucu, D. UV'li KİMKH'lerin DIS ölçüm sonucu.

4.3.2.3. TEM Analiz Sonuçları

AKMKH ve KİMKH'lerden elde edilen eksozomların TEM mikroskop görüntüleri Şekil 4.9'da verilmiştir. Sonuçlara göre elde edilen eksozomların yaklaşık 100-300 nm boyut aralığında oldukları ve tipik yuvarlak görüntü sergiledikleri gözlenmiştir.

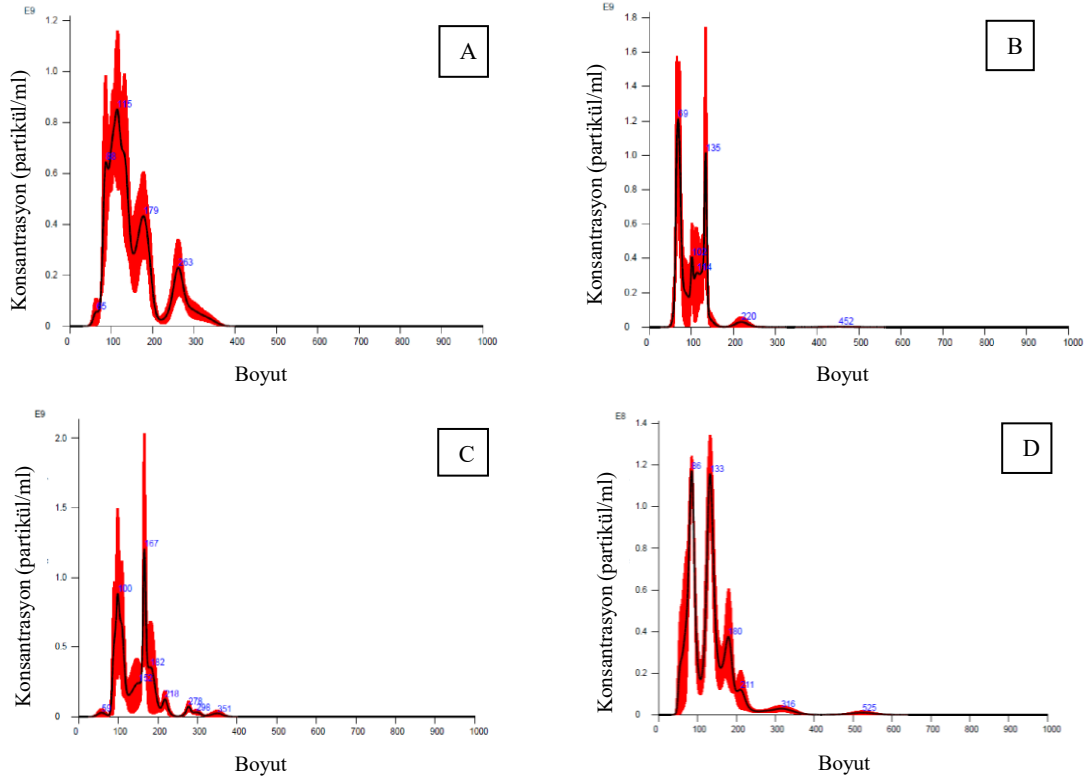


Şekil 4.9. UV'li ve UV'siz AKMKH ve KMKH eksozomlarının TEM görüntüleri. A-B. UV'siz AKMKH eksozomları. Ölçek çubukları; sırasıyla 100 nm ve 50 nm'dir. C-D. UV'li AKMKH eksozomları. Ölçek çubukları; sırasıyla 100 nm ve 200 nm'dir. E-F.

UV'siz KİMKH eksozomları. Ölçek çubuğu 100 nm'dir. G-H. UV'li KİMKH eksozomları. Ölçek çubuğu; 100 nm'dir.

4.3.2.4. NİA Sonuçları

NİA sonuçları aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. Sonuçlara göre süspansiyon içerisindeki eksozomların boyut ortalamaları, UV'siz AKMKH'lerin 150.7 nm, UV'li AKMKH'lerin 101.5 nm, UV'siz KİMKH'lerin 147.4 nm ve UV'li KİMKH'lerin ise 132.3'tür (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. AKMKH ve KİMKH eksozomlarının NİA analiz sonuçları. A. UV'siz AKMKH, B. UV'li AKMKH, C. UV'siz KİMKH, D. UV'li KİMKH

4.3.3. Eksozomların Büyüme Faktörü ve Sitokin Analiz Sonuçları

UV'li ve UV'siz AKMKH ve KİMKH eksozomlarının büyüme faktörü ve sitokin içeriğindeki değişimlerin karşılaştırılması için Elisa analizleri yapılmıştır.

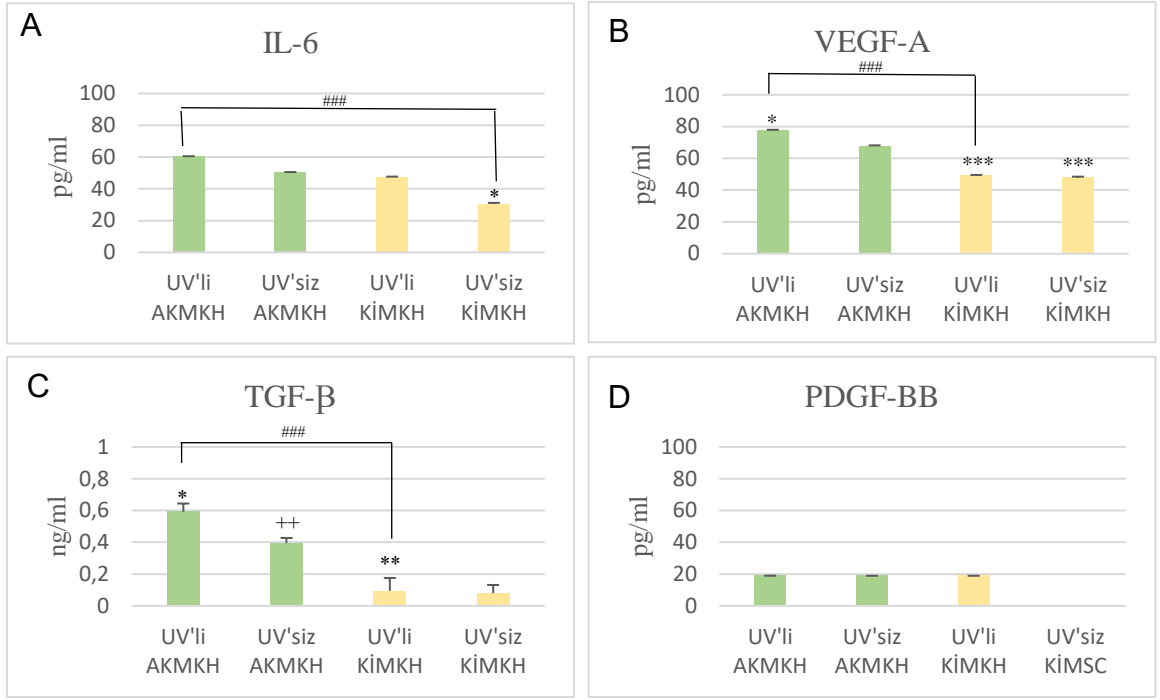
IL-6, TGF- β ve VEGF-A sonuçlarına göre AKMKH ve KMKH eksozomlarının UV-B ile indüklenenleri, indüklenmeyen gruplarına göre daha yüksek miktarda sitokin salınımı göstermiştir. AKMKH eksozomları, KMKH'lerden elde edilen eksozomları ile kıyaslandığında, AKMKH'nin hem UV'li hem de UV'siz eksozomlarından salınan IL-6, TGF- β ve VEGF-A miktarlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

IL-6 sonuçlarına göre; UV'li AKMKH eksozomu grubundaki artışın UV'siz KMKH eksozomu grubuna göre istatistiksel anlamda farklı olduğu bulunmuştur (###; $p \leq 0,001$).

VEGF-A analiz sonuçlarına göre; UV'siz AKMKH grubuna göre kıyaslama yapıldığında UV'li AKMKH grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (*; $p \leq 0,05$). UV'li ve UV'siz KMKH gruplarındaki düşüşün ise UV'siz AKMKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (**; $p \leq 0,001$). Bunların yanı sıra UV'li AKMKH grubundaki artış, UV'li KMKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (###; $p \leq 0,001$).

TGF- β sonuçlarına göre; AKMKH gruplarının KMKH gruplarına göre de yüksek seviyelerde TGF- β salgıladıkları gözlenmiştir. UV'li AKMKH ve KMKH gruplarının ise UV'siz gruplarına göre daha yüksek TGF- β salgıladıkları gözlenmiştir. UV'siz AKMKH grubuna göre kıyaslama yapıldığında, UV'li AKMKH grubundaki artış ve UV'li KMKH grubundaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$). Aynı zamanda UV'li AKMKH grubundaki artış ise UV'li KMKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (###; $p \leq 0,001$).

PDGF-BB sonuçlarına bakıldığında; UV'siz KMKH grubundan veri alınamamıştır. UV'li ve UV'siz AKMKH ve UV'li KMKH gruplarındaki sonuçlar ise yaklaşık olarak birbirine benzerdir. İstatistiksel olarak analiz yapıldığında gruplar arasında herhangi anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 4.11. UV'li ve UV'siz AKMKH ve KİMKH eksozomlarının büyüme faktörü ve sitokin analiz sonuçları. A. IL-6 analiz sonuçları, B. VEGF-A analiz sonuçları, C. TGF-β analiz sonuçları, D. PDGF-BB analiz sonuçları. UV'siz AKMKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık; *, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$), UV'siz KİMKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık; ++, $p \leq 0,01$, UV'li AKMKH ve UV'li KİMKH grubu arasındaki istatistiksel farklılık; ###; $p \leq 0,001$. IL-6 sonuçlarındaki UV'li AKMKH ve UV'siz KİMKH grubu arasındaki istatistiksel farklılık; ###; $p \leq 0,001$.

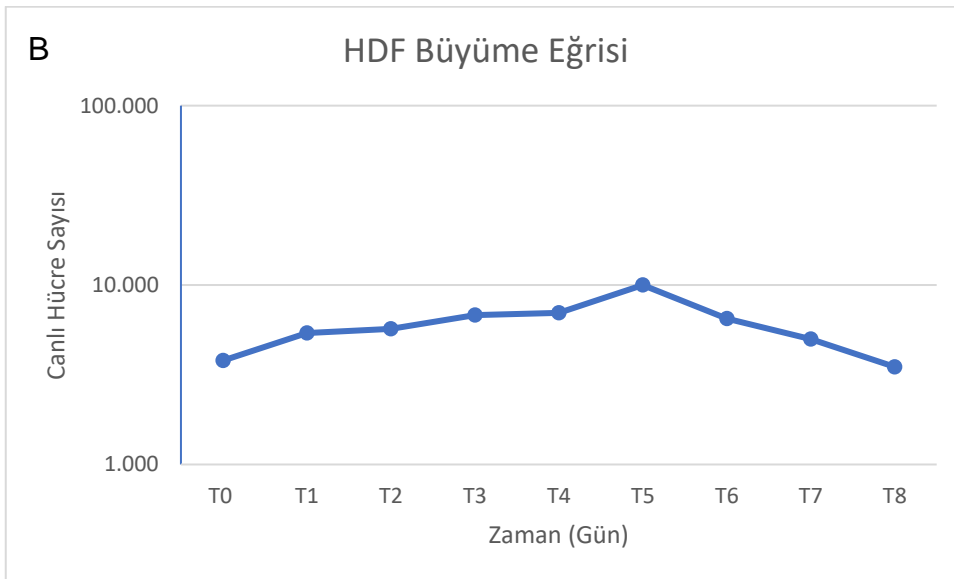
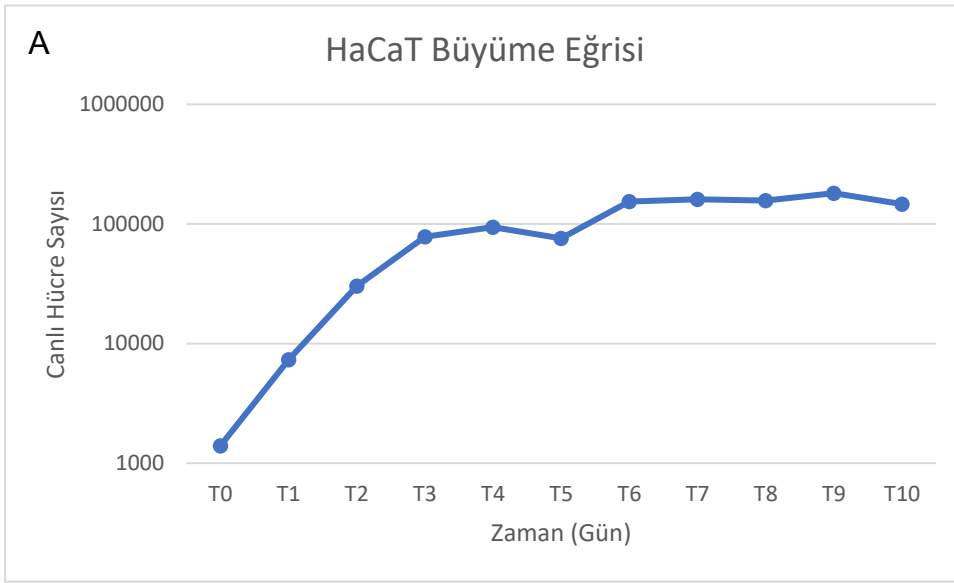
4.5. “Çizik Testi” Yöntemi ile Yara Modeli Oluşturulması, Eksozomların Uygulanması ve Yara İyileşme Potansiyelinin İncelenmesi

