

Atf İçin: Kaan, D. (2023). Wharton Jel Kaynaklı Eksozom İzolasyonu: Bir Metot Karşılaştırma Çalışması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 152-161.

To Cite: Kaan, D. (2023). Wharton Gel Derived Exosome Isolation: A Method Comparative Study. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(1), 152-161.

Wharton Jel Kaynaklı Eksozom İzolasyonu: Bir Metot Karşılaştırma Çalışması

Dilek KAAAN^{1,2}

Öne Çıkanlar:

- Kök hücre
- Mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozom
- Eksozom izolasyon metotları

Anahtar Kelimeler:

- Wharton jel
- Eksozom
- İzolasyon metotları

ÖZET:

Eksozomlar endozomdan köken almış, immün modülasyonda önemli role sahip, hücrelerarası etkileşimi sağlayan, nano boyutta biyomoleküllerdir. Eksozomlar tetraspaninler, proteinler, Annexin ve Rab proteinleri gibi çok çeşitli zar proteinlerine sahiptirler ve bu içeriklere sahip olmaları ile enfeksiyon, sinir sistemi, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların tedavi ve teşhisinde kullanılmaya adaydır. Hemen hemen bütün vücut sıvılarından salınan eksozomların hem homojen hem de çok sayıda izole edilebilmesi teşhis ve tedavi için önemlidir. Bu nedenle eksozomların saflaştırılması ve tanıya yönelik spesifik eksozom izolasyonu tedavi amaçlı üretimi açısından önemli bir basamaktır. Bu çalışmada wharton jel kaynaklı ticari mezenkimal kök hücre kültür besiyerinden (medyum) farklı izolasyon metotları olan ultrasantrifüj, diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon ve çökeltme (presipitasyon) metodu kullanılarak en çok sayıda ve en saf eksozom izolasyonu yapılması amaçlanmıştır. Eksozomların karakterizasyonu için; görüntülenmesi, saflığı ve boyut analizi her üç metot için belirlenmiştir. Sonuç olarak ultrasantrifüj metodunda, hem diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon, hem de presipitasyon metoduna göre çok daha fazla sayıda çok daha küçük boyutta eksozom izolasyonu olduğu görülmüştür. Diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodu sonucunda ise eksozom sayısının çok daha az olduğu ancak ultrasantrifüj yöntemi ile elde edilen eksozomlarla aynı saflıkta olduğu görülmüştür. Eksozomların hemen hemen her hastalığın tedavisinde etkin rol almalarından dolayı hastalıkların teşhisinde kullanım kolaylığı sağlamakla birlikte iyi biyo-dağılım, biyoyoumluluk ve düşük immünojeniteye sahip olmaları da tedavi aşamasında avantaj sağlayacaktır.

Wharton Gel-Derived Exosome Isolation: A Method Comparative Study

ABSTRACT:

Exosomes are nano-sized biomolecules that originate from the endosome, have an important role in immune modulation, and provide intercellular interaction. Exosomes have a wide variety of membrane proteins such as tetraspanins, proteins, Annexin and Rab proteins, and they are candidates for use in the treatment and diagnosis of infections, nervous system, cancer and neurodegenerative diseases. It is important for diagnosis and treatment that exosomes released from almost all body fluids can be isolated both homogeneously and in large numbers. Therefore, the purification of exosomes and obtaining specific exosomes for diagnosis is an important step in their production for therapeutic purposes. This study aimed to isolate the most and purest exosomes by using different isolation methods, ultracentrifugation, differential centrifugation-filtration and precipitation from commercial mesenchymal stem cell culture medium derived from wharton gel. Imaging, purity and size analysis of exosome characterization was determined for methods. As a result, it was observed that as a result of the isolation with the ultracentrifuge method, a much larger number of exosomes were isolated compared to both precipitation and differential centrifugation-filtration methods. According to the differential centrifugation-filtration method, it was observed that the number of exosomes was much less, but the exosomes were of the same purity as the ultracentrifuge method. Since exosomes play an active role in treating almost every disease, they provide ease of use in diagnosing diseases, and their good biodistribution, biocompatibility and low immunogenicity will also provide an advantage in the treatment phase.

Highlights:

- Stem cell
- Mesenchymal stem cell derived exosomes
- Exosome isolation methods

Keywords:

- Wharton gel
- Exosome
- Isolation methods

^{1,2} Dilek KAAAN (Orcid ID: 0000-0003-3622-2249), ¹Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri, Türkiye
²Erciyes Üniversitesi, Halil Bayraktar Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Kayseri, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Dilek KAAAN, e-mail: drdlkkaan@gmail.com

Makale 08 Ekim 2022 tarihinde online düzenlenen” 11. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi’nde” sözlü olarak sunulmuştur.

Etik Kurul Onayı / Ethics Committee Approval: Bu çalışmanın in vitro çalışma yöntemi olup, hazır ticari hücre kullanılması nedeniyle çalışmanın doğası gereği herhangi bir etik kurul onayı uygulanamaz.

