



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TİCAGRELOR İLE MUAMELE EDİLEN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN EKSOZOMLARIN
HÜCRE GÖÇÜ VE YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİ**

Ezgi GÖKSOY

**KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİCAGRELOR İLE MUAMELE EDİLEN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN
EKSOZOMLARIN HÜCRE GÖÇÜ VE YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Ezgi GÖKSOY

**KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21H0216002 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2022**

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ticagrelor ile muamele edilen mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların hücre göçü ve yara iyileşmesi üzerindeki etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda
Ezgi GÖKSOY tarafından hazırlanan
“Ticagrelor ile muamele edilen mezenkimal kök hücrelerden elde edilen
eksozomların hücre göçü ve yara iyileşmesi üzerindeki etkisi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/04/2022

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Hücreler	1
1.1.1. Embriyonik Kök Hücreler	4
1.1.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler	5
1.1.3. Erişkin Kök Hücreler	5
1.1.3.1. Mezenkimal Kök Hücreler	6
1.2. Kök Hücrelerin Uygulama Alanları	8
1.3. Kök Hücre Kaderi	9
1.3.1. Kök Hücre Kaderini Belirleyen Genetik Faktörler	10
1.3.1.1. Transkripsiyon Faktörleri	11
1.3.1.2. Hücresel Stres ve Otofaji Genleri	11
1.3.2. Kök Hücre Kaderini Belirleyen Epigenetik Faktörler	15
1.3.2.1. MikroRNA'lar	15
1.3.3. Kök Hücre Kaderini Belirleyen Çevresel Faktörler	18

1.3.3.1. Hücresel Sinyaller	19
1.3.3.1.1. Parakrin Sinyaller	20
1.3.3.1.2. Otokrin Sinyaller	21
1.3.3.1.3. Jukstakrin Sinyaller	21
1.3.3.1.4. Endokrin Sinyaller	22
1.3.3.1.5. Sinaptik Sinyaller	22
1.4. Eksozomlar	23
1.5. Ticagrelor	25
1.6. Hedefler	26
1.7. Özgünlük	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Gereçler	30
2.2. Yöntem	30
2.2.1. Hücre Kültürü	30
2.2.2. Hücre İçi Oksidatif Stres (ROS) Ölçümü	31
2.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaştırılması ve Oil Red O Boyası ile Boyanması	32
2.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaştırılması ve Alizarin Red S Boyası ile Boyanması	33
2.2.5. Eksozom İzolasyonu	34
2.2.6. Micro BCA ile Eksozom Kantifikasyonu	35
2.2.7. Akım Sitometri ile Eksozom Karakterizasyonu	37
2.2.8. Elektron Mikroskobu (CTEM) ile Eksozomların Görüntülenmesi	37
2.2.9. Konfokal Mikroskopisi ile Hücre İçindeki Eksozomların Görüntülenmesi	38
2.2.10. Matrijel ile İnvazyon Testi (Hücre Göçü)	39
2.2.11. Çizik Testi (Yara İyileşmesi)	40

2.2.12. Total RNA İzolasyonu	41
2.2.13. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile miRNA İfadesi Ölçümü	42
2.2.14. Ticagrelor Uygulanan MKH'lerin Gen İfadelerindeki Değişimin Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile İncelenmesi	44
2.2.15. Eksozom Uygulanan Endotel Hücrelerin Gen İfadelerindeki Değişimin Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile İncelenmesi	46
2.2.16. İstatistiksel Analiz	47
3. BULGULAR	48
3.1. Hücre İçi Oksidatif Stres (ROS) Ölçümü	48
3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaştırılması ve Oil Red O Boyası ile Boyanması	51
3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaştırılması ve Alizarin Red S Boyası ile Boyanması	52
3.4. Micro BCA ile Eksozom Kantifikasyonu	53
3.5. Akım Sitometri ile Eksozom Karakterizasyonu	54
3.6. Elektron Mikroskobu (CTEM) ile Eksozomların Görüntülenmesi	55
3.7. Konfokal Mikroskopi ile Hücre İçindeki Eksozomların Görüntülenmesi	55
3.8. Matrijel ile İnvazyon Testi (Hücre Göçü)	57
3.9. Çizik Testi (Yara İyileşmesi)	59
3.10. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile miRNA İfadesi Ölçümü	61
3.11. Ticagrelor Uygulanan MKH'lerin Gen İfadelerindeki Değişimin Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile İncelenmesi	62
3.12. Eksozom Uygulanan Endotel Hücrelerin Gen İfadelerindeki Değişimin Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile İncelenmesi	64
4. TARTIŞMA	66
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	71

ÖZET	73
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	75
EKLER	83
Ek-1: Standart Solüsyonlar ve Tampon Çözeltiler	83
Ek-2: Kullanılan Hücre Hatları ve Genel Özellikleri	85
Ek-3: Akım Sitometri Sonuç Raporları	86
Ek-4: Total RNA İzolasyonu Sonuçları	92
ÖZGEÇMİŞ	93

ÖNSÖZ

İlk olarak, danışman hocam Prof. Dr. Kâmil Can Akçalı'ya, tez sürecim boyunca hem akademik açıdan her türlü soruma yanıt bulduğu ve bilgi birikimiyle yolumu aydınlattığı için, hem de yüksek lisans sürecim boyunca yaşadığım her türlü problemde kendisine danışabileceğimi bilmenin güvenini daima hissettirdiği ve desteğini bir an olsun esirgemediği için teşekkür ederim.

Dr. Öğretim Görevlisi Ceylan Verda Bitirim'e daimî desteği, sabrı, tecrübelerini paylaşmayı bir an olsun esirgememesi ve harika bir rol model olması sebebiyle sonsuz teşekkür ederim.

Akçalı Grup'un diğer üyeleri, Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü'nün tüm öğrencileri ve COVID-19 projesi sırasında, aslında bütün dünyayla birlikte çok zor dönemler geçirirken tanışma fırsatı bulduğum ve bana adeta kader yoldaşı olduklarını söyleyebileceğim geleceğin bilim insanlarına, yani değerli çalışma arkadaşlarıma da birer teşekkürü borç bilirim.