4.5.1. HaCaT ve HDF Hücrelerinin Büyüme Eğrilerinin Elde Edilmesi

Şekil 4.12’de verilen büyüme eğrisi grafiklerine göre HaCaT ve HDF hücrelerinin 10 gün içindeki canlı hücre sayılarındaki değişim görülmektedir. Hücrelerin sayılarını iki katına çıkarma süreleri aşağıda verilen “popülasyon ikilenme zamanı (PİZ)” formülü ile hesaplanmıştır (Formül 1). Formüle göre hesaplanan HaCaT hücrelerinin ikiye katlanma

zamanı 10,5 saat olarak, HDF hücrelerinin ikiye katlanma zamanı ise 48 saat olarak belirlenmiştir.

$$P_iZ = \frac{1}{\left[\frac{3,32 \times (\log T_1 - \log T_0)}{24} \right]} \quad (\text{Formül 1})$$

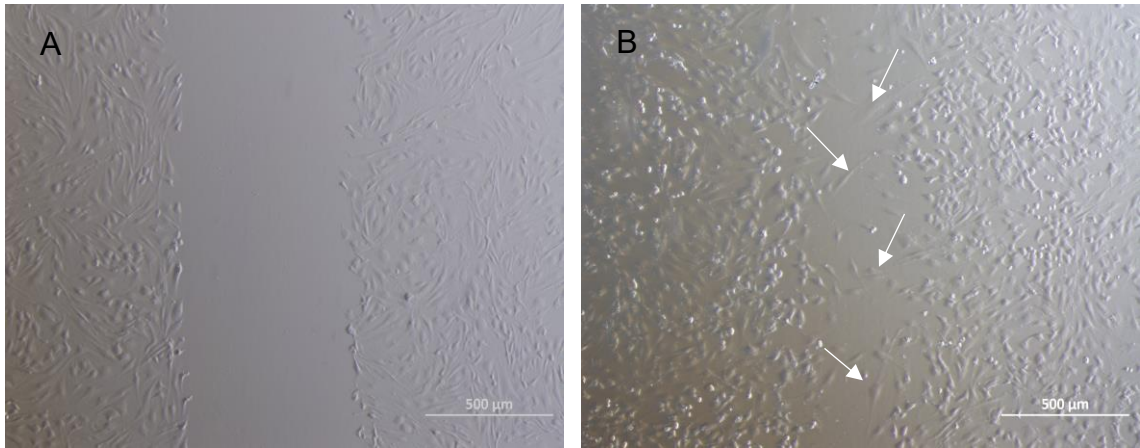


Şekil 4.12. A. HaCaT'ların büyüme eğrisi grafiği. B. HDF'lerin büyüme eğrisi grafiği.

HaCaT’larda 6. güne kadar hücre büyüme eğrisinde artış gözlenmiş ve en yüksek canlı hücre sayısının olduğu gün 6. gün olarak belirlenmiştir. 6. gün sonrası durgunluk fazına geçmiştir. HDF’ler ise 5. güne kadar artış göstermişler ve en yüksek hücre sayısına 5. günde ulaşmışlardır.

4.5.2. “Çizik Testi” Yara Modelinin Oluşturulması

HaCaT ve HDF’lerin büyüme eğrisi grafikleri oluşturulup popülasyon ikiye katlanma zamanları belirlendikten sonra, bu bilgiler doğrultusunda önce HDF’lerin daha sonra HaCaT’ların ekimi yapılarak konfluent olan 2B kültürde yara modeli oluşturulmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. HaCaT ve HDF’ler ile oluşturulan ko-kültür sonrası ‘çizik testi’ yöntemi ile oluşturulan yara görüntüleri. A. Yara oluşturulduktan hemen sonra. B. Yara oluşturulduktan sonraki 36. saatte hücrelerin göçünün gözlemlendiği görsel (Oklar, yara bölgesine göç eden hücreleri göstermektedir).

4.5.3. Yara İyileşme Potansiyelinin İncelenmesi

HaCaT ve HDF’lerin ko-kültürü ile oluşturulan yara modelinde, AKMKH ve KİMKH’lere literatürden de [62] yola çıkılarak belirlenen eksozom dozlarının (1, 5 ve 10 µg/ml) uygulaması yapılmıştır. 12, 24, 36 ve 48. saat aralıklarında hücre proliferasyonunun incelenmesi için Alamar Blue analizi, yüzde yara iyileşme miktarının

ölçülebilmesi için inverted mikroskop ile fotoğraf çekilerek Image J programında yara iyileşmesi için ölçümler gerçekleştirilmiştir.

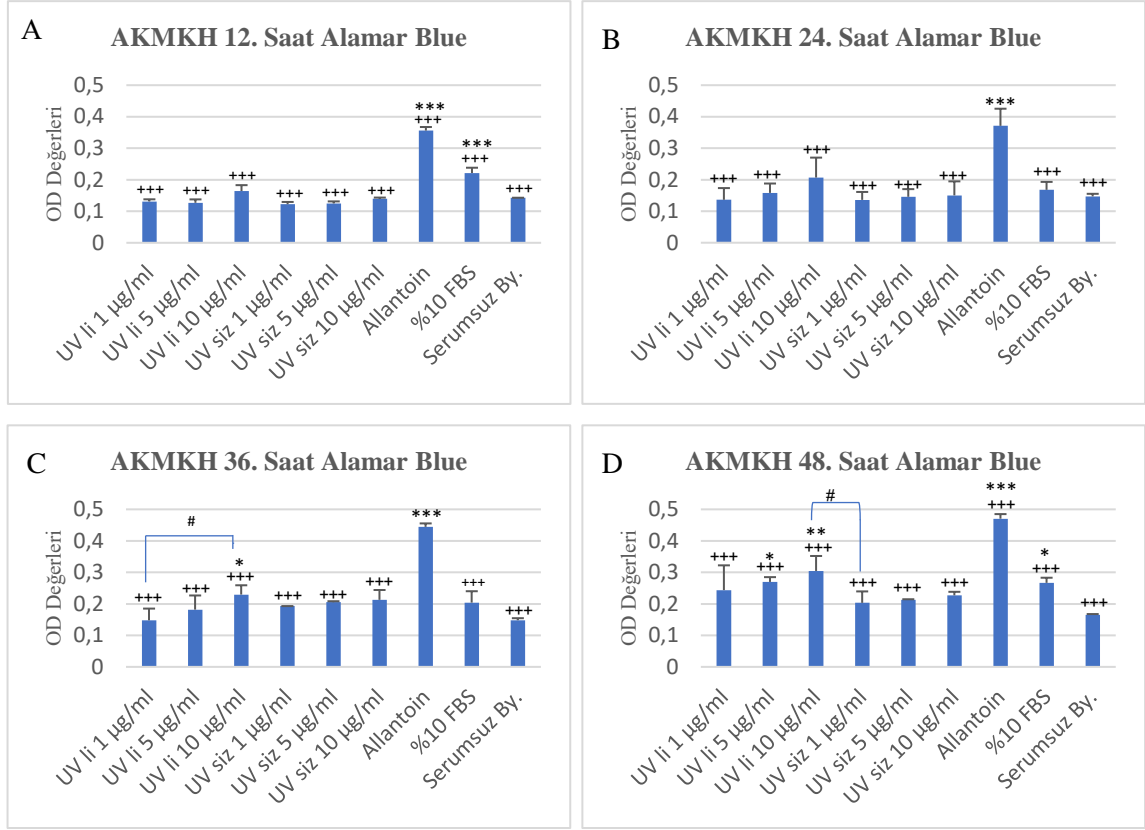
AKMKH eksozomlarının çizik yara modelinde yapılan Alamar Blue analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.14) pozitif kontrol gruplarından olan allantoinin tüm saat aralıkları için hücre proliferasyonu artışının diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (+++; $p \leq 0,001$). Bunun yanı sıra 12. ve 24. saatlerdeki UV'li 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grubundaki hücre proliferasyonu artışlarının negatif kontrol (serumsuz besiyeri) grubuna göre yüksek değer verdiği fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir.

12. saat sonuçlarına bakıldığında; negatif kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık yalnızca pozitif kontrol (allantoin ve %10 FBS) gruplarındaki hücre proliferasyonu artışında gözlenmiştir (***) $p \leq 0,001$).

24. saat sonuçlarına bakıldığında; negatif kontrol grubuna göre kıyaslama yapıldığında yalnızca allantoin grubundaki hücre proliferasyonu artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (***) $p \leq 0,001$).

36. saat sonuçlarına göre; negatif kontrol grubuna göre kıyaslama yapıldığında allantoin grubu ve eksozom gruplarından UV'li 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grubundaki hücre proliferasyonu artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda eksozom grupları arasından, UV'li 10 $\mu\text{g/ml}$ grubundaki hücre proliferasyonu artışı UV'li 1 $\mu\text{g/ml}$ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (#; $p \leq 0,05$).

48. saat sonuçlarına bakıldığında ise; negatif kontrol grubuna göre istatistiksel analiz yapıldığında, pozitif kontrol gruplarının her ikisinde de, eksozom gruplarından ise UV'li 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ gruplarındaki hücre proliferasyonu artışının anlamlı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.14. AKMKH UV'li ve UV'siz ekzozom gruplarının A. 12. saat, B. 24. saat, 36. ve 48. saat Alamar Blue sonuçlarının grafikleri. (By: Besiyeri) Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; ***, $p \leq 0,001$. Allantoin grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; +++, $p \leq 0,001$. UV'li 10 µg/ml ekzozom grubuna göre anlamlı farklılık; #, $p \leq 0,05$.