GİRİŞ

Eksozomlar, son on yılda ortaya çıkmış ve hızlı bir şekilde ilgi çeken, küçük endozomal kaynaklı membran mikrovezikülleridir. Eksozomların varlığı hücre dışı boşlukta, 1980'lerin sonlarında tanımlanmıştır (Johnstone ve ark., 1987). Aslında çoğu canlı hücre tarafından salgılanan ekstra veziküller (EV) olarak bilinen eksozomlar, 20-200 nm boyutunda olan membran lipozomlarıdır. Vezikül tipleri, köken aldıkları hücre tiplerine, fonksiyonlarına ve büyüklüklerine göre isimlendirilmektedir. Bu genişleyen araştırma alanında kullanılan EV terimleri, eksozomları, ektozomları, mikrovezikülleri, mikropartikülleri, prostasomları, tolerozomları (diyet antijenlerine karşı immünolojik toleransı indükleyen), apoptotik cisimleri (apoptotik hücreler tarafından salınan) ve nanovezikülleri kapsar (Simpson ve ark., 2009). Bu hücre dışı veziküller, proteinler, nükleik asitler (Sun ve ark., 2011) ve lipidlerden oluşan (Vidal ve ark., 2015), bütün bu bileşikler kargo olarak taşıyan ve bu kargoları karşılaştıkları hedef hücrelere iletebilen işlevsel araçlardır. Bu özellikleri nedeniyle, eksozomlar, bağışıklık tepkisi (Greening ve ark., 2015), sinyal iletimi (Gangoda 2014), antijen etkileşimi (Mittelbrunn ve ark., 2011) gibi birçok hücresel süreçte önemli bir rol oynayabilen yeni bir hücreler arası iletişim modunu temsil eder. Hücreler, mikroRNA (miRNA), haberci RNA (mRNA), proteinler ve diğer biyomolekülleri reseptörler içeren zar vezikülleri aracılığıyla hücre içi organeller arasında iletimi sağlar. Bu membran vezikülleri kan, tükürük, anne sütü ve sperm dahil olmak üzere çoğu vücut sıvısında salgılanır. Bu tür membran veziküllerinin üç ana tipi vardır: mikropartiküller, mikroveziküller (100-1.000 nm) ve eksozomlardır (Simpson ve ark., 2009). Eksozomlar, hücreler arası iletişim için hemen hemen her memeli hücre tipi tarafından salınan çift katmanlı zar vezikülleridir. Örneğin, kanser hücrelerinden eksozom salımı, bu tür hücreler arası iletişim yoluyla metastaza katkıda bulunurken mezenkimal kök hücrelerden salgılanan eksozomlar tedavi edici özellikleri baskındır. Bu nedenle eksozomlar, türetildikleri hastalıklı ve sağlıklı hücreye özgü biyobelirteç profilleri sergiledikleri için teranostik uygulamalarda da kullanılır (Harding ve ark., 1983). Eksozomlar ve biyolojik olarak aktif bileşikler taşıması ile kronik inflamasyon, kardiyovasküler ve renal hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, lipid metabolik hastalıklar ve tümörler gibi birçok hastalıkta prognostik bilgi sunabilir (Zhang ve ark., 2019). Bu çalışmada temini kolay, etik açıdan problem olmayan, ucuz maliyetli ve insan lökosit antijen (Human Leucocyte Antigen, HLA) eşleşmesinde sıkıntı olmayan insan göbek kordonu çevresinde yer alan wharton jelinden izole edilmiş mezenkimal kök hücreleri (WJ-MKH)'nden farklı metotlar kullanılarak en verimli eksozom izolasyonu metodu belirlenmeye çalışılmıştır. WJ-MKH'leri hücre bazlı tedaviler için gelecek vaat eden hücreler olarak görülmüştür. WJ, damarları, arterleri, göbek kordonu damarlarını ve duvarlarının adventisya bölümünü çevreleyen perivasküler bölgelerdir (Bonso ve Fonk 2013). WJ-MKH'ler, yetişkin doku kaynaklı MKH 'lerden (Widowati ve ark., 2014) daha yüksek bir çoğalma hızına ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahiptir ve doku mühendisliği amacı için kullanılmaya da uygundur (Troyer ve ark., 2008). En önemlisi ise doğum sonrası çöpe atılan göbek kordonunda yer alması ile etik açıdan uygun olan, düşük enfeksiyon riski, kanserojen olmayan, sitoterapi sonrası düşük immünite ve düşük immunojenisite göstermeleri ile avantajlıdır (Hassan ve ark., 2013, Yusoff ve ark., 2016, Prijal ve ark., 2013, Beeravolu ve ark., 2017). Ancak tedavi sonrası uzun yılların geçmesi ve transplante edilen WJ-MKH'lerin replikasyonunun devam etmesi bazı dokularda tümör büyümesini desteklemesi ve hücre boyutunun büyük olması klinik kullanımında dezavantaj oluşturmuştur. WJ-MKH eksozomlarının (WJ-Ekso) ise daha küçük boyutta olmaları, vücut içerisinde transplante sonrası stabil kalabilmeleri, hücreler arası iletişim sağlayarak depolanma özelliklerinin olması nedeni ile günümüzde klinik kullanım için daha uygun ve avantajlı hale gelmiştir.