Son olarak, geleceğim için attığım her adımda bana desteklerini daima arkamda hissettiğim, eğitimci bir ailede büyümenin ayrıcalığını ve sorumluluğunu bana her zaman hissettiren, sevgi ve anlayışla yanımda olan, başta annem Uzman Öğretmen Canan Göksoy ve babam Prof. Dr. Cüneyt Göksoy olmak üzere tüm aileme de her şey için teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
AC	Adenilsiklaz
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
BCA	Bicinchoninic asit
BGG	Bovine Gamma Globulin
BiP	Bağlayıcı İmmünoglobulin Proteini
bp	Baz Çifti
BSA	Bovine Serum Albümin
cAMP	Halkasal Adenosin Monofosfat
CD	Cluster of Differentiation (Başkalaşım Kümesi)
cDNA	Komplementer DNA
CLSM	Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu
CTEM	Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu
CVD	Kardiyovasküler Hastalıklar
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCFDA	Chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
ddH ₂ O	Çift distile su
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ENT1	Equilibrative Nucleoside Transporter 1

ER	Endoplazmik Retikulum
ERp60	Endoplazmik Retikulum'a yerleşik protein 60
ESM	Ekstrasellüler Matriks
EtBr	Etidyum Bromür
EV	Hücre Dışı Kesecik
FBS	Fetal Sığır Serumı
GA	Gluteraldehid
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GPCR	G Protein-Bağlı Reseptör
GRP	Glikozla Düzenlenen Protein
GVHD	Graft Versus Host Hastalığı
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H9C2	Sıçan Kalp Miyoblast Hücresi
HLA	İnsan Lökosit Antijen
HKH	Hematopoietik Kök Hücre
HSPA5	Heat Shock Protein Family A Member 5
HUVEC	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi
IgG	İmmünoglobulin G
kDa	Kilo Dalton
Kİ	Kemik İliği
miRNA	MikroRNA
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
ncRNA	Küçük Kodlamayan RNA
nM	Nanomolar
P2RY12	Pürinerjik Reseptör P2Y12
PBS	Fosfat Salın Tamponu
PFA	Paraformaldehit
PS	Penisilin-Streptomisin
RNA	Ribonükleik Asit

ROS	Reaktif Oksijen T�rleri
RPM	Dakikadaki D�n�� Sayısı
RT-qPCR	Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
siRNA	Kısa Enterferans Yapan RNA
snoRNA	K���k N�kleolar RNA
UA	Uranil Asetat
UPKH	Uyarılmı� Pluripotent K�k H�cre
UPR	Katlanmamı� Protein Yanıtı



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Asimetrik ve simetrik hücre bölünmesi modelleri	2
Şekil 1.2. Kök hücrelerin yaygın elde kaynakları	3
Şekil 1.3. Mezenkimal kök hücre kaynakları	7
Şekil 1.4. Kök hücre nişinde yer alan bir kök hücrenin dış veya iç etmenler sonucu izleyebileceği hücreyel yolaklar sonucu olası kaderleri	9
Şekil 1.5. Kök hücrelerin farklılaşma hiyerarşisi ve tümör oluşumuyla ilgili genetik ve epigenetik faktörler	10
Şekil 1.6. Diyabetik kardiyomiyopati ile ilişkili incelenen miRNA'lar tarafından düzenlenen biyolojik süreçlerin gen ontolojik doğrulanması	17
Şekil 1.7. Parakrin sinyal iletimi	20
Şekil 1.8. Otokrin sinyal iletimi	21
Şekil 1.9. Endokrin sinyal iletimi	22
Şekil 1.10. Sinaptik sinyal iletimi	23
Şekil 1.11. Eksozom üretimi ve içeriğinin şematik gösterimi	24
Şekil 1.12. Ticagrelorun kimyasal yapısı	25
Şekil 2.1. Pierce BCA Protein Assay Kit Prosedürü kullanılarak standart örnekler BSA ve BGG için tipik abdorbars eğrileri	36
Şekil 2.2. Bilinmeyen örnekler için oluşturulacak standart absorbars-konsantrasyon eğrisi	36
Şekil 3.1. (a) Ticagrelor uygulanmamış kontrol grubu mezenkimal kök hücrelerden (b) Ticagrelor uygulamış mezenkimal kök hücrelerden alınan floresan görüntüsü ve akut H ₂ O ₂ muamelesini takiben bu hücrelerden alınan ortalama floresan sinyal yoğunluğunun zamana bağlı değişim grafiği	49

Şekil 3.2. 10^{-8} M ve 10^{-6} M ticagrelor ile muamele edilmiş mezenkimal kök hücrelerden t=1, t=3, t=6, t=24 ve t=48 saatlerinde alınan hücre içi ROS ölçümü sonuçları	50
Şekil 3.3. Kontrol (ticagrelorsuz) ve Ticagrelorlu Mezenkimal Kök Hücrelerin 21 gün boyunca adipojenik farklılaştırma prosedürü sonrası Oil Red O boyası ile muamele edilerek alınan ışık mikroskobu görüntüleri	51
Şekil 3.4. Kontrol (ticagrelorsuz) ve Ticagrelorlu Mezenkimal Kök Hücrelerin 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırma prosedürü sonrası Alizarin Red S boyası ile muamele edilerek alınan ışık mikroskobu görüntüleri	52
Şekil 3.5. BCA Protein Assay Kit Prosedürü kullanılarak BSA standardı için oluşturulmuş absorbans – protein konsantrasyonu eğrisi	53
Şekil 3.6. (a) Kontrol (ticagrelorsuz) ve (b) Tica (ticagrelorlu) eksozomlar için akım sitometri sonuçları	54
Şekil 3.7. (a) Kontrol (ticagrelorsuz) ve (b) Tica (ticagrelorlu) eksozomlar için representatif elektron mikroskobu görüntüleri	55
Şekil 3.8. (a) HUVEC ve (b) H9C2 hücreleri Dil boyası ile işaretlenmiş eksozomlar ile muamele edildikten sonra alınmış CLSM görüntüleri	56
Şekil 3.9. 72 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda eksozom ile muamele edilen ve gözenekli membrandan geçen H9C2 hücrelerinin Gimsa boyasıyla boyanarak alınan 20x ve 40x büyütme representatif mikroskop görüntüleri	58
Şekil 3.10. 1 $\mu\text{g/mL}$ ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda eksozomlarla muamele edilen ve edilmeyen H9C2 hücrelerine yapılan invazyon testinden 72 saat sonrası için hücre göçü miktarları	59
Şekil 3.11. Çizik testinin başlangıç anı ile 24. ve 48. saatlerde yara bölgesindeki HUVEC hücreleri	60
Şekil 3.12. HUVEC hücrelerine yapılan çizik testinden 48 saat sonrası için (a) yara bölgesindeki kapanma ve (b) hücre göçü miktarları	60

Şekil 3.13. Ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH’lerdeki miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499 ifadeleri	62
Şekil 3.14. Ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH’lerdeki Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78 genlerinin ifadeleri	63
Şekil 3.15. Eksozom ile muamele edilmiş ve edilmemiş HUVEC’lerdeki Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78 genlerinin ifadeleri	64



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve besiyerleri	31
Çizelge 2.2. miRNA-qRT-PCR prosedüründe kullanılan stem-loop primer sekansları	43
Çizelge 2.3. miRNA-qRT-PCR prosedüründe kullanılan forward ve reverse primer sekansları	44
Çizelge 2.4. qRT-PCR prosedüründe kullanılan forward ve reverse primer sekansları	46
Çizelge 2.5. qRT-PCR reaksiyonu koşulları	46
Çizelge 3.1. Mikro BCA ile tayin edilen eksozom konsantrasyonları	53

1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücreler

Kök Hücreler

- çoğalma,
- kendini yinleme ve idame ettirme,
- farklılaşmış dokulara özgü hücreleri oluşturabilme,
- hasarlanmış dokuyu tamir edebilme

yeteneklerine sahip hücrelerdir.