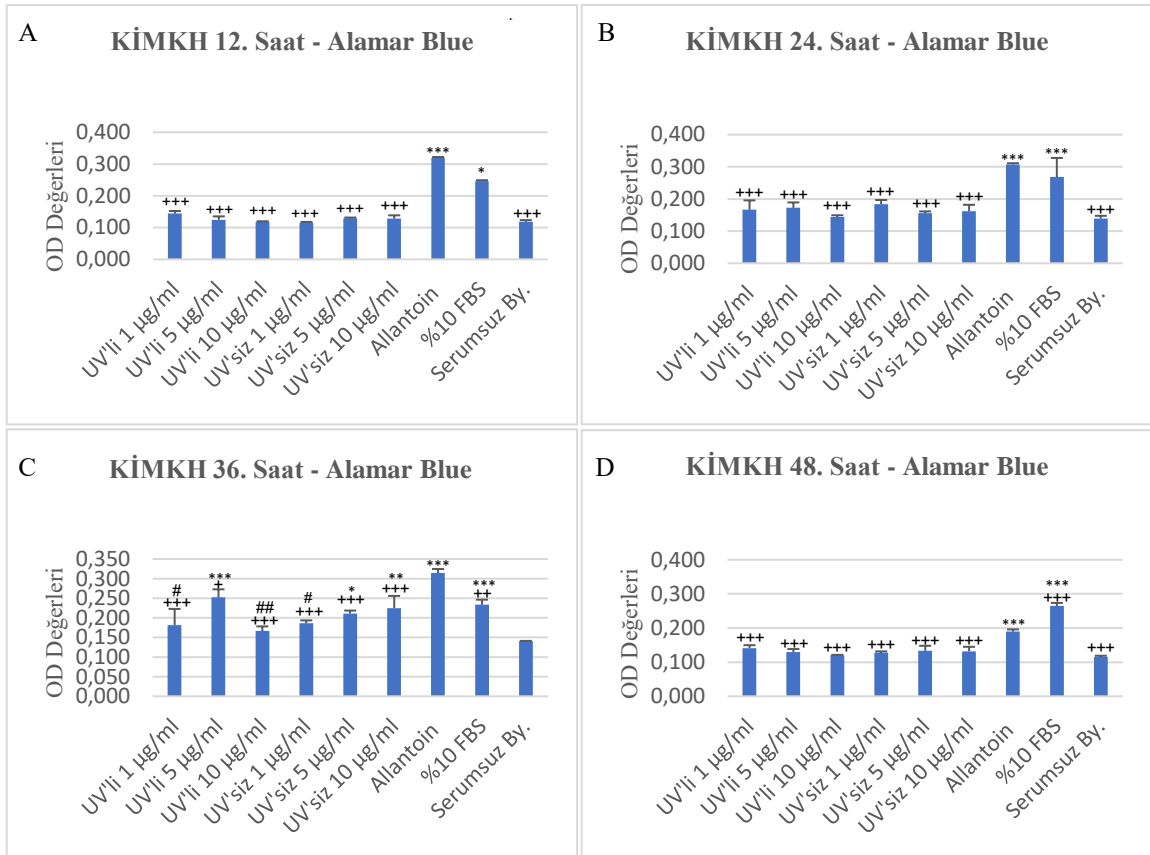
KİMKH ekzozomlarının Alamar Blue verilerine göre (Şekil 4.15); tüm saatlerdeki grafiklere göre UV'li ve UV'siz ekzozom grupları negatif kontrol (serumsuz besiyeri) grubuna göre daha yüksek hücre proliferasyonu göstermiştir. Negatif kontrol grubuna göre ekzozom gruplarında hücre proliferasyonu artışındaki istatistiksel anlamlılık yalnızca 36. saatte gözlenmiştir.

Tüm saat aralıklarında allantoin grubundaki hücre proliferasyonu artışının diğer tüm gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur (++, $p \leq 0,01$, +++, $p \leq 0,001$).

12, 24, ve 48. saatlerdeki %10 FBS grubundaki hücre proliferasyonu artışının ise tüm gruplara göre istatistiksel anlamda farklı olduğu bulunmuştur. 36. saatte ise, yalnızca

UV'li 1 ve 10 µg/ml gruplarında anlamlılık gözlenmiştir (Grafikte semboller gösterilmemiştir).

36. saat sonuçlarına bakıldığında; allantoin, %10 FBS, UV'li 5 µg/ml ve UV'siz 5 ve 10 µg/ml eksozom gruplarındaki hücre proliferasyonu artışının serumsuz besiyeri grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda UV'li 5 µg/ml eksozom dozundaki hücre proliferasyonu artışının, UV'li 1 ve 10 µg/ml ile UV'siz 1 µg/ml eksozom gruplarına göre anlamlı olduğu gözlenmiştir (#; $p \leq 0,05$, ##; $p \leq 0,01$).



Şekil 4.15. KİMKH UV'li ve UV'siz eksozom gruplarının A. 12. saat, B. 24. saat, 36. ve 48. saat Alamar Blue sonuçlarının grafikleri. (By: Besiyeri) Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; *, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$. Allantoin grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; ++, $p \leq 0,01$, +++, $p \leq 0,001$. UV'li 5 µg/ml eksozom grubuna göre istatistiksel anlamda farklılık; #, $p \leq 0,05$, ##, $p \leq 0,01$.

AKMKH eksozomlarının yüzde yara iyileşme grafiklerine göre elde edilen sonuçlarının (Şekil 4.16) Alamar Blue sonuçlarını destekler nitelikte olduğu gözlenmiştir.

12, 24, 36 ve 48. saatlerdeki tüm gruplardaki yara kapanma miktarındaki artışın negatif kontrol (serumsuz besiyeri) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (**; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$), (Grafikte semboller gösterilmemiştir).

Tüm saat aralıklarında, UV'li 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grubundaki yara kapanma miktarı allantoin grubundaki yara kapanma miktarına oldukça yakındır.

12. saat sonuçlarına bakıldığında; allantoin grubundaki yara kapanma miktarındaki artış, eksozom gruplarından UV'li 10 $\mu\text{g/ml}$ grubu dışındaki gruplara göre istatistiksel olarak anlamlıdır (++; $p \leq 0,01$, +++; $p \leq 0,001$). %10 FBS grubundaki yara kapanma miktarındaki artış ise, eksozom gruplarından UV'li 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grupları dışındakilere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (#; $p \leq 0,05$, ##; $p \leq 0,01$, ###; $p \leq 0,001$).

UV'li 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom gruplarındaki yara kapanma miktarı artışının tüm eksozom gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı oldukları gözlenmiştir (*; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$), (Grafikte semboller gösterilmemiştir).

24. saat sonuçlarına göre; allantoin grubundaki yara kapanma miktarındaki artış ise, eksozom gruplarından UV'li 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grupları dışındaki gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (+; $p \leq 0,05$, +++; $p \leq 0,001$). %10 FBS grubundaki yara kapanma miktarındaki artış ise, UV'siz eksozom gruplarının tümüne göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (###; $p \leq 0,001$).

UV'li 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom gruplarındaki yara kapanma miktarı artışı, tüm UV'siz eksozom gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$), (Grafikte semboller gösterilmemiştir).

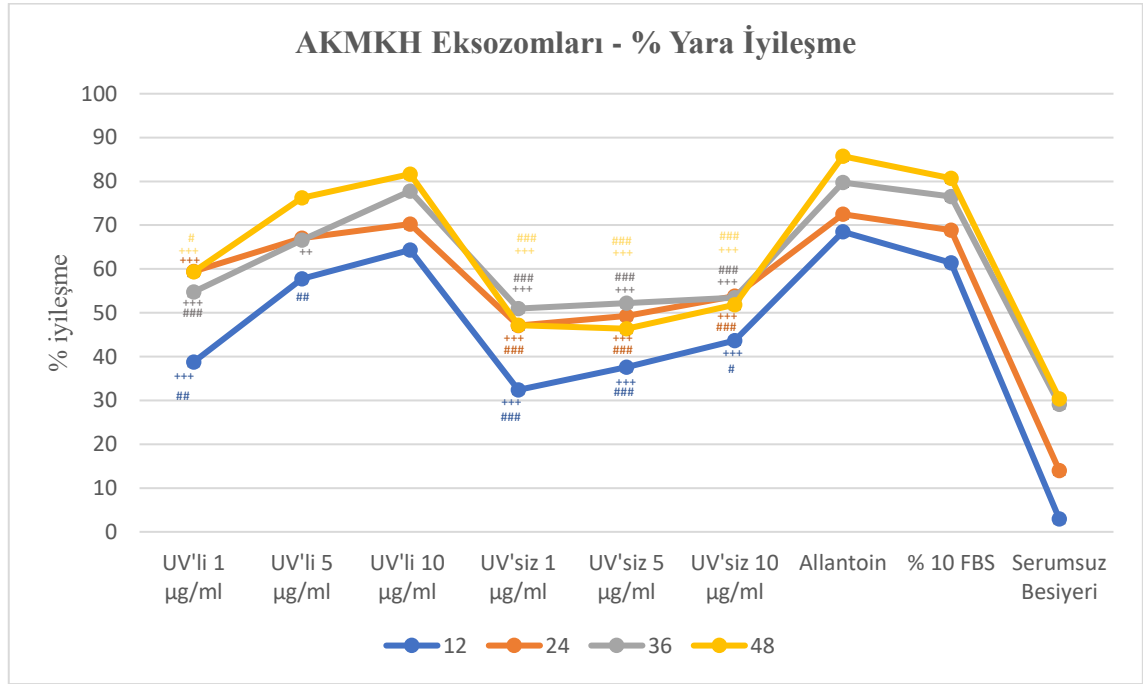
36. saat sonuçlarına bakıldığında; allantoin miktarındaki artışın, UV'li 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grubu dışındaki tüm eksozom gruplarından istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. %10 FBS grubundaki artışın ise UV'li 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ dışındaki tüm eksozom gruplarından istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (++; ##; $p \leq 0,01$, +++; ###; $p \leq 0,001$).

UV'li 10 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grubundaki yara kapanma miktarı artışının UV'li 5 $\mu\text{g/ml}$ eksozom grubu dışındaki gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlenmiştir.

UV'li 5 µg/ml eksozom grubundaki yara kapanma miktarı artışının ise UV'li 1 µg/ml eksozom grubu dışındaki gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlenmiştir (*; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$), (Grafikte semboller gösterilmemiştir).

48. saatteki sonuçlara göre; allantoin ve %10 FBS gruplarının yara kapanma miktarlarındaki artışın, UV' li 5 ve 10 µg/ml eksozom grubu dışındaki tüm eksozom gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (+, #; $p \leq 0,05$, +++, ###; $p \leq 0,001$).

UV'li 5 ve 10 µg/ml eksozom gruplarındaki yara kapanma miktarı artışının tüm eksozom gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı oldukları gözlenmiştir (*; $p \leq 0,05$, ***; $p \leq 0,001$), (Grafikte semboller gösterilmemiştir).



Şekil 4.16. AKMKH eksozomlarının “çizik testi” yara modelinde 12., 24., 36. ve 48. saatlerdeki yüzde yara iyileşme grafiği. Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$. Allantoin grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; ++; $p \leq 0,01$, +++; $p \leq 0,001$. %10 FBS grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; #; $p \leq 0,05$, ##; $p \leq 0,01$, ###; $p \leq 0,001$.

Aynı şekilde KİMKH eksozomlarının yüzde yara iyileşme sonuçları (Şekil 4.17) Alamar Blue testinden elde edilen verileri destekler niteliktedir. AKMKH eksozom sonuçlarından farklı olarak KİMKH'lerde UV'li 5 µg/ml eksozom dozundaki yara iyileşme miktarı diğer eksozom dozlarına göre anlamlı biçimde daha yüksek bulunmuştur.

İstatistiksel açıdan 12, 24, 36 ve 48. saatlerdeki tüm gruplardaki yara kapanma yüzdesindeki artışın negatif kontrol grubuna (serumsuz besiyeri) göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (***, $p \leq 0,001$), (Grafikte semboller gösterilmemiştir).

Yara iyileşme yüzdelere bakıldığında tüm saat aralıklarında allantoin ve %10 FBS gruplarındaki yara kapanma artışının diğer gruplardan daha fazla olduğu gözlenmiştir. Eksozom gruplarındaki yüzde yara iyileşmelerine bakıldığında ise, tüm saat aralıklarında UV'li 5 µg/ml eksozom dozundaki artışın diğer eksozom gruplarından daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

12. saatteki allantoin grubunda gözlenen artışın, diğer gruplara göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (+; $p \leq 0,05$, +++; $p \leq 0,001$). %10 FBS grubundaki yara kapanma miktarındaki artışın ise, UV'siz 5 ve 10 µg/ml dışındaki tüm eksozom gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlenmiştir (#; $p \leq 0,05$, ##; $p \leq 0,01$, ###; $p \leq 0,001$).