MATERYAL VE METOT

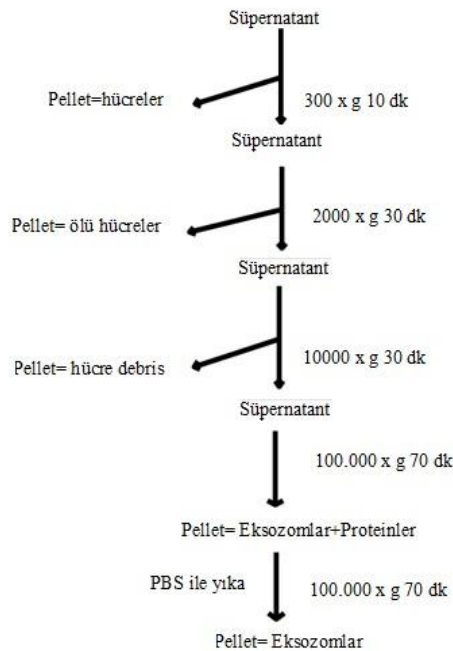
Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan wharton jelinden elde edilen kök hücreler, hazır ticari hücre olarak sağlanmıştır. Bu nedenle herhangi bir etik onay gerekmemiştir. WJ-MKH alınarak laboratuvar koşulları ve kullanılan ürün özelliklerine göre optimize edilerek %5 fetal sığır serum (Fetal bovine serum, FBS), %1 gentamisin ve α -MEM (Minimum Essential Medium) içeren hücre besiyeri (kompleks medyum) ortamına yani kütür koşulları alınarak 37 °C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücre yetiştirme kapları (flask) tabanında hücre yoğunluğu %70-80'e geldiğinde medyum atılarak FBS içermeyen kompleks medyum koşullarına alınarak 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. Bu zaman sonunda medyum alınarak eksozom izolasyon aşamasına geçilmiştir (Karaöz ve ark., 2017).

Wharton Jeli Kaynaklı Eksozomların İzolasyonu

Ultrasantrifüj metodu ile eksozom izolasyonu

Ultrasantrifüj ile eksozom izolasyonu optimize edilerek basamakları Şekil 1'de gösterilmiştir. Kompleks medyundan en az 5 ml alınarak işleme başlanmıştır. İlk basamaklar artan hızlarda büyük ölü hücreleri ve büyük hücre kalıntılarını ortadan kaldırmak için yapılmıştır (1-5.basamaklar). Son basamağa gelinceye kadar basamakların her birinde pellet (debri) atılır ve süpernatant sonraki adımlar için kullanılır. Son aşamada elde edilen süpernatant eksozomlara karşılık gelen mikrovezikülleri pellet haline getirebilmek için 100.000 x g'de ultrasantrifüj yapılır. Pellet, son kalıntıların yok olması için fosfat tamponu (PBS) içerisinde yıkanarak son kez aynı hızda santrifüjleme yapılmıştır. Karakterizasyon işlemleri için pellet 600 μ l PBS içerisinde çözülerek karakterizasyon işlem gününe kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir (They ve ark., 2006).

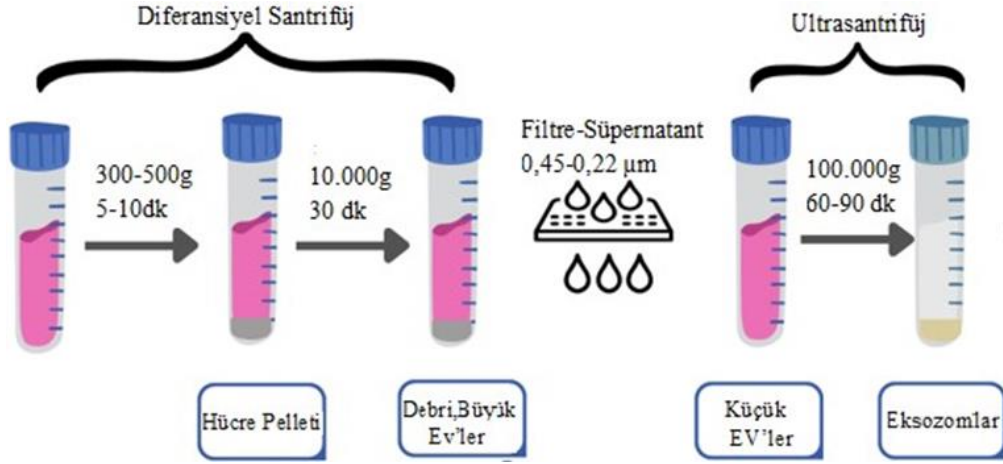


Şekil 1. Diferansiyel ultrasantrifüjlemeyle eksozom izolasyonu için akış şeması. Her santrifüjlemenin hızı ve uzunluğu okların sağında belirtilmiştir.

Diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodu ile eksozom izolasyonu

Diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon ile eksozom izolasyonu optimize edilerek basamakları Şekil 2'de gösterilmiştir. Kompleks medyundan en az 5 ml alınarak işleme başlanmıştır. İlk basamaklar artan hızlarda büyük ölü hücreleri ve büyük hücre kalıntılarını ortadan kaldırmak için yapılmıştır.

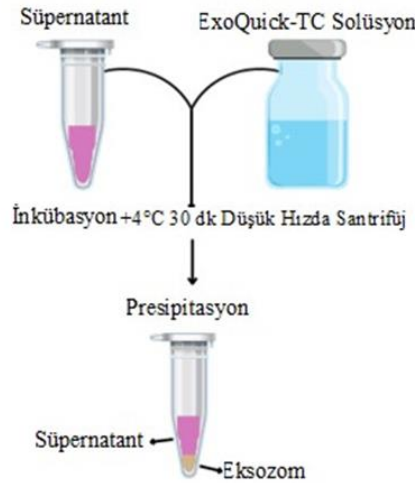
Diferansiyel santrifüj aşaması sonrası süpernatant alınarak ilk önce 0.45 daha sonra 0.22 μm 'lik filtre ile filtrasyon yapılmıştır. Filtrasyon sonrası süpernatant alınarak 100.000 g'de 60-90 dk arası ultrasantrifüj yapılmıştır. Karakterizasyon işlemleri için pellet 600 μl PBS içerisinde çözülerek karakterizasyon işlem gününe kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir (Vergauwen ve ark., 2017).