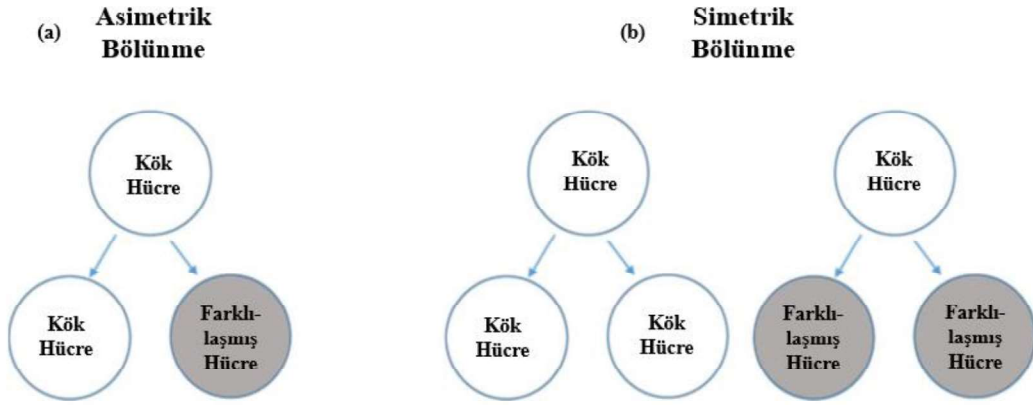
Kök hücre araştırmalarının kökeni, 1960'larda Dr. James Till ve Dr. Ernest McCulloch tarafından fare kemik iliğinde yer alan hematopoietik kök hücrelerin keşfine kadar uzanmaktadır. Becker ve arkadaşları (1963), bu hücrelerin klonal doğaya sahip, yani çoğalarak koloni oluşturmaya meyilli olduklarını saptamış ve diğer vücut hücrelerinden ayırmışlardır.

Kök hücreler, vücuttaki uygun sinyallere yanıt olarak kendini yenileme veya çeşitli hücre tiplerine farklılaşma gibi benzersiz bir yeteneğe sahiptir. Bu özellikler, kök hücrelere doku onarımı ve yenilenmesi için imkân sağlamaktadır. Bu özellikleri nedeniyle kök hücreler, rejeneratif tıp ve olası yeni nesil kök hücre tedavileri için değerli araştırma araçları haline gelmiştir.

Kök hücrenin bir diğer tanımlayıcı özelliği köklülük (stemness) ise, bir kök hücre ve bir farklılaşmış hücre oluşturmak için kök hücrelerin asimetric bölünebilmesidir. Kök hücreler asimetric veya simetric olarak bölünebilirler. Hücre bölünme modelleri Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Hiew ve ark., 2017). Simetric bölünme modelinde, bir kök hücre iki farklılaşmış hücre veya iki kök hücre üretir, bu da embriyonik gelişim ve

doku onarımı gibi hücre popülasyonunda hızlı artışın gerekli olduğu durumlarda kök hücre üretiminin temel mekanizmasını oluşturmaktadır (Shahriyari ve Komarova, 2013). Asimetrik model, her kök hücrenin kendisinin bir kopyası ve bir farklılaşmış hücre ürettiğini, böylece kök hücre havuzunun homeostatik kontrolünün de sağlandığını açıklamaktadır (Fuchs ve ark., 2004; Ho, 2005; Zhong ve Chia, 2008).

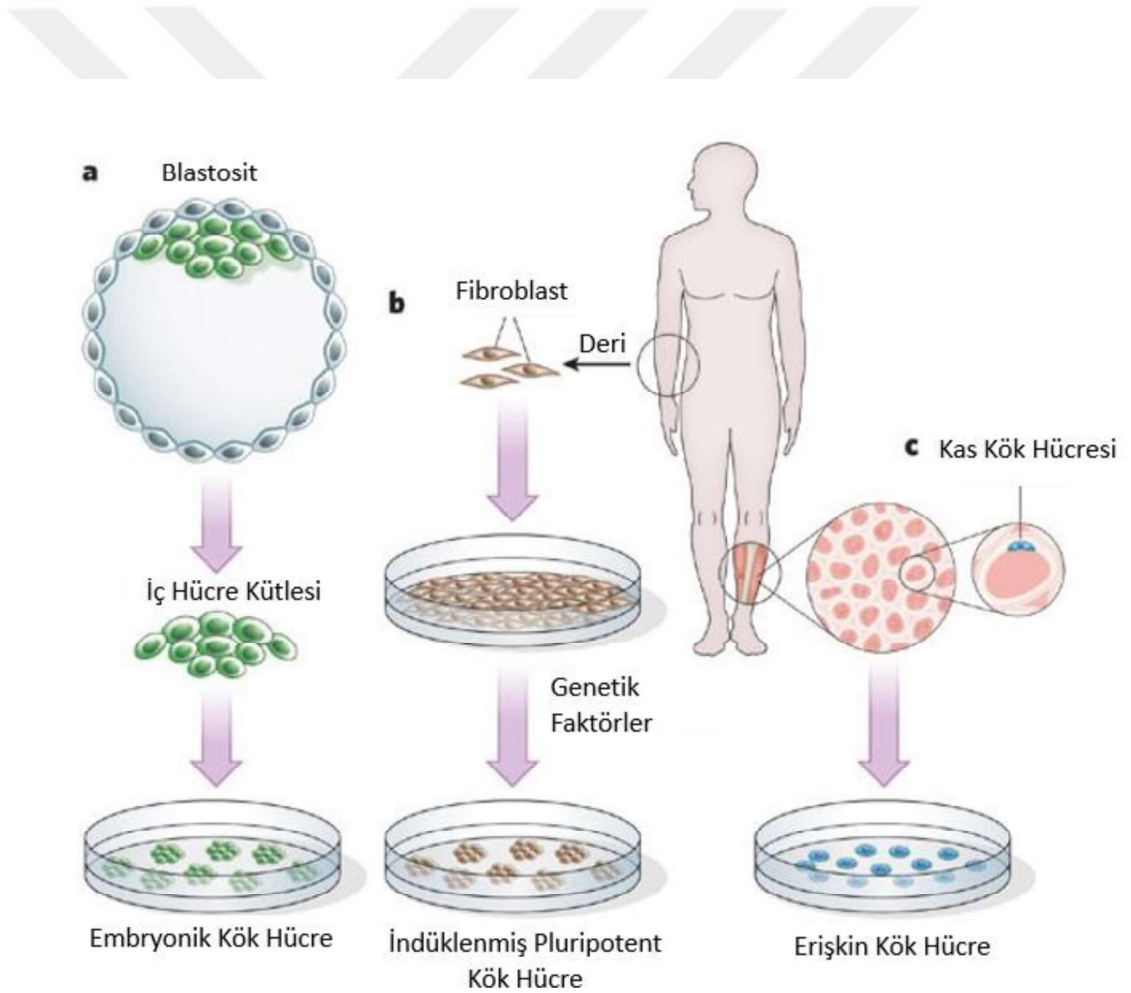
Geleneksel olarak, kök hücrelerin merkezi bir karakteristiğinin asimetrik olarak bölünme kabiliyetleri olduğu düşünülmektedir. Ancak son gelişmeler, simetrik kök hücre bölünmesinin de yetişkin memeli homeostazında önemli rol oynadığına dair geniş kanıtlar sağlamıştır. İki tür hücre bölünmesinin, kök hücrelere gerektiğinde popülasyonlarını artırma esnekliği sağlamaları bakımından farklı olduğu anlaşılmaktadır (Shahriyari ve Komarova, 2013). Uygun sayıda kök hücre ve farklılaşmış yavru hücre üretmek için bu iki model arasındaki denge, gelişimsel ve çevresel sinyallerle kontrol edilir.