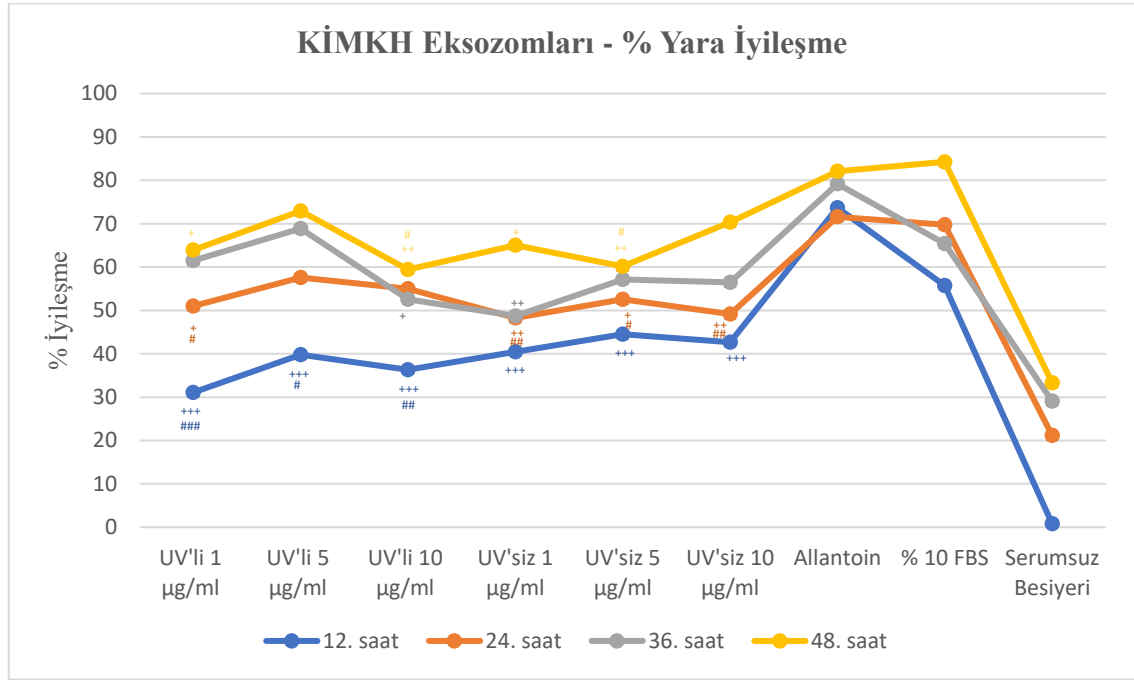
UV'siz 5 µg/ml eksozom grubundaki artışın, UV'li 1 µg/ml eksozom grubuna göre anlamlı olduğu gözlenmiştir (*; $p \leq 0,05$), (Grafikte semboller gösterilmemiştir).

24. saat sonuçlarına bakıldığında; pozitif kontrol gruplarından olan allantoin grubundaki yara kapanma artışının, eksozom dozlarından UV'li 5 µg/ml dışındaki gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (+; $p \leq 0,05$, ++; $p \leq 0,01$, +++; $p \leq 0,001$). %10 FBS grubundaki artışın ise, UV'li 1 µg/ml ve UV'siz eksozom gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (#; $p \leq 0,05$, ##; $p \leq 0,01$, ###; $p \leq 0,001$).

36. saat sonuçlarına göre; allantoin grubundaki yara kapanma miktarı artışının, istatistiksel olarak UV'li 10 ve UV'siz 1 µg/ml eksozom gruplarına göre anlamlı olduğu gözlenmiştir (+; $p \leq 0,05$, +++; $p \leq 0,001$). %10 FBS grubuna göre artışın ise, eksozom gruplarından yalnızca UV'siz 1 µg/ml grubuna göre anlamlı olduğu gözlenmiştir (#; $p \leq 0,05$).

UV'li 5 µg/ml eksozom grubundaki istatistiksel olarak anlamlı artışın, UV'li 10 µg/ml ile UV'siz 1 µg/ml eksozom gruplarına göre olduğu gözlenmiştir (*; $p \leq 0,05$, ***, $p \leq 0,001$), (Grafikte semboller gösterilmemiştir).

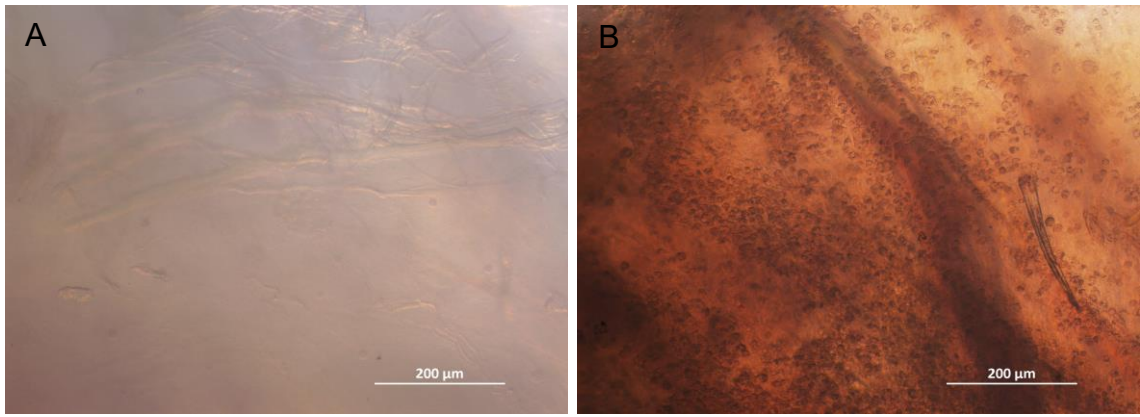
48. saat verilerine göre ise; allantoin grubundaki yara kapanma miktarındaki artış, UV'li 1 ve 10 µg/ml ile UV'siz 1 ve 5 µg/ml eksozom gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (++; $p \leq 0,01$, +++; $p \leq 0,001$). %10 FBS grubundaki yara kapanma artışının, UV'li 1 ve 10 µg/ml, UV'siz 1 ve 5 µg/ml eksozom dozlarına göre anlamlı olduğu gözlenmiştir (#; $p \leq 0,05$, ##; $p \leq 0,01$).



Şekil 4.17. KİMKH eksozomlarının “çizik testi” yara modelinde 12., 24., 36. ve 48. saatlerdeki yüzde yara iyileşme grafiği. Negatif kontrol grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; ***, $p \leq 0,001$ (Grafikte istatistiksel semboller gösterilmemiştir). Allantoin grubu ile istatistiksel anlamda farklılık; +; $p \leq 0,05$, ++; $p \leq 0,01$, +++; $p \leq 0,001$. UV'li 5 µg/ml-UV'li 10 µg/ml, UV'li 5 µg/ml-UV'siz 1 µg/ml grupları arasındaki istatistiksel anlamda farklılık; *, $p \leq 0,05$, ***, $p \leq 0,001$ (Grafikte istatistiksel semboller gösterilmemiştir).

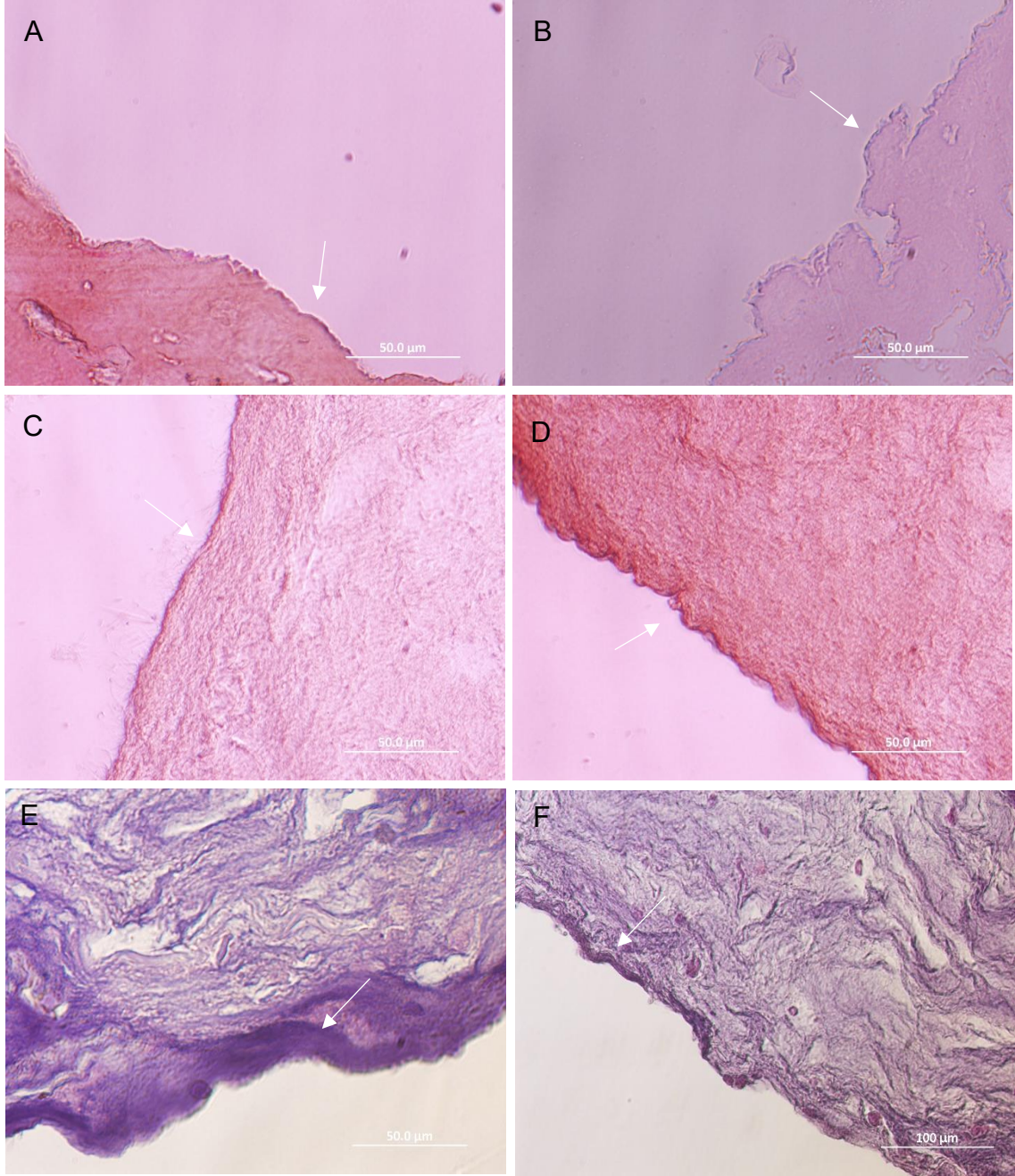
4.6. 3B Deri Modelinin Oluşturulması, Eksozom Uygulaması ve Histolojik Analiz Sonuçları

3B deri modelinin oluşturulma aşamalarından Şekil 4.18’de gösterilen A görseli; birinci katman olan hücresiz kollajen tabakasını göstermektedir. B görseli ise; ikinci katman olan, HDF ile kollajenin birlikte oluşturulduğu tabakanın 21. gün mikroskop görüntüsünü göstermektedir.



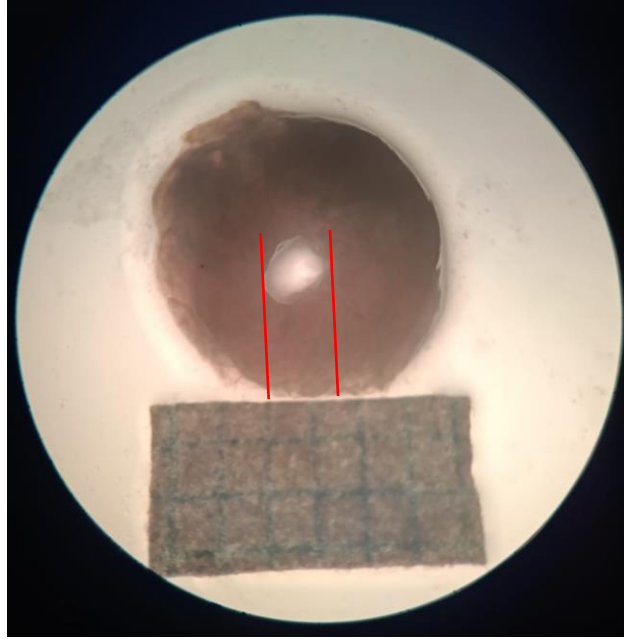
Şekil 4.18. Oluşturulan deri modeli katmanlarının mikroskop görüntüleri. A: Deri modelinin aselüler tabakası (1. katman) B: Deri modelinin HDF ile kültürlenmiş tabakası (2. katman)

3B deri modeli oluşumunun 7., 14. ve 21. günlerindeki histolojik analizler sonrasında alınan görüntülerde deri modelinin oluştuğu gözlenmiştir. Şekil 4.18’de A ve B’ de ok ile gösterilen kısımlarda tabakalaşma çok ince bir şekilde görülmektedir. Bu tabakalaşma 14. gün görsellerinde (C ve D) 7. güne göre daha belirgin şekildedir. E’de gözlenen tabakalaşmanın ise hem fibroblastlar tarafından oluşturulan dermis hem de keratinositler tarafından oluşturulan epidermis modeli sergilediği görülmektedir. Şekil 4.19’da F görselinde ise kollajen jel içerisine gömülü fibroblastlar oklar ile gösterilmiştir.