Şekil 2. Diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodu ile eksozom izolasyonu için akış şeması.

Presipitasyon metodu ile eksozom izolasyonu

Bu metot için EXOTC50A-1 ExoQuick-TC kiti kullanarak izolasyon yapılmıştır. Kit prosedürüne göre 5 ml kompleks medyundan alınarak 1 ml ExoQuick-TC solüsyon eklenmiştir. 30 dk düşük hızda $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gece boyu inkübe edilmiştir. Süre sonunda süpernatant atılarak pellet kısmı yani eksozomlar alınarak karakterizasyon işlemleri için pellet 600 μl PBS içerisinde çözülerek karakterizasyon işlem gününe kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Presipitasyon metodu ile eksozom izolasyonu için akış şeması.

Wharton Jeli Kaynaklı Eksozomların Karakterizasyonu

Eksozomların görüntülenmesi

İzole edilen eksozomlar yapısal ve boyut açısından değerlendirilmek üzere 1/1000 dilüsyon oranı ile fosfat tamponu (PBS) ile seyreltilerek altın kaplama yapılmıştır ve Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) (Zeiss GEMINI 500, Almanya) cihazı kullanılarak görüntüleme yapılmıştır (Brydson ve ark., 2015). Elde edilen görüntülerden Image J programı yardımı ile görüntü alınarak eksozomların çapı ölçülmüş ve ortalama eksozom boyutu hesaplanmıştır.

Eksozomların boyut ölçümü

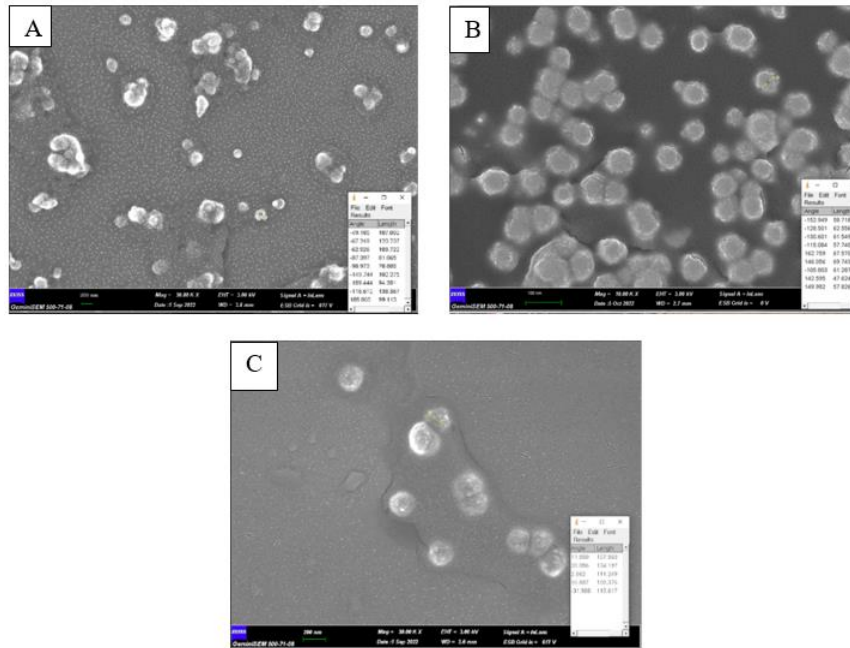
İzole edilen eksozomların boyutları Nanopartikül İzleme Analizi (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) ile monitor kullanılarak ölçülmüştür. Bu analiz ile elde edilen eksozom boyutları kaç nm ve kaç nm'de kaç tane eksozom olduğu görülmüştür. Ayrıca bu metot ile ml'de bulunan eksozom sayısı hesaplanmıştır (Dragovic ve ark., 2011).

Eksozomların zeta potansiyeli

İzole edilen eksozomlar 1/1000 dilüsyon oranı ile fosfat tamponu (PBS) ile seyreltilerek ayrılma ve dağılma stabilitesini belirlemek, elektriksel ve izoelektrik nokta arasında potansiyel farkı için zeta boyutlandırıcı analizörü ile zeta potansiyeli belirlenmiştir (Martin ve ark., 2020).

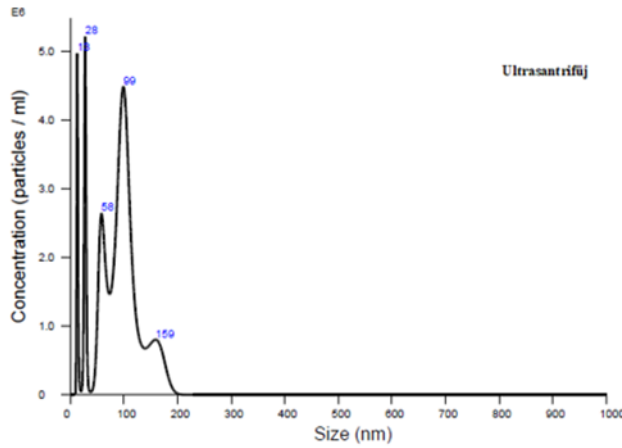
BULGULAR VE TARTIŞMA

İzolasyon metotları sonucunda; izole edilen eksozomların SEM analizi sonuçları değerlendirildiğinde eksozomların membran yapılarının bütünlüğünü koruduğu, Image J programı ile eksozomların ortalama boyut ve uygun boyutta dağılım gösterdikleri ölçülmüştür. Ultrasantrifüj yöntemi ile izolasyon metodunda $90.00 \text{ nm} \pm 14.7$, diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon yöntemi ile izolasyon metodunda eksozomların boyut ölçümü yapılmış ve ortalama $61.00 \text{ nm} \pm 6.3$, presipitasyon metodunda ise eksozomların ortalama boyutları $113 \text{ nm} \pm 5.7$ olarak bulunmuştur (Şekil 4).