Şekil 1.1. Asimetrik ve simetrik hücre bölünmesi modelleri. (a) Asimetrik bölünme modelinde, bir kök hücre, bir farklılaşmış hücre ve bir kök hücre üretir. (b) Simetrik bölünme modelinde ise, bir kök hücre iki farklılaşmış hücre veya iki kök hücre üretir (Hiew ve arkadaşlarından uyarlanmıştır, 2017).

Potens (yetkinlik, kudret), kök hücrelerin özel hücre tiplerine farklılaşma yeteneğini ifade eden özellikleridir. Bir kök hücre, ne kadar çeşitli hücre tiplerine dönüşebiliyorsa, potensi o derece yüksektir. Potens, bir hücrenin gen aktivasyonu potansiyeli olarak da ifade edilebilir (Chai ve Leong, 2007). Yetkinlik, azdan çoğa, unipotens, oligopotens, multipotens, pluripotens ve en fazla dönüşüm kapasitesine sahip hücreleri tanımlayan totipotens şeklinde sıralanır.

Kök hücreler potensleri haricinde, elde edildikleri kaynaklara göre de sınıflandırılabilir. Kök hücrelerin yaygın elde kaynakları Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Kök hücrelerin yaygın elde kaynakları. (a) Pluripotent kök hücre kaynakları olarak embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler. (b) Multipotent kök hücre kaynağı olarak yetişkin dokusu. (c) Kök hücrelerin farklı hücre soylarına farklılaşması (Lutolf ve arkadaşlarından uyarlanmıştır, 2009).

4-5 günlük memeli blastosistindeki iç hücre kitlesinden elde edilen özel pluripotent hücreler olan embriyonik kök hücreler, yetişkin somatik hücrelerden yeniden programlama yoluyla elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücreler (UPKH), mezenkimal ve hematopoietik kaynaklı yetişkin kök hücreler ve sinir, karaciğer, retina, dental pulpa, saç folikülü gibi dokulara özgü diğer kök/progenitör (öncü) hücreler de bilinen kök hücre kaynaklarındandır.

Kaynakları ne olursa olsun tüm kök hücrelerin üç genel özelliği vardır; uzun zaman periyotları boyunca bölünebilme ve kendini yenileme yeteneğine sahiptirler, farklılaşmamışlardır ve özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler.

Bu bilgiler ışığında kök hücrelerin tedavi edici özelliklerinden yararlanılmaya başlanmıştır. Kök hücre araştırmalarındaki ilerlemeler, konvansiyonel ilaç tedavilerine yanıt vermeyen hastalıklar için alternatif tedaviler sunmuştur. Kendini yenileme ve diğer hücre türlerine farklılaşma potansiyelleri sayesinde kök hücreler, rejeneratif tıbbın temelini teşkil etmektedirler (Mahla, 2016).

1.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler, tüm germ katmanlarının (endoderm, ektoderm ve mezoderm) hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip kök hücreler olarak tanımlanmaktadır. Pluripotent kök hücreler, embriyonik gelişimin doğal seyrinde veya belirli laboratuvar koşullarında tüm hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir.

İnsan pluripotent kök hücrelerinin bilinen kaynakları, erken insan embriyolarından izole edilen ve kültürlenmiş embriyonik kök hücreler (EKH) ve uyarılmış pluripotent kök hücreler(UPKH)'dir.

EKH'ler, blastosistin iç hücre kütesinden, yaklaşık olarak döllenmenin 5. gününden sonra elde edilmektedirler. İnsan embriyonik kök hücreleri 1998 yılında izole edilmiş ve hücre hattı oluşturulmuştur (Thomson ve ark., 1998). EKH'ler,

yalnızca doku hasarı veya hücre ölümü sırasında bölünen yetişkin kök hücrelerin aksine, in-vivo süresiz olarak bölünme yeteneğine sahiptir. Kök hücre kaynağı olarak geniş uygulama alanına rağmen, embriyonik kök hücrelerin elde prosedürü embriyonun yok edilmesini içerdiğinden, EKH kullanımı etik sorunlar doğurmaktadır.

1.1.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Shinya Yamanaka ve Kazutoshi Takahashi 2006 yılında ilk kez fare fibroblastlarında, matür somatik bir hücrenin pluripotensi faktörleri ile yeniden programlanarak pluripotent kök hücre özelliği kazandığını göstermişler ve bu yeni hücre türünü “Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre” (UPKH) olarak isimlendirmişlerdir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). 2007 yılında ise insan deri fibroblastlarından UPKH elde ettiklerini rapor etmişlerdir (Takahashi ve ark., 2007).

Günümüzde in vitro şartlarda elde edilmekte olan UPK hücreleri etik bir soruna yol açmadığı için dünyada sayısız laboratuvarlarda embriyonik hücre eşdeğeri olarak kolaylıkla kullanılmaktadır ve pluripotent kök hücre kullanımıyla mümkün olabilecek pek çok çalışmanın önü böylelikle açılmıştır.