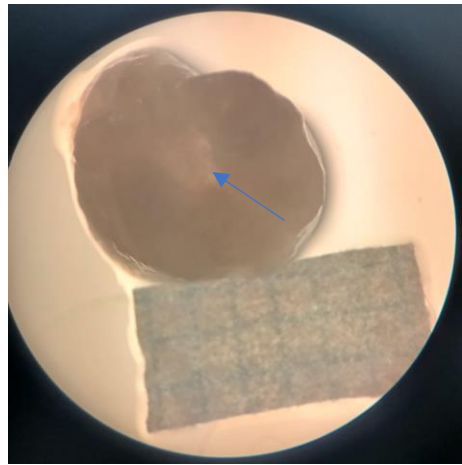
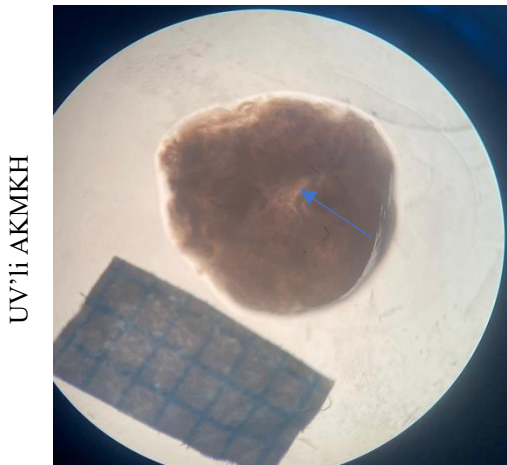
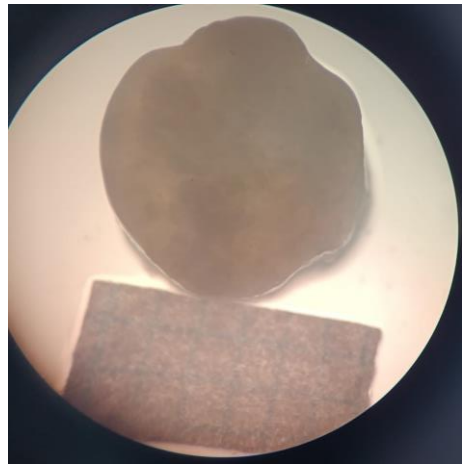
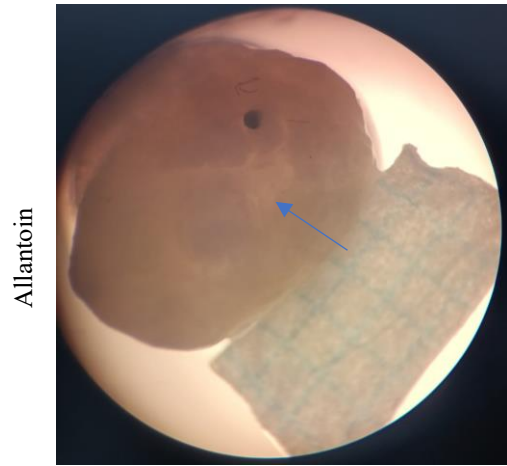
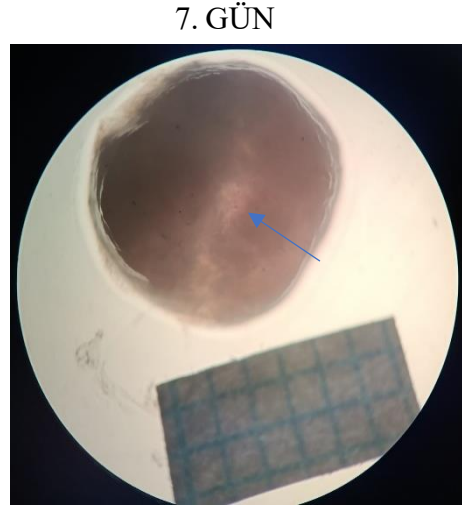
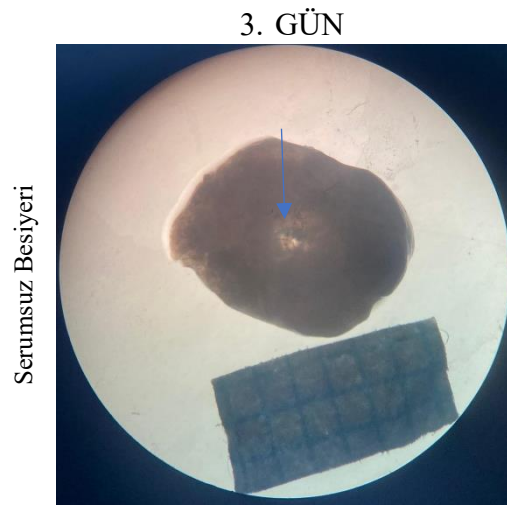


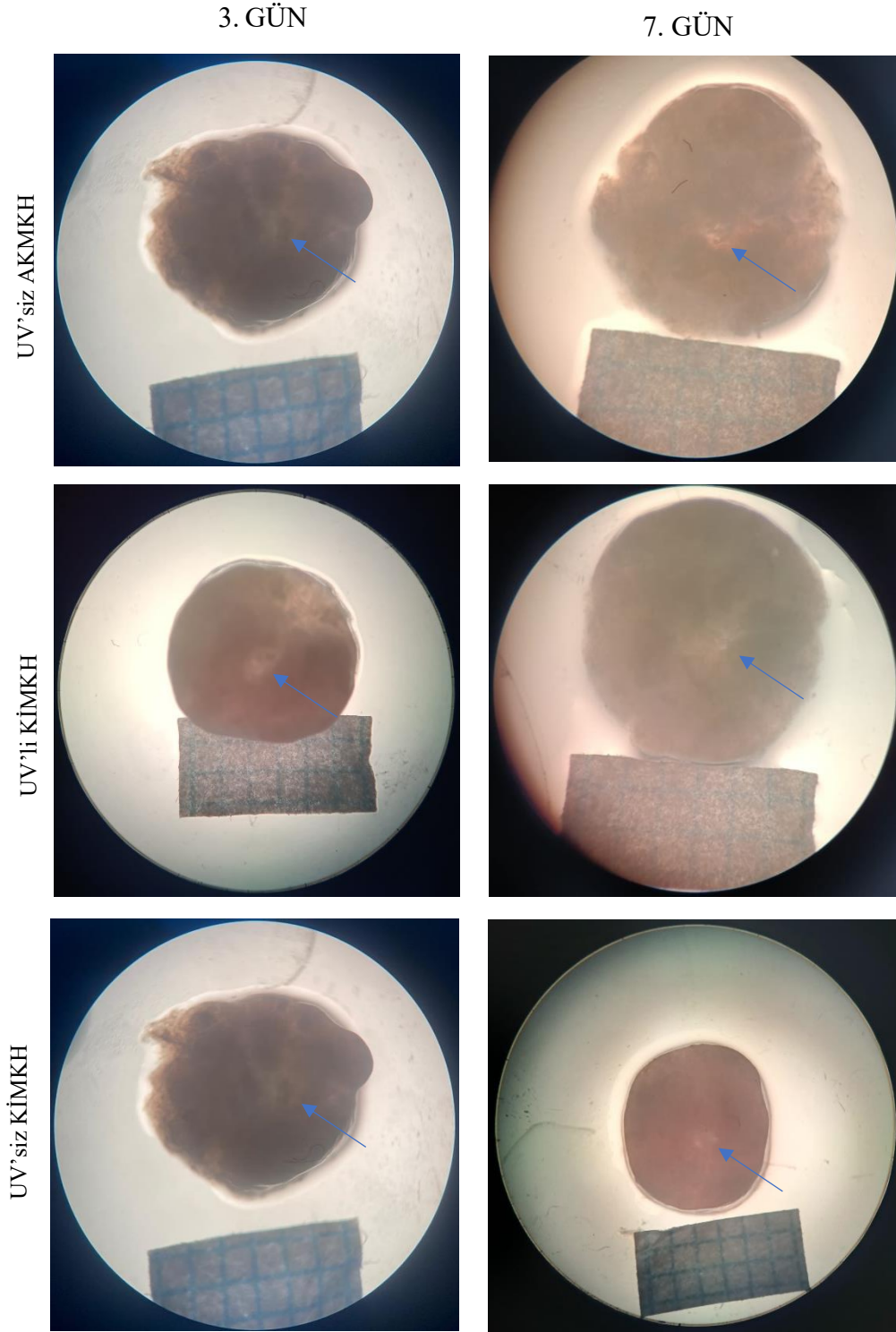
Şekil 4.19. Oluşturulan üç boyutlu deri modelinin H&E boyama yapılmış mikroskop görüntüleri. A, B: Modelin 7. gün alınan kesitlerinin boyama görüntüleri. C, D: Modelin 14. gün alınan kesitlerinin boyama görüntüleri. E, F: Modelin 21. gün alınan kesitlerinin boyama görüntüleri (Okklar oluşan katmanları göstermektedir).

Deri modellerine 21. günde yara oluşturulmuş, eksozom uygulamaları yapılarak 3. ve 7. günlerde dokular fikse edilmiş ve yara iyileşmesinin takibi için histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Dokular fikse edilmeden önce stereo mikroskopta incelemeler yapılmıştır. Stereo mikroskop görüntüleri Şekil 4.21’de verilmiştir. Yara oluşturulduktan hemen sonra çekilmiş yara görüntüsünün Şekil 4.20’de 1-2 mm arasında olduğu görülmektedir.



Şekil 4.20. Yara oluşturulduktan hemen sonra çekilmiş stereo mikroskop görüntüsü (Ölçek kağıdındaki her bir kare 1 mm’dir).

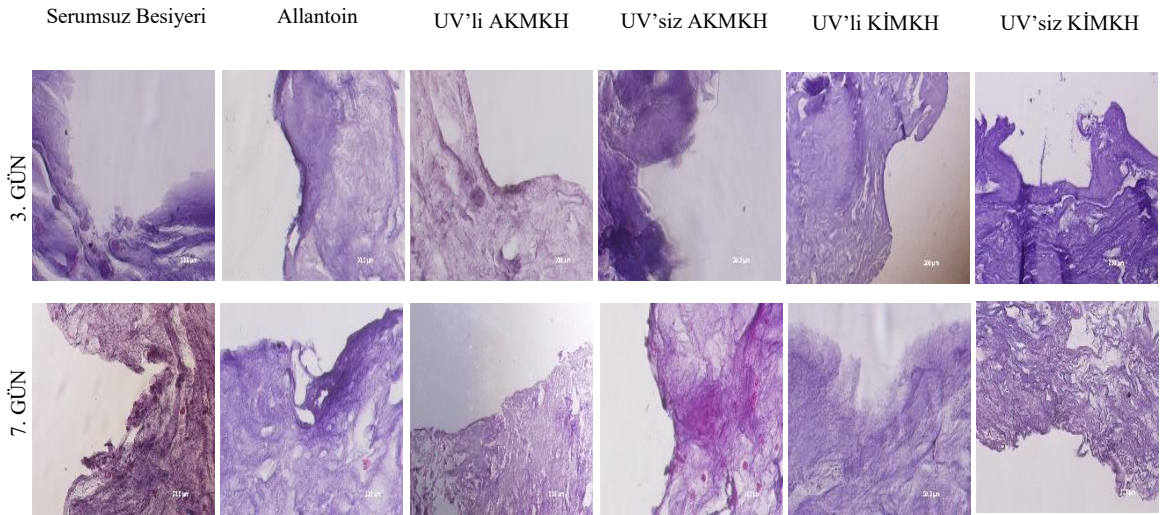




Şekil 4.21. 3. ve 7. günlerdeki 3B yara gruplarının stereo mikroskop görüntüleri. Oklar yara açıklıklarının olduğu bölgeleri göstermektedir. (Ölçek kağıdındaki her bir kare 1 mm'dir).