Şekil 4. Eksozomların boyut ve membran yapılarının SEM ile analizi (A: Ultrasantrifüj metodu; B: Diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodu; C: Presipitasyon metodu).

NTA ile eksozomların hem boyut dağılımının hem de nispi konsantrasyonunun belirlenmesinde; ultrasantrifüj metodunda eksozomların boyutunun yaklaşık 88.8 nm olduğu ve konsantrasyonunun $2.71 \times 10^8/\text{ml}$ eksozom, diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodunda eksozomların boyutunun yaklaşık 64.7 nm olduğu ve konsantrasyonunun $1.25 \times 10^6/\text{ml}$ eksozom, presipitasyon metodunda ise 119.1 nm ve konsantrasyonunun $2.07 \times 10^6/\text{ml}$ eksozom olduğu gözlenmiştir (Şekil 5). Ayrıca nm aralıklarına göre her üç metot için eksozomların konsantrasyon ve boyut dağılım grafiği de Şekil 6'da verilmiştir.

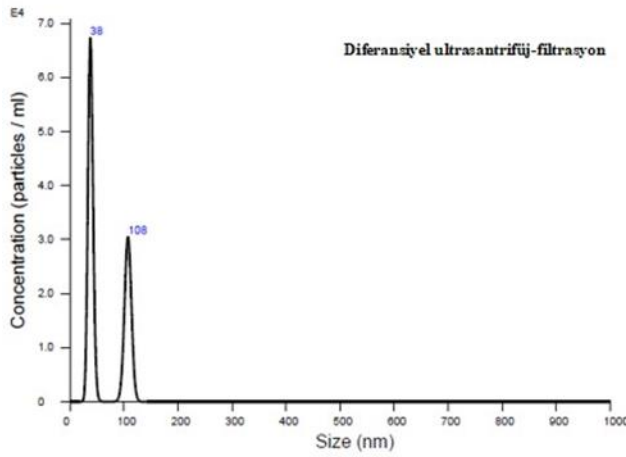
**Results**

Stats: Merged Data

Mean:	88.8 nm
Mode:	27.4 nm
SD:	40.1 nm
D10:	27.6 nm
D50:	93.0 nm
D90:	144.3 nm

Stats: Mean +/- Standard Error

Mean:	88.8 +/- 0.0 nm
Mode:	27.4 +/- 0.0 nm
SD:	40.1 +/- 0.0 nm
D10:	27.6 +/- 0.0 nm
D50:	93.0 +/- 0.0 nm
D90:	144.3 +/- 0.0 nm
Concentration:	2.71e+08 +/- 0.00e+00 particles/ml
	14.8 +/- 0.0 particles/frame
	34.1 +/- 0.0 centres/frame

**Results**

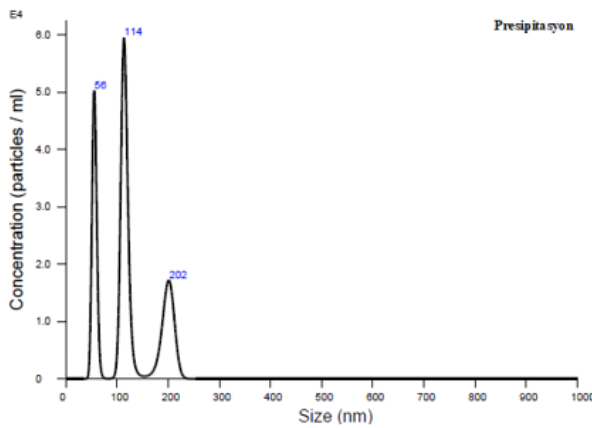
Stats: Merged Data

Mean:	64.7 nm
Mode:	37.7 nm
SD:	34.1 nm
D10:	33.6 nm
D50:	42.2 nm
D90:	111.3 nm

Stats: Mean +/- Standard Error

Mean:	64.7 +/- 0.0 nm
Mode:	37.7 +/- 0.0 nm
SD:	34.1 +/- 0.0 nm
D10:	33.6 +/- 0.0 nm
D50:	42.2 +/- 0.0 nm
D90:	111.3 +/- 0.0 nm
Concentration (Upgrade):	1.25e+06 +/- 0.00e+00 particles/ml
	0.3 +/- 0.0 particles/frame
	0.8 +/- 0.0 centres/frame