1.1.3. Erişkin Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler somatik kök hücreler olarak da bilinirler ve vücutta bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Ölen hücreleri yenilemek ve hasarlı dokuları yeniden oluşturmak için bölünürler. Multipotent (soy kısıtlı) veya daha düşük farklılaşma kapasitesine sahip kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelerin aksine, araştırma ve tedavide yetişkin kök hücrelerin kullanımı etik sorun doğurmamaktadır, çünkü yetişkin kök hücrelerin üretimi canlının imha edilmesini gerektirmez.

Yetişkin kök hücreler genellikle progenitör veya öncü hücreler oluşturmak üzere bölünürler, bunlar daha sonra farklılaşır veya karakteristik şekillere ve özel işlevlere

sahip "olgun" hücre tiplerine dönüşürler. Yetişkin organizmalarda kök hücre sayısı yaşla ters orantılı değişiklik göstermektedir (Karlsson ve ark., 2012).

Yetişkin kök hücreler nadirdir; genellikle belirlenmeleri, izole edilmeleri ve saflaştırılmaları zordur. Transplantasyon için yeterli sayıda hücre yoktur ve yetişkin kök hücreler kültürde limitsiz olarak çoğaltılamamaktadır. Mezenkimal kök hücreler (MKH), hematopoietik kök hücreler (HKH), nöral kök hücreler ve intestinal kök hücreler gibi organlara özgü kök hücreler multipotent erişkin kök hücrelere örnek gösterilebilirler (Dulak ve ark., 2015).

1.1.3.1. Mezenkimal Kök Hücreler

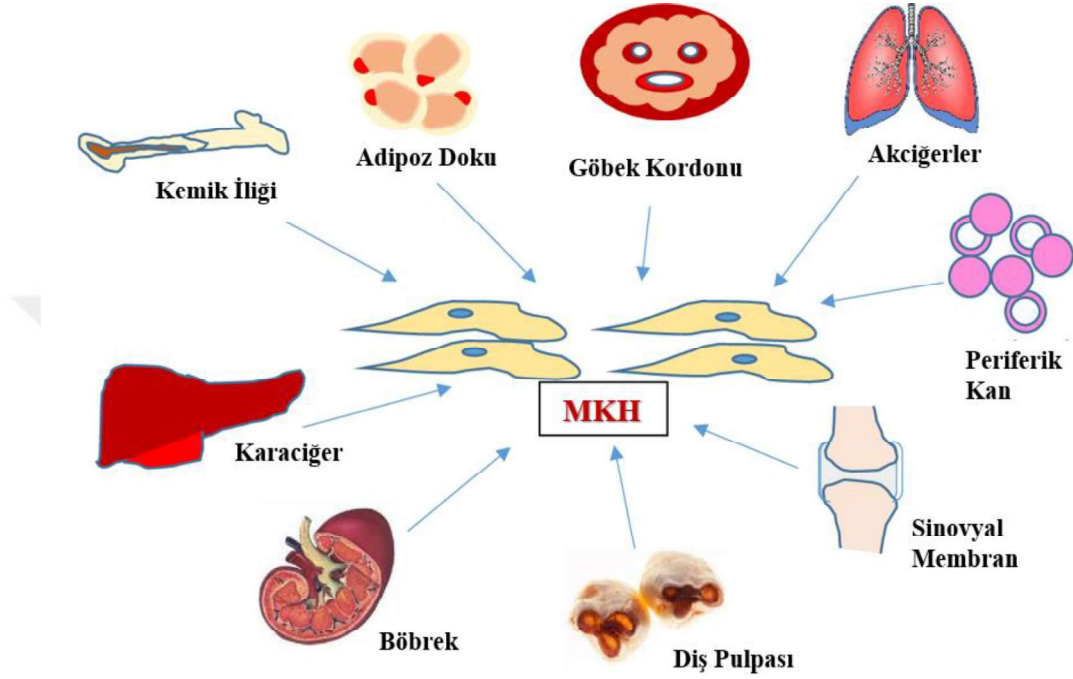
Bir multipotent erişkin kök hücre türü olan mezenkimal kök hücreler, mezodermden köken alırlar, hemen hemen tüm doku türlerinde bulunurlar ve farklı doku türlerine farklılaşma potansiyeline sahiplerdir. Kemik iliği, yağ dokusu, kalp, akciğerler, göbek kordonu, akciğerler, periferik kan, sinovial mermbran, diş pulpası, böbrekler ve karaciğer dahil olmak üzere çok çeşitli yetişkin dokularından elde edilebilirler (Hiew ve ark., 2017). Şekil 1.3'te mezenkimal kök hücre kaynakları gösterilmiştir. Otolog hücre kaynaklarının bolluğu, çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri, tümörijenite göstermemeleri ve immünmodulasyon yetenekleri sayesinde en çok çalışılan yetişkin kök hücre türüdür (Wei ve ark., 2013).

Mezenkimal Kök Hücreler ilk olarak 1974'te, Friedenstein ve arkadaşları tarafından kemik iliğinden izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Friedenstein ve ark., 1974). Bu hücreler, iğ şekline sahip, in-vitro ortamda fibroblast kolonileri oluşturan multipotent stromal öncü hücreler olarak tanımlanmışlardır.

MKH'lerin temel tanımlayıcı özellikleri 3 ana başlıkla incelenmektedir (Salem ve Thiernemann, 2010):

- In-vitro ve in-vivo olarak adiposit, kondrosit, osteosit, myoblast, kardiyomiyosit ve nöron gibi farklı hücre türlerine farklılaşma kapasitesi

- Standart kültür ortamında plastiğe yapışabilmesi
- Karakteristik hücre yüzey belirteçlerinin ifadesi (CD 90+, CD 45-, CD 34-, CD 105+, CD 73+, CD 14-, CD 11b-, CD 79-, CD 19-, HLA DR-, ...)



Şekil 1.3. Mezenkimal kök hücre kaynakları (Hiew ve arkadaşlarından uyarlanmıştır, 2017).

Farklı dokulardan elde edilmiş MKH'lerin proliferasyon, farklılaşma ve immün modülasyon kabiliyetlerinin farklı olduğu saptanmıştır. Örneğin; özellikle fetal membranlardan elde edilen MKH'lerin proliferasyon kapasitelerinin daha iyi olduğu ancak farklılaşma kapasitelerinin zayıf olduğu bulunmuştur. Ancak bu hücrelerin in vitro immün baskılayıcı etkilerinin kemik iliği ve kordon kanı hücrelerinden daha iyi olduğu gösterilmiştir (Karlsson ve ark., 2012; Ören, 2019).