Stereo mikroskop görüntülerine bakıldığında; tüm gruplar için 3. günlerdeki yara açıklıkları 7. gün yara açıklıklarına göre daha fazladır. Serumsuz besiyeri grubunda 7. gündeki yara açıklığının diğer gruplara göre daha fazla olduğu Şekil 4.21-A2’de görülmektedir. Allantoin grubunda ise 7. günde yara tamamen kapanmıştır (Şekil 4.21-F2). 3. ve 7. günlerde çekilen fotoğraflara göre, UV’li AKMKH grubunda yara kapanma oranının UV’siz AKMKH grubuna göre daha fazla olduğu Şekil 4.21-B ve C’de görülmektedir. Aynı şekilde UV’li KİMKH grubundaki yara kapanma oranının da UV’siz KİMKH grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.21-D ve E).

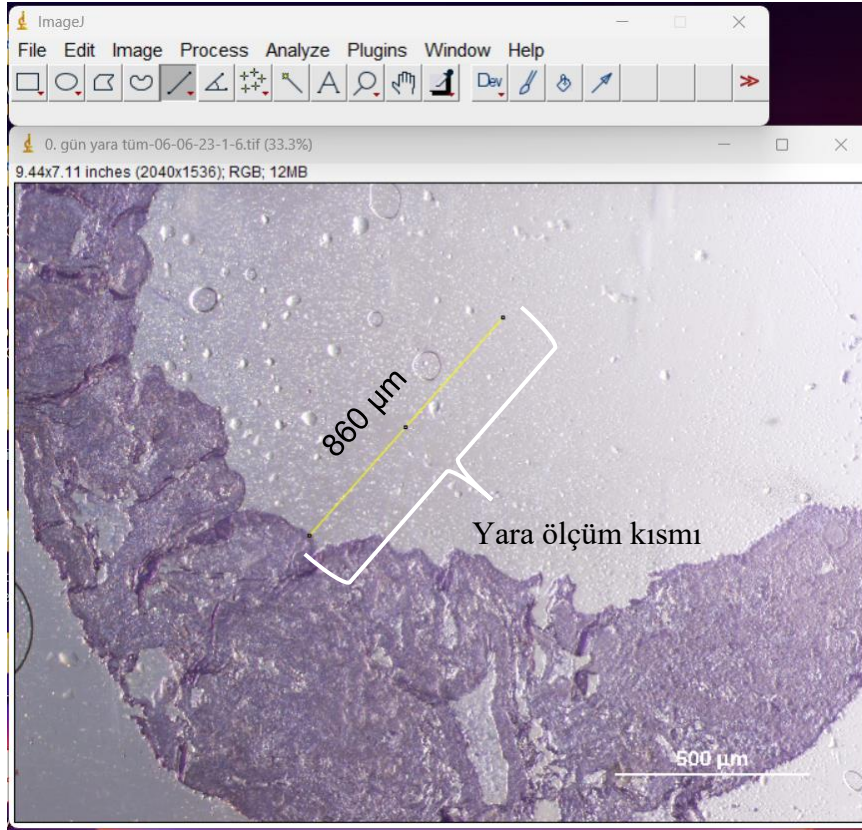
Yara modellerinin stereo mikroskop fotoğrafları çekildikten sonra fikse edilerek H&E boyamaları gerçekleştirilmiştir. Yara modellerinin H&E boyama kesitlerinden çekilen fotoğraflar Şekil 4.22’de verilmiştir. H&E boyama görüntülerindeki yara açıklıkları, stereo mikroskop görüntülerinde olduğu gibi birbirlerini desteklemektedir.



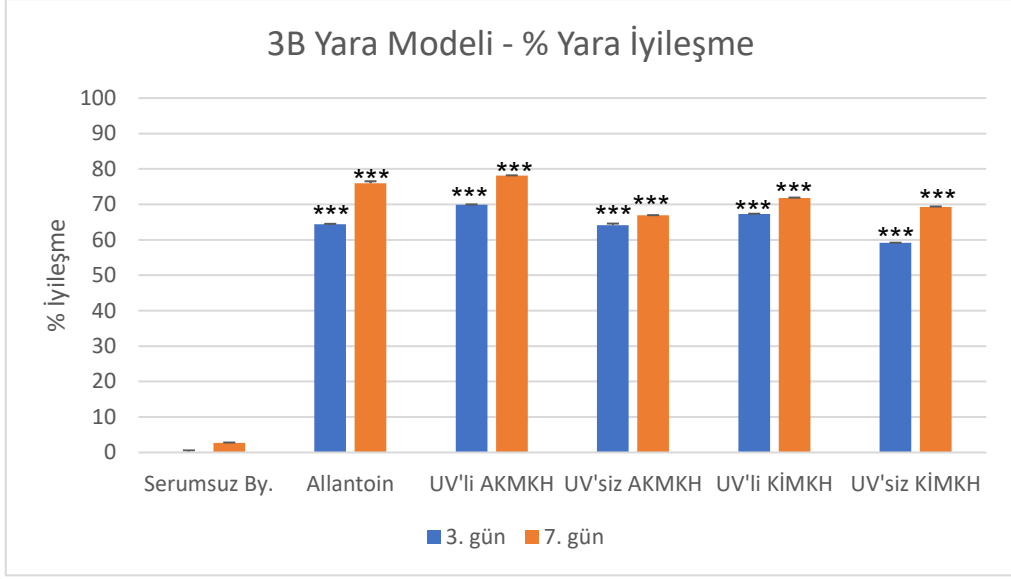
Şekil 4.22. Yara gruplarının 3. ve 7. günlerdeki H&E boyama görüntüleri. 3. gün ölçekleri sırasıyla; 50 µm, 50 µm, 100 µm, 50 µm, 500 µm, 200 µm’dir. 7. gün ölçekleri sırasıyla; 50 µm, 100 µm, 500 µm, 100 µm, 50 µm, 100 µm’dir.

Yara açıklıklarından nicel veriler elde edilebilmesi için her grup için 3 farklı kesitten elde edilen fotoğraflardan, Şekil 4.23’te de gösterildiği gibi, Image J programında ölçümler alınmıştır. Yara ölçümleri, yara açıklığı tam bir yuvarlak biçiminde olduğundan yara yarıçapı ölçülmüştür. Ölçülen kısım yaranın iyileşmeyen bölgesinin yarıçapı olmuştur. 0. gün yara bölgesinin yarıçapı kontrol grubu gibi düşünülerek tüm gruplardaki yara

kapanma miktarı hesaplanmıştır ve Şekil 4.24'teki grafik elde edilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi serumsuz besiyeri grubunda yara iyileşmesi neredeyse hiç gerçekleşmemiştir. En fazla yara iyileşmesinin görüldüğü grup 3. ve 7. günlerde UV'li AKMKH grubu olmuştur. İstatistiksel anlamda kıyaslama yapıldığında ise tüm gruplardaki yara kapanma miktarı artışının negatif kontrol grubu olan serumsuz besiyerine göre anlamlı olduğu gözlenmiştir (***, $p \leq 0,001$).



Şekil 4.23. Yara oluşturulduktan hemen sonra fikse edilen ve H&E boyaması yapılan dokudan Image J programı ile yara ölçümünün örnek gösterimi. (Büyütme: 4X)



Şekil 4.24. 3B yara modellerinin yüzde yara iyileşme sonuçlarını gösteren grafik. Negatif kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklılık; ***, $p \leq 0,001$.

5. TARTIŞMA

Deride farklı sebepler ile oluşarak iyileşmeyen yaralar, tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur ve iyileşme süreçlerinin zor olması sebebi ile tedavileri uzun ve ciddi maliyetler gerektiren sağlık problemidir. Son yıllarda dünya çapında akut ve kronik deri yaralarından muzdarip bir milyardan fazla insan olduğu bildirilmiştir [63, 64]. Bu sebeplerle rejeneratif tıpta da olduğu gibi “deri yara iyileşme” çalışmaları günümüzde gittikçe artmaktadır. Deri yara iyileşmesi, birçok farklı hücrenin ve bu hücrelerden salınan büyüme faktörü, sitokin ve ekstraselüler veziküller gibi birçok etkenin rol oynadığı karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Yara iyileşmesi çalışmalarında, sahip oldukları özellikler sebebiyle MKH’ler sıklıkla kullanılmaktadır. MKH’lerin salgıladıkları birçok sitokin ve büyüme faktörleri dışında ekstraselüler veziküller ile de yara iyileşme süreçlerini önemli derecede destekledikleri bilinmektedir [65]. Yapılan çalışmalarda MKH’lerin etkilerini özellikle salgıladıkları eksozomlar aracılığıyla gerçekleştirdiğine dair kanıtlar bulunmuştur [5, 6, 54]. MKH’lerin, kendi mikroçevreleri tarafından regüle edilebildiği çalışmalarla gösterilmiştir. Kim ve ark. tarafından yapılan çalışmada UV ışığına maruz kalmış MKH’lerin, deriyi UV hasarına karşı korumak için kollajen seviyelerini arttırarak dermis kalınlaşmasını sağladıkları gösterilmiştir [9]. Bir başka çalışmada ise düşük doz UV’ye maruz bırakılan MKH’lerin salgıladıkları IL-8 oranlarının arttığı gösterilmiştir [38]. Literatür incelendiğinde UV ile indüklenen MKH eksozomlarının potansiyellerinde meydana gelen değişimlerin ve aynı zamanda bu eksozomların yara iyileşmesindeki etkilerine dair yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında tez çalışması kapsamında UV-B ile indüklenen MKH’lerden elde edilen eksozomların potansiyelleri incelenerek, 2B ve 3B in vitro yara iyileşme modellerindeki etkisi araştırılmıştır.

Tez çalışması kapsamında MKH’lerden AKMKH ve KİMKH’leri tercih edilmiştir. Bu kök hücrelerden eksozom izolasyonları yapılmadan önce uygun UV-B ışık dozuna karar verilmiştir. Karar verilen doz ile indüklenen hücrelerden eksozom izolasyonları yapılarak eksozomların karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Perez ve ark. yaptığı çalışmada, MKH’ler UV-B’nin 25 ve 100 mJ/cm² dozları ile indüklenmiş ve hücre potansiyelleri incelenmiştir. 100 mJ/cm² indüklenme dozunda MKH’lerin hücre hızlarında ve farklılaşma kapasitelerinde azalma, aynı zamanda apoptotik hücre sayısında artış gözlenmiştir. 25 mJ/cm² doz ile indüklenmeleri sonucunda ise hücre potansiyellerinin olumsuz etkilenmediği gösterilmiştir [11]. Laboratuvarımızda daha önceden yapılan bir

bir çalışmada, AKMKH'ler 100 mJ/cm² UV-A ile indüklendikten sonra hücrelerin kendisi ve süpernatantlarının yara iyileşmesi üzerindeki etkisi incelenmiş ve UV'siz AKMKH'lere göre yara kapanmasına etkisinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir [66]. Bu tez çalışması kapsamında da, AKMKH ve KİMKH'ler artan dozlarda (10, 25, 50, 100 ve 200 mJ/cm²) UV-B ışığı ile indüklenerek toksik olmayan dozu belirlemek üzere hücre canlılığı ve apoptotik/nekrotik hücre sayısı analizleri yapılmıştır (**Şekil 4.3-4, Şekil 4.5-6**). Hücre canlılığı analizleri sonucunda, AKMKH ve KİMKH'lerde en yüksek hücre canlılığı gösteren doz 25 mJ/cm² olmuştur. Apoptotik ikili hücre boyama analiz sonuçlarına göre ise, nekrotik hücre sayısının en az olduğu dozun 25 mJ/cm² olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple en uygun dozun 25 mJ/cm² olduğuna karar verilmiştir.

Eksozomların, yüzey belirteçlerinden olan tetraspanin moleküllerini (CD81, CD63, CD9, CD82) ifade ettikleri ve karakterizasyonları için kullanılabilceği birçok çalışma tarafından belirtilmektedir [44, 67, 68]. Bu tez çalışması kapsamında, UV'li ve UV'siz AKMKH ve KİMKH eksozomlarının akış sitometri karakterizasyon analiz sonuçlarına göre tüm gruplar için en az %91,93 oranla CD9 ve CD81 moleküllerini eksprese ettikleri gözlenmiştir (**Şekil 4.7**).