Concentration measurements may be unreliable
See summary file for more info

**Results**

Stats: Merged Data

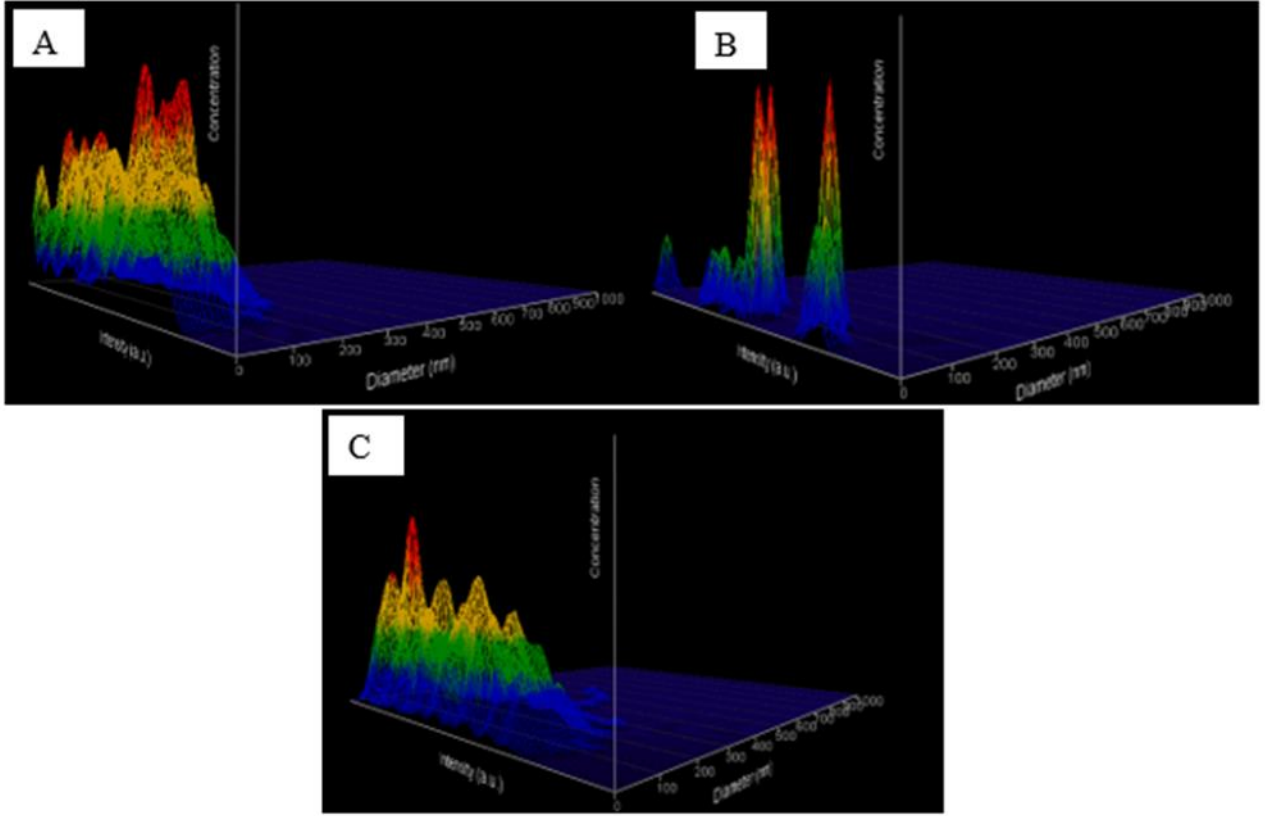
Mean:	119.1 nm
Mode:	113.4 nm
SD:	52.3 nm
D10:	53.9 nm
D50:	113.7 nm
D90:	202.4 nm

Stats: Mean +/- Standard Error

Mean:	119.1 +/- 0.0 nm
Mode:	113.4 +/- 0.0 nm
SD:	52.3 +/- 0.0 nm
D10:	53.9 +/- 0.0 nm
D50:	113.7 +/- 0.0 nm
D90:	202.4 +/- 0.0 nm
Concentration (Upgrade):	2.07e+06 +/- 0.00e+00 particles/ml
	0.3 +/- 0.0 particles/frame
	0.5 +/- 0.0 centres/frame