Mezenkimal kök hücreler başta olmak üzere, kök hücrelerin klinikteki kullanım alanlarına; kan hastalıkları, nakil sonrası gelişen Graft Versus Host Hastalığı (GVHD), kanser tedavisi, miyokardiyal rejenerasyon, kardiyovasküler hastalıklar (CVD), ortopedik hastalıklar, omurilik hasarları, infertilite tedavisi, doku mühendisliği gibi pek çok yaygın kullanılan veya gelecek vadede uygulama örnek verilebilir.

1.2. Kök Hücrelerin Uygulama Alanları

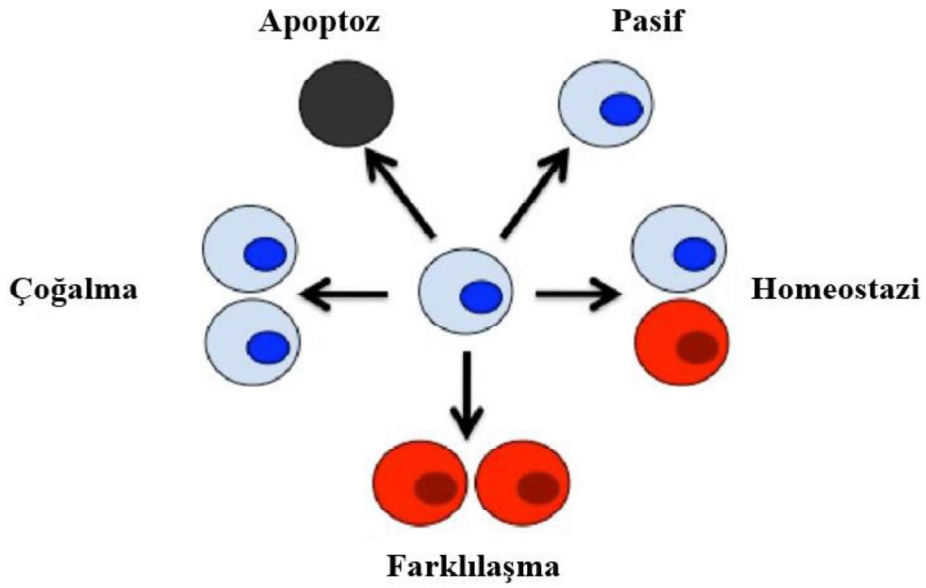
Kök hücreler; diyabet, kronik kalp hastalıkları, böbrek hastalıkları, karaciğer yetmezliği, multipl skleroz, Parkinson ve Alzheimer gibi otoimmün hastalıklar ve kanser gibi pek çok hastalık açısından umut vad edebilecek bir tedavi yöntemidir. Kök hücreler, vücuttaki belirli dokulara çeşitli mesajcıları veya genleri ulaştırmak için bir araç olarak halihazırda kullanılmaktadır. Kök hücre temelli tedaviler, kanser araştırmalarında yıllardır önemli bir çalışma alanıdır. Uzun yıllar boyunca, kan ve bağışıklık sistemi fonksiyonunun restorasyonu, kemoterapötik ajanlarla tedavi edilen kanser hastalarının bakımında bir bileşen olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise, araştırmalar, belirli kanserli hücreleri hedeflemek ve onları yok edecek veya değiştirecek tedavileri doğrudan uygulamak için kök hücrelerden yararlanma yöntemleri üzerinde sürmektedir (Can, 2014).

Embriyonik kök hücreler, embriyonik gelişimdeki temel olayları anlamak için anahtar araştırma araçlarıdır. Ayrıca doğum kusurlarının nedenlerini ortaya çıkarmak ve bunları düzeltmeye veya önlemeye yönelik yaklaşımları yönlendirmek açısından önem taşımaktadır. Gelişim biyolojisi ile kök hücre biyolojisinin kesişimde yer alan bir diğer önemli araştırma alanı da embriyonik gelişim sırasında kök hücrelerin özel hücre tiplerine dönüşmelerinde işlev gören büyüme faktörlerinin, genlerin ve moleküllerin anlaşılmasıdır.

İnsan kök hücrelerinin ve türevlerinin gelecekteki kullanım alanları, büyük olasılıkla aday terapötik ilaçların in vitro test edilmesini de içerecektir. Kök hücreler, ilaçların detoksifikasyonunu gözlemlemek için özel karaciğer hücreleri geliştirmek amacıyla kullanılabilir ve hastalarda olası yan etkileri önlemek için yeni bir sistemi temsil edecektir. Kök hücrelerin insan genom projesinden edinilen bilgilerle birleştirilmesinin de gelecekte pek çok faydası olacaktır.

1.3. Kök Hücre Kaderi

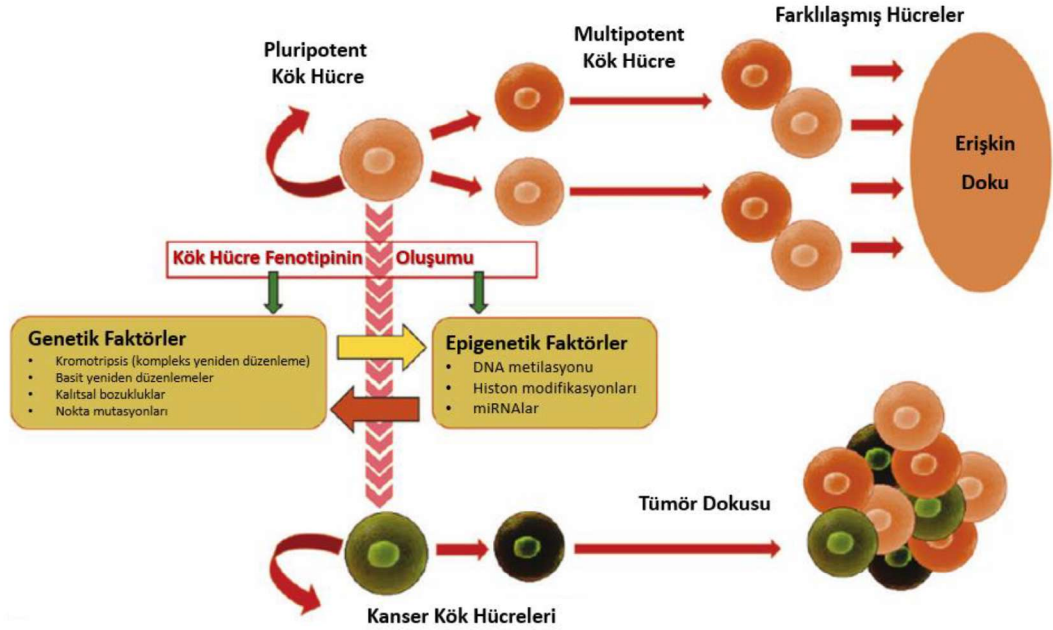
Bir hücrenin kaderi, söz konusu hücrenin veya yavru hücrelerinin gelecekteki kimliğini tanımlar. Bir kök hücrenin kaderi için şu temel olasılıklar mümkündür; kök hücre pasif (quiescent) kalabilir, kök hücre özelliğini sürdürerek kendini yenileyebilir veya kendini belli bir hücre türüne adayarak farklılaşabilir (Jiang ve Papoutsakis, 2013). Şekil 1.4'te bir kök hücrenin olası kaderleri gösterilmektedir. Bu olasılıkların tamamı hücre türüne özgü transkripsiyonel faktörlere ek olarak, epigenetik mekanizmalar ve çevresel faktörler tarafından yönlendirilmektedir (Plusa ve Hadjantonakis, 2018, s:6-10).