Hoang ve ark. sundukları makalede adipoz doku, kemik iliği ve göbek kordonu kökenli MKH'lerinden elde ettikleri eksozomların TEM analiz görüntülerine göre eksozomların yuvarlak ve yaklaşık 200 nm boyutlarında olduğunu ifade etmişlerdir [62]. Sunulan farklı bir çalışmada, sıçan MKH'lerinden elde edilen eksozomların, TEM analiz sonuçlarına göre 40-300 nm aralığında olduğu belirtilmiştir [69]. Yaptığımız bu çalışmada da literatürü destekler nitelikte, UV'li AKMKH eksozomlarının yaklaşık 100-300 nm arasında, UV'siz AKMKH eksozomlarının yaklaşık 50-300 nm arasında, UV'li KİMKH eksozomlarının 50-100 nm arasında ve UV'siz KİMKH eksozomlarının ise yaklaşık 100-200 nm arasında olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak UV'lenmiş ve UV'lenmemiş MKH eksozomlarının yaklaşık 50-300 nm aralığında oldukları ve tipik yuvarlak bir morfoloji sergiledikleri gözlemlenmiştir. Gruplar arasında boyut açısından en büyük boyuta sahip olan grubun UV'li AKMKH, en küçük boyuta sahip grubun ise UV'li KİMKH'ler olduğu görülmüştür (**Şekil 4.9**).

Bir çalışmaya göre; eksozom karakterizasyonunda, TEM analizi için eksozom hazırlığı aşamasında örnekler cihaza kurutulularak yerleştirildiğinden boyutlarında küçülme yaşanabileceği ve yaklaşık 40-150 nm boyutlar gözleneceği ifade edilirken, DIS ve NİA analizlerinde ise kurutma yapılmadan analiz edileceğinden boyutların 100-200 nm

aralığında olacağı söylenmektedir [70]. Dehnavi ve ark. yaptığı çalışmada, MKH'lerden elde edilen eksozomların DIS sonuçlarına göre boyut aralıklarının 100-150 nm arasında olduğunu göstermişlerdir [71]. Shamili ve ark. yaptığı çalışmada yine MKH'lerden elde edilen eksozomların DIS analiz sonuçlarına göre yaklaşık 100 nm oldukları belirtilmiştir [72]. Bu tez çalışmasında da yapılan DIS analiz sonuçlarına göre UV'siz AKMKH'lerin 305.2 nm, UV'li AKMKH'lerin 204.8 nm, UV'siz KİMKH'lerin 58.77 nm ve UV'li KİMKH'lerin 205.5 nm boyutlara sahip olduğu görülmüştür (**Şekil 4.8**). DIS analizi sonuçlarında, literatürdeki sonuçlara göre gözlenen daha büyük boyuttaki ölçümlerin, eksozomların süspansiyon içerisinde agregre oldukları ve daha büyük boyutta sonuçlar aldığımızı düşündürmüştür.

NİA, çözelti içerisindeki 10-1000 nm arası nanopartiküllerin, lazer ışığı yardımıyla çözeltideki brownian (sıvı içerisindeki serbest hareket) hareketlerine göre çap dağılımı ve boyut analizini gerçekleştiren bir analiz yöntemidir [73]. Yapılan bir çalışmada AKMKH eksozomlarının NİA karakterizasyon analizine göre eksozom boyutlarının %94.7'sinin 200 nm'nin altında olduğu bulunmuştur [52]. Bu tez çalışmasındaki NİA parçacık boyutu analiz sonuçlarına göre ise UV'lenmiş ve UV'lenmemiş AKMKH eksozom boyutlarının sırasıyla 101,5 ve 150.7 nm olduğu görülmüştür. KİMKH eksozom boyutları ise sırasıyla 132,3 ve 147,4 nm olarak bulunmuştur (**Şekil 4.10**). Gözlenen sonuçlar literatürde verilen boyut aralıklarıyla benzerlik göstermiştir.

Yara iyileşmesi süreçlerinde IL-6, IL-1, TGF- β , VEGF, FGF, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörü ve sitokinlerin rol aldığı ve kritik etkilere sahip oldukları çalışmalarda belirtilmektedir [74-76]. Bir çalışmada MKH eksozomlarının çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinleri içerdikleri ifade edilmektedir [54]. Hoang ve ark. yaptığı çalışmada, AKMKH, KİMKH ve göbek kordonu MKH (GKMKH)'lerden elde edilen eksozomlardaki çeşitli büyüme faktörü ve sitokinlerin analizini yapılmıştır. Elde ettikleri sonuca göre tüm kaynaklardan elde ettikleri eksozomlarda VEGF-A ve PDGF'yi tespit etmişlerdir. TGF- β 'yi AKMKH ve KİMKH eksozomlarında belirleyememiş yalnızca GKMKH eksozomlarında tespit etmişlerdir [62]. Yapılan bu tez çalışmasında UV'li ve UV'siz MKH eksozomlarındaki IL-6, TGF- β , VEGF-A ve PDGF-BB miktarları karşılaştırılmıştır. UV-B ile indüklenmiş AKMKH ve KİMKH'lerden elde edilen eksozomların IL-6, TGF- β ve VEGF-A sonuçlarına göre UV'li grupların UV'sizlere göre daha yüksek seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda AKMKH eksozomlarındaki

sitokin ve büyüme faktörü seviyelerinin KİMKH eksozomlarına göre daha yüksek seviyelerde olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.11**).

Theerakittayakorn ve Bunprasert'in yaptığı çalışmada HDF'lerin ikilenme zamanlarını 26 saat olarak bulmuşlardır [77]. Zulfakar ve ark. yaptıkları çalışmada ise HaCaT'ların ikilenme zamanını 22 saat olarak bulmuşlardır [78]. Tez kapsamında oluşturulan in vitro yara modeli için HDF ve HaCaT hücreleri kullanılmış ve model oluşturulmadan önce hücrelerin ikilenme zamanlarının belirlenebilmesi için büyüme eğrisi grafikleri oluşturulmuştur. Büyüme eğrisi grafiklerine göre HDF hücrelerinin ikilenme zamanı 48 saat bulunurken, HaCaT hücrelerinin ikilenme zamanı 10,5 saat olarak gözlenmiştir (**Şekil 4.12**).

Yapılan çalışmalarda MKH eksozomlarının yara iyileşmesini desteklediği ve yara onarım süresini kısalttığına dair kanıtlar bulunmuştur. Shabbir ve ark. yaptığı çalışmada kronik yara hastalarında MKH eksozomlarının fibroblast proliferasyonunu ve göçünü arttırdığı gözlenmiştir. Aynı zamanda MKH eksozomlarının yara iyileşmesinde etkili ERK, STAT3 gibi yolakları aktive ettiği ve IGF1 (insülin benzeri büyüme faktörü-1), NGF (sinir büyüme faktörü), HGF (hepatosit büyüme faktörü) gibi büyüme faktörleri salgıladığı gözlenmiştir [79]. Hoang ve ark. yaptığı çalışmaya göre, insan göbek kordonundan, adipoz dokudan ve kemik iliğinden izole edilen eksozomlar keratinosit ve fibroblast 'çizik testi' yara modellerine uygulanarak yara iyileşme kapasiteleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre eksozomun kaynak hücresi ve dozunun yara iyileşme kapasitesinde etkili olduğu bulunmuştur [62]. Yine yapılan başka çalışmada MKH eksozomlarının oksidatif cilt hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. H₂O₂ ile uyarılan keratinositlere ve UV ile ışınlanmış fare derisine MKH eksozomları uygulandığında reaktif oksijen türleri oluşumunun, DNA hasarının, anormal kalsiyum sinyalinin ve mitokondriyal değişikliklerin azaldığı gözlenmiştir [80]. Shabbir ve ark. yaptığı çalışmada da insan MKH'lerinden elde edilen eksozomların fibroblast çizik testi yara iyileşme modelinde doza bağlı bir artış gösterdiği bulunmuştur. 0.1, 1 ve 10 µg/ml eksozom dozları uygulanan yara modellerinde en fazla yara kapanmasının 10 µg/ml'de olduğu görülmüştür [79]. Bu tez çalışması kapsamında da çizik testi analizlerinde % yara iyileşme sonuçlarına göre tüm zaman aralıkları için hem AKMKH hem de KİMKH eksozomlarının yara kapatma miktarları negatif kontrol grubuna göre kıyaslandığında tüm gruplar için istatistiksel olarak anlamlı derecede yara kapanmasını desteklediği gözlenmiştir (**; p≤ 0,01, ***; p≤ 0,001). Alamar Blue sonuçlarına göre ise AKMKH

eksozomlarının hücre proliferasyonu artışı için 36. saatte UV'li 10 µg/ml eksozom dozunda, 48. saatte ise UV'li 5 ve 10 µg/ml eksozom dozlarında anlamlı hücre proliferasyon artışı gözlenmiştir (*; p≤ 0,05, **; p≤ 0,01). KİMKH eksozomlarının Alamar Blue sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı hücre proliferasyon artışı UV'li 5 µg/ml, UV'siz ise 5 ve 10 µg/ml eksozom dozlarında gözlenmiştir (*; p≤ 0,05, **; p≤ 0,01, ***, p≤ 0,001). Bu sonuçlara göre UV'lenmiş MKH eksozomlarının çizik testi yara kapanmasında UV'lenmemiş MKH eksozomlarına göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (**Şekil 4.14-15-16-17**).

Yara iyileşme çalışmalarında 3B modeller yara ortamını, hücre-hücre etkileşimlerini ve hücrelerin ESM ile olan etkileşimi ve migrasyon davranışını 2B modellere göre daha iyi temsil ettiği için bu alanda yapılan çalışmalar zamanla hız kazanmıştır [58]. 3B deri modellerinde genellikle iki veya üç katmanlı bir yapı söz konusudur [81]. İki katmandan oluşan modellerde ilk katman fibroblastların gömülü olduğu bir yapı iskelesinden oluşur ve dermisi taklit ederken, ikinci katman ise epidermisi taklit eden keratinosit tabakasından oluşmaktadır. Keratinositlerin, hava sıvı arayüzünde olgunlaştırılarak birkaç katmandan oluşan gerçek deri yapısını taklit etmesi amaçlanır. Üç katmandan oluşturulan 3B modellerde ise farklı olarak birinci katman hücresiz bir yapı iskelesinden oluşarak, ikinci katman olan dermis için destekleyici bir yapı üstlenir. Üçüncü ve en üst katman ise yine keratinositlerden oluşan epidermis tabakasıdır. 3B deri modellerinde kullanılan yapı iskeleleri çeşitlilik göstermektedir. Genellikle ESM elemanı olan kollajen hidrojeli kullanımı tercih edilirken, sentetik polimerler, hücresizleştirilmiş dermis ve glikozaminoglikanlar da kullanılmaktadır [58, 82]. Bu tez çalışmasında oluşturulan 3B deri yara modeli için, tip 1 kollajen kullanılarak üç katmanlı bir deri modeli oluşturulmuştur. İlk katman için kollajen hücresiz bir şekilde oluşturulmuş ve ikinci katman için destek görevi görmüştür. İkinci katman olarak HDF'lerle birlikte oluşturulmuş kollajen jel dermisi taklit etmiştir (**Şekil 4.18**). Son olarak üçüncü katmanda HaCaT'lar hava sıvı arayüzünde olgunlaştırılmış ve epidermisi taklit etmiştir. Oluşturulan deri modellerinin takibi için 7, 14 ve 21. günlerde histolojik analiz yapılarak H&E boyaması yapılmış ve oluşturulan modellerdeki katmanlaşma gözlenmiştir (**Şekil 4.19**).

3B oluşturulan deri modellerinde yara oluşumu için eksizyonel veya insizyonel yara oluşturulabileceği bildirilmiştir [83]. Bu tez çalışmasında oluşturulan 3B deri modellerinde 2 mm'lik dermatolojik biyopsi punch aleti kullanılarak eksizyonel yara oluşumu tercih edilmiştir. Yaralar oluşturulduktan sonra "çizik testi" sonuçlarına göre

belirlenen dozlar (AKMKH'ler için 10 µg/ml, KİMKH'ler için 5 µg/ml) uygulanmıştır. Eksozom uygulamaları serumsuz besiyeri içinde ve transwellin dış kısmından gerçekleştirilmiştir. Yara oluşturulan dokular, öncesinde kültüre edilen HDF ve kollajen jelden oluşan “yara destek kollajeni” üzerine yerleştirilmiştir. Yara modelleri hava-sıvı arayüzünde kültüre devam edilerek yara iyileşmeleri takip edilmiştir (**Şekil 3.4**). Wahabzada ve ark. yaptığı çalışmada 3B deri yara modeli oluşturulmuş ve yara iyileşmesini takip eden 5 ve 10. günlerde histolojik analizler gerçekleştirilmiştir [84]. Bu tez çalışmasında da yara oluşumunu takip eden 3. ve 7. günlerde dokular fikse edilerek H&E boyaması yapılmış ve yara açıklıkları Image J programı kullanılarak ölçülmüş ve yüzde yara iyileşme değerleri hesaplanmıştır (**Şekil 4.24**).