Concentration measurements may be unreliable
See summary file for more info

Şekil 5. NTA ile eksozomların boyut dağılımı ve konsantrasyonu

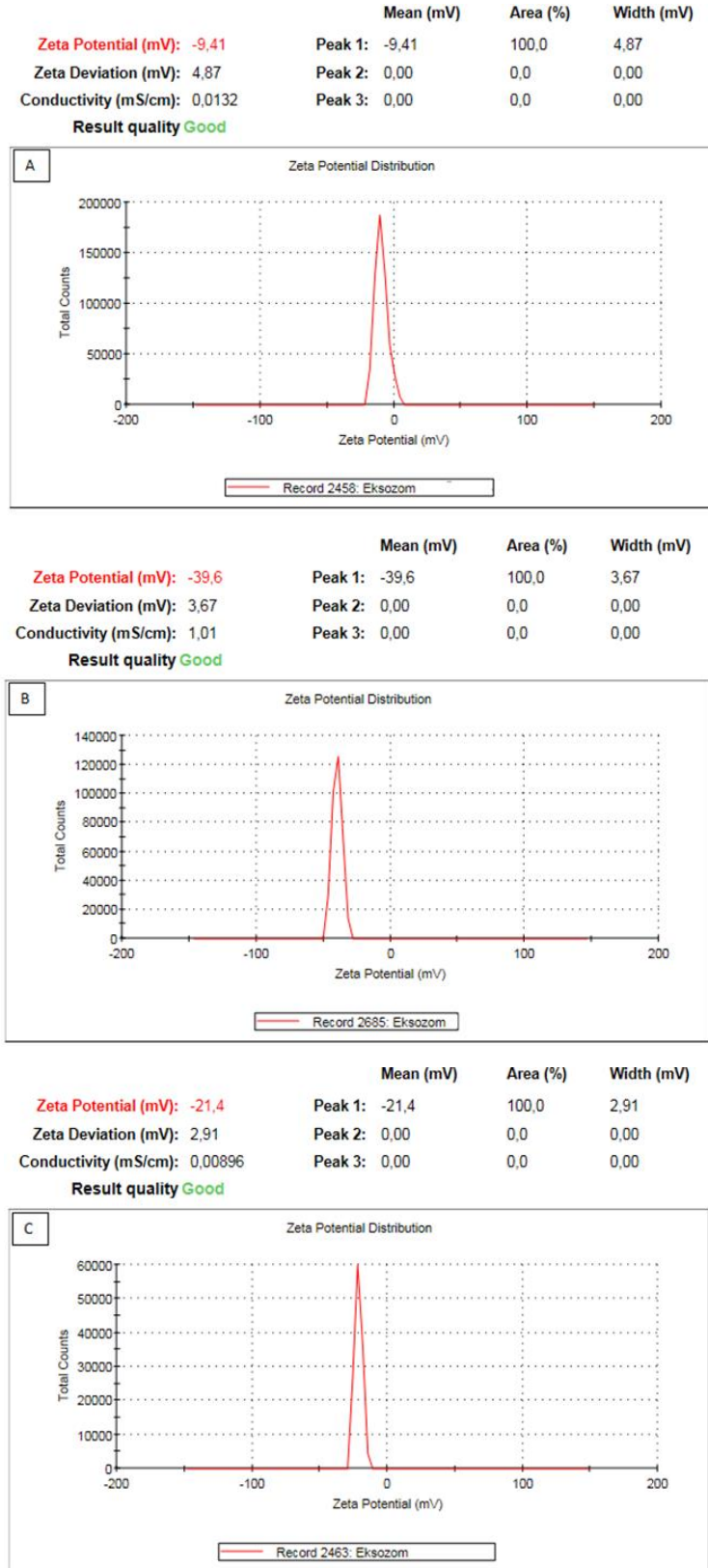


Şekil 6. NTA ile ekzozomların 3 boyutlu konsantrasyon ve boyut dağılımı grafiği (A: Ultrasantrifüj metodu; B: Diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodu; C: Presipitasyon metodu).

Ultrasantrifüj yöntemi ile izolasyon sonucunda ekzozomların zeta potansiyeli ise -9.41 mV, diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodunda ise -39.6 mV, presipitasyon metodunda zeta potansiyeli ise -21.4 mV, olarak bulunmuştur (Şekil 7). Bu sonuç zeta sizer cihazı tarafından değerlendirildiğinde ise hem ekzozomların zeta potansiyelinin hem de çalışma ortamı kararlılığının iyi olarak değerlendirildiği görülmüştür.

Ekzozomlar 20-200 nm boyut aralığında mikroveziküller olup, çok çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanır ve bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktiviteler sergiler (György ve ark., 2011). Özellikle ekzozomlar, son zamanlardaki araştırmaların odak noktası olmuştur. Ekzozomlar, fonksiyonel ve fenotipik olarak plazma membran kaynaklı veziküllerden ayırt edilmelerini sağlayan multiveziküler cisimler şeklinde endozomal-lizozomal yolun özel bir bölümünden türetilir (They ve ark., 2009, Murk ve ark., 2012). Ekzozomlar boyutlarının bir sonucu olarak, çalışmalar için bazı benzersiz problemler yaratırlar. Bu nedenle tasarlanan her çalışma için hangi izolasyon metodunun kullanılacağı çalışmanın verimi ve sonuçlarını etkileyecektir. Ayrıca bunlar dışında ekzozomların elde edildikleri kaynaklar da önem taşımaktadır. Elde edildikleri kaynağa göre ekzozomların terapetik etkisi, teşhiste kullanımı yani etki mekanizmaları da farklılık göstermektedir. Her hatalık teşhis ve tedavisinde ekzozomların kaynağı ve izolasyon metodu büyük önem taşımaktadır (Tofino ve ark., 2017). Ekzozomların izolasyonunda yaygın olarak kullanılan metodolojiler arasında ultrasantrifüjleme ile izolasyon, antikorlarla immüno-izolasyon, immüno-blotlama, lateks boncuklara adsorpsiyon ve ardından akış sitometrisi ve elektron mikroskopu bulunur (They ve ark., 2006). Bu metot çalışmada ise ultrasantrifüj, diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon ve presipitasyon yöntemleri “NTA, SEM ve Zeta Potansiyel” ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Ekzozomların en küçük boyutta izolasyonunun sağlandığı metodun diferansiyel

ultrasantrifüj-filtrasyon metodunun olduğu görülmüştür. Ancak her metot çalışmaya özgü olarak avantaj ve dezavantaj içermektedir.