Şekil 1.4. Kök hücre nişinde yer alan bir kök hücrenin dış veya iç etmenler sonucu izleyebileceği hücresel yollar sonucu olası kaderleri (Volpe ve arkadaşlarından uyarlanmıştır, 2009).

1.3.1. Kök Hücre Kaderini Belirleyen Genetik Faktörler

Somatik kök hücreler, hücre bölünmesiyle çoğalan, ölen hücreleri yenilemek, hasarlı dokuları yeniden oluşturmak ve daha sonra dokuya özgü hücre tiplerine farklılaşmak üzere tüm vücutta yer alan farklılaşmamış hücrelerdir. Somatik kök hücreler, hücre/doku homeostazı için gerekli dinamik sistemi oluştururlar (Mahla, 2016). Gelişim, kök hücre kaynaklarının devamlılığı ve farklılaşma için birçok kromatin düzenleyici sistem gereklidir. Transkripsiyonel faktörlerin ve kromatin yeniden modelleme faktörlerinin kombinasyonu, kök hücre fenotipinin oluşumu için gereklidir (Şekil 1.5). Bu genetik mekanizmalara ek olarak, epigenetik mekanizmalar, genomun farklı bölgelerinin transkripsiyon seviyesini kontrol ederek veya kromatinin farklı bölgelerini açarak, genetik olarak özdeş hücrelerin farklı fenotiplere sahip olmalarına imkân sağlamaktadır (Rinaldi ve Benitah, 2014).



Şekil 1.5. Kök hücrelerin farklılaşma hiyerarşisi ve tümör oluşumuyla ilgili genetik ve epigenetik faktörler (Yang ve arkadaşlarından uyarlanmıştır, 2015).

1.3.1.1. Transkripsiyon Faktörleri

İnsan pluripotent kök hücre hatlarının farklılaşmalarında yanlılığa sahip oldukları bilinmektedir. Yanlılık, hücre hatlarının, bir germ tabakasına veya hücre tipine farklılaşma eğiliminin diğerlerine göre daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir (Keller ve ark., 2018). Kromozomal anomaliler, mitokondrial mutasyonlar, genetik ve epigenetik çeşitlilik bu durumun temel sebepleridir ve çok çeşitli fenotiplere yol açabilmektedirler.

Farklılaşma eğilimi, çok çeşitli genetik/epigenetik faktörlerden etkilenmektedir. Bu faktörler zaman zaman farklılaşma kapasitesinin kaybına, belirli hücre tiplerine yönelime ve çoğu zaman kanser benzeri fenotiplere yol açabilmektedir (Kusenda ve ark., 2006). Farklılaşma kapasitesindeki değişim ayrıca, farklılaşmamış pluripotent kök hücrelerin devamlılığında da etkilidir.

Bazı transkripsiyonel faktörler, hücrelerin farklılaşma faktörlerini baskılayarak EKH'lerin pluripotensi korumasına yardımcı olur. Bir pluripotens regülatörü NANOG, kök hücrelerin devamlılığında rol oynamaktadır ve kültürdeki hücrelerin farklılaşma eğilimini yönlendiren genlerden biri olarak kabul edilmektedir. Nanog'un EKH kimliğini oluşturmak için Oct-4 ve Sox2 gibi diğer faktörlerle uyum içinde çalıştığı düşünülmektedir (Draper ve ark., 2004; Mayshar ve ark., 2010). PU.1, Nfatc1, FoxO3, HIF1, Bmi1 gibi erişkin kök hücrelere özgü genler hücrelerin kendini yenilemesi ve pasif (quiescent) kalması hallerini yönetirken, Nanog, Oct-4, Sox2, Klf4, Tbx3 gibi EKH'lere özgü genler ise kök hücrelerin potensinin korunması ve proliferasyon üzerinde etkiye sahiptir (Braganca, 2015).

1.3.1.2. Hücresel Stres ve Otofaji Genleri

Oksidatif stres, hücre içinde reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlikten kaynaklı ortaya çıkmaktadır.

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanarak enerjiye dönüştüğü esnada meydana gelen moleküllerdir. Oksijen yaşam için vazgeçilmezdir; ancak metabolik işlemler sırasında bazı oksidan ara ürünler oluşur ve reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak adlandırılan bu moleküller lipit, protein ve DNA gibi temel hücre bileşenlerine zarar vermektedir.

UV ışınları, ilaçlar, bağışıklık sistemi reaksiyonları, radyasyon, kronik inflamasyonlar, aşırı fiziksel egzersiz, yaşlanma, stres, sigara, alkol gibi pek çok nedenle serbest radikaller oluşabilir. Oluşan serbest radikaller;

- damar sertleşmesi
- kalp hastalıkları
- kanser
- beynin kan dolaşımının azalmasına bağlı hastalıklar
- sinir sistemi hastalıkları
- diyabet
- böbrek yetmezliği

gibi yaşlanmaya bağlı doku bozukluklarının da içinde yer aldığı çok sayıda rahatsızlığa zemin hazırlar (Bicim ve ark., 2013).

Kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma mekanizmalarının düzenlenmesi, erken gelişim ve doku homeostazı açısından çok önemlidir. Son çalışmalar, hücrenin kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki dengenin, hücresel oksidasyon-redüksiyon (redoks) mekanizmaları tarafından düzenlendiğini göstermektedir (Lee ve ark., 2018). Bu nedenle, rejeneratif tıpta ROS kontrolü ve hücresel stres azaltma çalışmaları kapsamında çeşitli genlerin aşağı ve yukarı düzenlenmeleri, klinik uygulamalar için önem kazanmaya başlamıştır.