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında UV-B ile indüklenen AKMKH ve KİMKH'lerden elde edilen eksozomların, in vitro yara iyileşme modellerindeki yara kapatmasını arttırdığı sonucuna varılmıştır. Yapılan büyüme faktörü ve sitokin analizleri sonucuna göre UV'lenmiş grupların UV'sizlere kıyasla daha yüksek miktarlarda büyüme faktörü ve sitokin salımı yapmaları bu sonucu desteklemektedir. Aynı zamanda 2B çizik testi yara modelindeki Alamar Blue ve % yara kapanma analizi sonuçlarına göre de AKMKH eksozomlarından UV'li 10 µg/ml dozun, KİMKH eksozomlarında ise UV'li 5 µg/ml dozun istatistiksel bir farklılık göstererek yara kapanmasına olumlu etkisinin olduğu görülmüştür. 3B deri yara modellerindeki analizler ise aynı şekilde 2B model sonuçlarını destekler niteliktedir. Bunların yanı sıra, yapılan büyüme faktörü ve sitokin analizleri, 2B ve 3B yara iyileşme analizlerine göre; AKMKH eksozomlarının hem büyüme faktörü ve sitokin içeriği açısından hem de yara iyileştirme potansiyeli açısından KİMKH eksozomlarına göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. UV ışığı ile indüklenen MKH eksozomlarının yara kapanmasına olan destekleyici potansiyel etkilerinin daha detaylı incelenebilmesi için moleküler düzeyde ileri analizler ve in vivo hayvan çalışmaları ile desteklenmesi önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Zhong, S., Y. Zhang, and C. Lim, Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2010. **2**(5): p. 510-525.
2. Das, S. and A.B. Baker, Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2016. **4**: p. 82.
3. Tottoli, E.M., et al., Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, 2020. **12**(8): p. 735.
4. Isakson, M., et al., Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential. *Stem cells international*, 2015. **2015**.
5. Lai, R.C., R.W.Y. Yeo, and S.K. Lim. Mesenchymal stem cell exosomes. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2015. Elsevier.
6. Mendt, M., K. Rezvani, and E. Shpall, Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone marrow transplantation*, 2019. **54**(Suppl 2): p. 789-792.
7. Hade, M.D., C.N. Suire, and Z. Suo, Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine. *Cells*, 2021. **10**(8): p. 1959.
8. Kim, W.-S., et al., Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *Journal of dermatological science*, 2008. **49**(2): p. 133-142.
9. Kim, W.-S., et al., Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *Journal of dermatological science*, 2009. **53**(2): p. 96-102.
10. Kim, H.-S., et al., Clinical trial of human umbilical cord blood-derived stem cells for the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis: phase I/IIa studies. *Stem cells*, 2017. **35**(1): p. 248-255.
11. Lopez Perez, R., et al., Human mesenchymal stem cells are resistant to UV-B irradiation. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 20000.
12. Kabashima, K., et al., The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology*, 2019. **19**(1): p. 19-30.
13. Geerligs, M., Skin layer mechanics. Eindhoven: TU Eindhoven, 2010.
14. Guerra, A., J. Belinha, and R.N. Jorge, Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *Journal of theoretical biology*, 2018. **459**: p. 1-17.
15. Michalak, M., et al., Bioactive compounds for skin health: A review. *Nutrients*, 2021. **13**(1): p. 203.
16. Yousef, H., M. Alhajj, and S. Sharma, *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. 2022, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
17. Hwa, C., E.A. Bauer, and D.E. Cohen, Skin biology. *Dermatologic therapy*, 2011. **24**(5): p. 464-470.
18. Yadav, N., et al., Skin anatomy and morphology, in *Skin Aging & Cancer*. 2019, Springer. p. 1-10.

19. Arda, O., N. Göksüğü, and Y. Tüzün, Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*, 2014. **32**(1): p. 3-13.
20. Singer, A.J. and R.A. Clark, Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 1999. **341**(10): p. 738-746.
21. Robson, M.C., D.L. Steed, and M.G. Franz, Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current problems in surgery*, 2001. **38**(2): p. 72-140.
22. Sorg, H., et al., Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *European Surgical Research*, 2017. **58**(1-2): p. 81-94.
23. Kiya, K. and T. Kubo, Neurovascular interactions in skin wound healing. *Neurochemistry international*, 2019. **125**: p. 144-150.
24. Gantwerker, E.A. and D.B. Hom, Skin: histology and physiology of wound healing. *Clinics in plastic surgery*, 2012. **39**(1): p. 85-97.
25. Reinke, J. and H. Sorg, Wound repair and regeneration. *European surgical research*, 2012. **49**(1): p. 35-43.
26. Wilkinson, H.N. and M.J. Hardman, Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, 2020. **10**(9): p. 200223.
27. Fortier, L.A., Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 2005. **34**(5): p. 415-423.
28. Kalra, K. and P.C. Tomar, Stem cell: basics, classification and applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2014. **2**(7): p. 919-930.
29. Hale, Ö., Kök Hücreler. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. **33**(3): p. 271-280.
30. Can, A., A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol*, 2008. **25**(2): p. 57-59.
31. Friedenstein, A.J., et al., Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 1974. **17**(4): p. 331-340.
32. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*, 2008. **8**(9): p. 726-736.
33. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
34. Ghaneialvar, H., et al., Characterization and classification of mesenchymal stem cells in several species using surface markers for cell therapy purposes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2018. **33**(1): p. 46-52.
35. Wagner, W., et al., Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology*, 2005. **33**(11): p. 1402-1416.
36. Pittenger, M.F., et al., Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative medicine*, 2019. **4**(1): p. 22.
37. Amaro-Ortiz, A., B. Yan, and J.A. D'Orazio, Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*, 2014. **19**(5): p. 6202-6219.

38. Rühle, A., et al., The radiation resistance of human multipotent mesenchymal stromal cells is independent of their tissue of origin. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 2018. **100**(5): p. 1259-1269.
39. Xian, D., et al., Nrf2 overexpression for the protective effect of skin-derived precursors against UV-induced damage: evidence from a three-dimensional skin model. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019. **2019**.
40. Nicolay, N.H., et al., Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 2013. **87**(5): p. 1171-1178.
41. Hessvik, N.P. and A. Llorente, Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018. **75**: p. 193-208.
42. Edgar, J.R., Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC biology*, 2016. **14**(1): p. 1-7.
43. Jing, H., X. He, and J. Zheng, Exosomes and regenerative medicine: state of the art and perspectives. *Translational Research*, 2018. **196**: p. 1-16.
44. Zhang, M., et al., Methods and technologies for exosome isolation and characterization. *Small Methods*, 2018. **2**(9): p. 1800021.
45. Kooijmans, S.A., et al., Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*, 2012: p. 1525-1541.
46. Chia, B.S., et al., Advances in exosome quantification techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2017. **86**: p. 93-106.
47. Gurunathan, S., et al., Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, 2019. **8**(4): p. 307.
48. Tang, Y., Y. Zhou, and H.-J. Li, Advances in mesenchymal stem cell exosomes: a review. *Stem cell research & therapy*, 2021. **12**(1): p. 1-12.
49. Lai, R.C., et al., Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*, 2010. **4**(3): p. 214-222.
50. Xunian, Z. and R. Kalluri, Biology and therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Cancer Science*, 2020. **111**(9): p. 3100-3110.
51. Yu, B., X. Zhang, and X. Li, Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*, 2014. **15**(3): p. 4142-4157.
52. Ha, D.H., et al., Toxicological evaluation of exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2020. **115**: p. 104686.
53. Yamashita, T., Y. Takahashi, and Y. Takakura, Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2018. **41**(6): p. 835-842.
54. Phinney, D.G. and M.F. Pittenger, Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. *Stem cells*, 2017. **35**(4): p. 851-858.
55. Sami, D.G., H.H. Heiba, and A. Abdellatif, Wound healing models: a systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine*, 2019. **24**(1): p. 8-17.

56. Ud-Din, S. and A. Bayat, Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Repair and Regeneration*, 2017. **25**(2): p. 164-176.
57. BAKTIR, G., Wound repair and experimental wound models. *Experimed*, 2019. **9**(3): p. 130-137.
58. Stamm, A., et al., In vitro wound healing assays–state of the art. *BioNanoMaterials*, 2016. **17**(1-2): p. 79-87.
59. Rossi, A., et al., Generation of a three-dimensional full thickness skin equivalent and automated wounding. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2015(96): p. e52576.
60. Brownson, J.R., *Solar energy conversion systems*. 2013: Academic Press.
61. Muniandy, K., et al., In vitro wound healing potential of stem extract of *Alternanthera sessilis*. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2018. **2018**.
62. Hoang, D.H., et al., Differential wound healing capacity of mesenchymal stem cell-derived exosomes originated from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord under serum-and xeno-free condition. *Frontiers in molecular biosciences*, 2020. **7**: p. 119.
63. Raziyeva, K., et al., Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 2021. **11**(5): p. 700.
64. Nour, S., et al., Skin wound healing assisted by angiogenic targeted tissue engineering: A comprehensive review of bioengineered approaches. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2021. **109**(4): p. 453-478.
65. Ha, D.H., et al., Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration. *Cells*, 2020. **9**(5): p. 1157.
66. Çetin, E.A., et al., Investigation of UV-treated mesenchymal stem cells in an in vitro wound model. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2023.
67. Zhu, L., et al., Isolation and characterization of exosomes for cancer research. *Journal of hematology & oncology*, 2020. **13**(1): p. 1-24.
68. Bitirim, C.V., et al., Cardioprotective effect of extracellular vesicles derived from ticagrelor-pretreated cardiomyocyte on hyperglycemic cardiomyocytes through alleviation of oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Scientific Reports*, 2022. **12**(1): p. 5651.
69. Chen, J.-y., et al., Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived microvesicles on pulmonary arterial hypertension in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014. **35**(9): p. 1121-1128.
70. Toh, W.S., et al., MSC exosome works through a protein-based mechanism of action. *Biochemical Society Transactions*, 2018. **46**(4): p. 843-853.
71. Dehnavi, S., et al., Loading Ovalbumin into Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a Nanoscale Carrier with Immunomodulatory Potential for Allergen-Specific Immunotherapy. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 2023. **11**(4): p. 626.

72. Shamili, F.H., et al., Immunomodulatory properties of MSC-derived exosomes armed with high affinity aptamer toward myelin as a platform for reducing multiple sclerosis clinical score. *Journal of Controlled Release*, 2019. **299**: p. 149-164.
73. Soo, C.Y., et al., Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology*, 2012. **136**(2): p. 192-197.
74. Barrientos, S., et al., Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 2014. **22**(5): p. 569-578.
75. Barrientos, S., et al., Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 2008. **16**(5): p. 585-601.
76. Behm, B., et al., Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2012. **26**(7): p. 812-820.
77. Theerakittayakorn, K. and T. Bunprasert, Differentiation capacity of mouse L929 fibroblastic cell line compare with human dermal fibroblast. *International Journal of Medical and Health Sciences*, 2011. **5**(2): p. 51-54.
78. Zulfakar, M.H., C.M. Ong, and C.M. Heard, The effects of betamethasone dipropionate and fish oil on HaCaT proliferation and apoptosis. *International journal of pharmaceutics*, 2012. **434**(1-2): p. 399-405.
79. Shabbir, A., et al., Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro. *Stem cells and development*, 2015. **24**(14): p. 1635-1647.
80. Wang, T., et al., MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system. *Biomaterials*, 2020. **257**: p. 120264.
81. Pupovac, A., et al., Toward immunocompetent 3D skin models. *Advanced healthcare materials*, 2018. **7**(12): p. 1701405.
82. Klicks, J., et al., In vitro skin three-dimensional models and their applications. *Journal of Cellular Biotechnology*, 2017. **3**(1): p. 21-39.
83. Carlson, M.W., et al., Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. *Current Protocols in Cell Biology*, 2008. **41**(1): p. 19.9. 1-19.9. 17.
84. Wahabzada, M., et al., Monitoring wound healing in a 3D wound model by hyperspectral imaging and efficient clustering. *PloS one*, 2017. **12**(12): p. e0186425.