Şekil 7. Eksozomların zeta potansiyeli değerleri (A: Ultrasantrifüj metodu; B: Diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodu; C: Presipitasyon metodu)

Diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon metodundaki dezavantaj ise diğer iki metoda göre eksozom konsantrasyonunun çok daha az olduğu görülmüştür. Filtrasyon aşamasında 0.22 µm filtrelerin kullanılması boyut dağılımı ve potansiyel kararlılık açısından avantaj sağlasa da daha fazla eksozom kaybı söz konusudur. Ultrasantrifüj yönteminde; her iki metoda göre çok daha fazla sayıda eksozom izolasyonu sağlanırken eksozomların boyut ve dağılımı diferansiyel ultrasantrifüj-filtrasyon yöntemine göre daha büyük olduğu görülmüştür. Yine çalışmanın sürekliliği ve konsantrasyon açısından değerlendirildiğinde ultrasantrifüj yönteminin hem maliyet hem de eksozom konsantrasyonu açısından kullanıma daha uygun olduğu düşünülmektedir. Presipitasyon yönteminde ise her iki metoda göre daha büyük boyutta olan eksozom izolasyonu yapılmış ve zeta potansiyelleri de kararlılık açısından uygun olduğu görülmüştür. Ayrıca bu yöntemin daha kısa sürede daha az çaba gerektiren yöntem olduğu da açıktır. Her üç metot için izolasyon sonuçlarına bakıldığında uygun boyut aralıklarında izolasyon yapıldığı ve zeta potansiyelleri açısından anlamlı olduğu görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada, nanopartikül izleme analizi kullanılarak en etkili şekilde üç metodun karşılaştırması yapılmış SEM analizi ile desteklenmiştir. Ayrıca çalışmada elde edilen eksozomların ve çalışma ortamı kararlılığı yani zeta potansiyeli ile de doğrulanmıştır.

SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda; hücreler arası iletişimde görev alan, kan-beyin bariyerini geçebilen eksozomların terapetik etkisini değerlendirmek veya çalışmanın amacına göre kullanmak istenildiğinde hangi metot ile izolasyonunun yapılacağına karar verilmesi açısından gelecekteki araştırmalara yardımcı olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında; laboratuvar olanak ve elverişli çalışma ortamı sunan, Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Çıkar Çatışması

Yazar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

KAYNAKLAR

- Beeravolu, N., McKee, C., Alamri, A., Mikhael, S., Brown, C., Perez-Cruet, M., & Chaudhry, G. R. (2017). Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *Journal of Visualized Experiments*, 3(122). <https://doi.org/10.3791/55224-v>
- Bongso, A., & Fong, C.-Y. (2012). The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the wharton's jelly of a the human umbilical cord. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(2), 226–240. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9418-z>
- Brydson, R., Brown, A., Hodges, C., Abellan, P., & Hondow, N. (2015). Microscopy of nanoparticulate dispersions. *Journal of Microscopy*, 260(3), 238–247. <https://doi.org/10.1111/jmi.12290>
- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., & Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
- Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., & Mathivanan, S. (2014). Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic? *Proteomics*, 15(2–3), 260–271. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400234>
- Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J., & Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.009>
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Mišják, P., Aradi, B., & Buzas, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(16), 2667–2688. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>

- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *Journal of Cell Biology*, 97(2), 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Hassan, G., Kasem, I., Soukkarieh, C., & Aljamali, M. (2017). A simple method to isolate and expand human umbilical cord derived mesenchymal stem cells: Using explant method and umbilical cord blood serum. *International Journal of Stem Cells*, 10(2), 184–192. <https://doi.org/10.15283/ijsc17028>
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412–9420. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48095-7)
- Karaöz, E., Çetinalp Demircan, P., Erman, G., Güngörürler, E., & Eker Sarıboyacı, A. (2016). Comparative Analyses of Immune -Suppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly and Adipose-Tissue Derived Human MSCs. *Turkish Journal of Hematology*, 34(3). <https://doi.org/10.4274/tjh.2016.0171>
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., ... Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1285>
- Murk, J.L., Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., & Geuze, H. J. (2002). The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(4), 303–311. <https://doi.org/10.1016/s1084952102000605>
- Pirjali, T., Azarpira, N., Ayatollahi, M., Aghdaie, M.H., Geramizadeh, B., & Talai, T., (2013). Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord Wharton's jelly and amniotic membrane *Int. J. Org. Transplant. Med.* 4 (3) 111 – 116.
- Rasmussen, M. K., Pedersen, J. N., & Marie, R. (2020). Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15889-3>
- Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L., & Mathivanan, S. (2009). Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Review of Proteomics*, 6(3), 267–283. <https://doi.org/10.1586/epr.09.17>
- Sun, D., Zhuang, X., Grizzle, W., Miller, D., & Zhang, H.-G. (2011). Abstract 4446: A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Cancer Research*, 71(8_Supplement), 4446–4446. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2011-4446>
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Thery, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Tofino-Vian, M., Guillén, M. I., Pérez del Caz, M. D., Castejón, M. A., & Alcaraz, M. J. (2017). Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells downregulate senescence features in osteoarthritic osteoblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/7197598>
- Troyer, D. L., & Weiss, M. L. (2007). Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26(3), 591–599. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0439>
- Vergauwen, G., Dhondt, B., Van Deun, J., De Smedt, E., Berx, G., Timmerman, E., & Hendrix, A. (2017). Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02599-y>
- Vidal, M., Sainte-Marie, J., Philippot, J. R., & Bienvenue, A. (1989). Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: Evidence precluding a role for? aminophospholipid translocase? *Journal of Cellular Physiology*, 140(3), 455–462. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041400308>
- Widowati, W., Wijaya, L., Bachtiar, I., Gunanegara, R. F., Sugeng, S. U., Irawan, Y. A., & Widodo, A.M. (2014). Effect of oxygen tension on proliferation and characteristics of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.bgm.2014.02.001>
- Yusoff, Z., Maqbool, M., George, E., Hassan, R.M.D & Ramasamy, R. (2016). Generation and characterisation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells by explant method *Medical Journal of Malaysia*, 71 (3) 105-110.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>