Otofaji, yeni ve daha sağlıklı hücreler elde etmek için vücudun hasarlı hücreleri temizleme yoludur. Yanlış katlanmış proteinlerin yıkımında, hasarlı organellerin temizlenmesinde ve hücre içi patojenlerin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır (Glick ve ark., 2010). Apoptoz ise, programlanmış hücre ölümünün ana

tiplerinden biridir. Çoğu hücrede bulunan intihar programının en önemli amacı, hücresel stres kaynaklı olarak onarılması imkânsız zarar gören, vücutta artık ihtiyaç duyulmayan veya anormalleşmiş hücrelerden kurtulmaktır (Kumar ve ark., 2015). Böylece ileride ortaya çıkabilecek komplikasyonlar önlenmektedir.

Beclin-1, insanlarda BECN1 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Liang ve ark., 1998). Bu protein, hem otofajinin hem de hücre ölümünün düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan BCL-2 veya PI3k sınıf III ile etkileşime girerek programlanmış hücre ölümünde rol oynayan tümörjenez ve nörodejenerasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Zhong ve ark., 2009).

Bcl-2, insanlarda Bnip3 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bnip3, apoptotik Bcl-2 protein ailesinin bir üyesidir. Hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olurken, aynı zamanda hücre ölümünü de indükleyebilmektedir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin çoğu gibi, Bnip3 de, zarın içinde homo ve hetero-oligomerler oluşturarak dış mitokondriyal zarın geçirgenlik durumunu modüle etmektedir (Sassone ve ark., 2010). Bnip3 ifadesindeki artış, mitokondriyal potansiyelde azalmaya, reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa ve sonuçta otofajiye neden olmaktadır. qPCR ile ölçülen Bnip3 ekspresyonunun değişimi, malin transformasyonun ve kanserin önemli bir bulgusu olan hücre ölümüne karşı direncin göstergeleri arasındadır (Menyhárt ve ark., 2016).

Endoplazmik Retikulum'a (ER) yerleşik protein 60 (ERp60) olarak da bilinen Calreticulin, insanlarda CALR geni tarafından kodlanan bir proteindir. Calreticulin, yanlış katlanmış proteinlere bağlanır ve bu proteinlerin ER'dan Golgi aygıtına aktarılmasını engeller (McCauliffe ve ark., 1990). Transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalar, Calreticulin'in gelişim sırasında zaruri olan bir kardiyak embriyonik gen olduğunu ortaya koymuştur (Michalak ve ark., 2002). Calreticulin çekirdekte de bulunmaktadır, bu da transkripsiyonal düzenlemelerde de rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca birçok kanser hücresinde eksprese edilmekte olan Calreticulin, makrofajların tümör hücrelerini sindirmesini de regüle etmektedir (Chao ve ark., 2010).

Dengeleyici nükleosit taşıyıcı 1 (Equilibrative Nucleoside Transporter – ENT-1), SLC29A1 geni tarafından kodlanan ve insanlarda kırmızı kan hücresi yüzeylerinde eksprese edilen bir proteindir (Griffiths ve ark., 1997). Nükleozidlerin hücre içine alımına aracılık eden transmembran glikoproteini kodlayan ENT-1 geni, kendi içinde nükleozit sentez yolağı olmayan hücrelerde nükleotit üretimi için gereklidir. Ayrıca viral tedavilerde ve kemoterapide kullanılan sitotoksik nükleozidlerin hücreye alımı için de gereklidir (Lai ve ark., 2004). Bazı ilaçların, ENT-1 aktivitesini inhibe etmek yoluyla hücrenin adenosin alımını düşürdüğü, böylece ATP salınımını arttırdığı ve hücrelerin ROS seviyesini düşürerek oksidatif strese karşı koruyuculuğu olduğu gösterilmiştir (Olgar ve ark., 2020).

GRP78 veya (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5 - HSPA5) olarak da bilinen bağlayıcı immünoglobulin proteini (BiP), insanlarda HSPA5 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Escherichia Coli K12 hücreleri glikozsuz kaldığında, glikozla düzenlenen proteinler (GRP'ler) olarak adlandırılan birkaç proteinin sentezi belirgin şekilde artmaktadır. GRP78, ER'da proteinlerin katlanması ve birleştirilmesinde rol oynamaktadır (Hendershot ve ark., 1994).

GRP78, hem ER stres yanıtının hem de katlanmamış protein yanıtı (UPR: unfolded protein response) yolağının önemli bir düzenleyicisidir (Chapman ve ark., 1998; Okamura ve ark., 2000). GRP78 gen ifadesindeki artışın, ER stresinin neden olduğu kardiyak disfonksiyon ve kardiyomiyopati ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Roe ve Ren, 2013). GRP78'in ayrıca homosistein kaynaklı ER stresini hafifleterek, vasküler endotel hücrelerinin apoptozunu önlediği öne sürülmüştür (Ni ve Lee, 2007). Buna ek olarak, sıçan neonatal kardiyomiyositlerinde, GRP78'in aşırı ekspresyonunun, proteazom inhibisyonu aracılığıyla indüklenen kardiyomiyosit ölümünü ciddi oranda azalttığı gözlemlenmiştir (Fu ve ark., 2008).

1.3.2. Kök Hücre Kaderini Belirleyen Epigenetik Faktörler

Epigenetik, gen ekspresyonundaki çeşitli değişimlerin aracılık ettiği fenotipik değişiklikleri ifade etmektedir ve bu değişiklikler, DNA diziliminde bir değişikliğin sonucu olarak meydana gelmemektedir. Epigenetik düzenlemelerin 3 ana mekanizması; DNA metiltransferazların aracılık ettiği DNA metilasyonu, histon proteinlerinin modifikasyonu ve mikroRNA'lardır (Yang ve ark., 2015).

HücreSEL yeniden programlama ve kök hücre kaderi yönlendirmesi için epigenetik modifikasyonların gerekli olduğuna dair kanıtlar giderek artmaktadır (Zachres ve Schöler, 2007). Epigenetikteki son gelişmeler, hücre kaderinin, histonlar veya DNA metilasyonu üzerindeki epigenetik işaretlerin değiştirilmesiyle sıfırlanabileceğini ve bu değiştirilmiş/yeniden programlanmış hücrelerin in vivo nakledildiğinde işlevsel olduğunu göstermektedir (Rodriguez ve ark., 2007).

Memeli hücreleri, birçok düzeyde gen ekspresyonunu düzenleyen küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar), kısa enterferans yapan RNA'lar (siRNA'lar) ve küçük çift sarmallı RNA'lar dahil olmak üzere çok sayıda küçük kodlamayan ribonükleik asidi (ncRNA)'yı barındırmaktadır. Çoğu kodlamayan RNA, embriyonik kök hücreler (EKH) ve beyin dahil olmak üzere farklı dokularda ve gelişimin farklı evrelerinde dokuya özgü ekspresyon paternleri göstermektedir. Bu da RNA sinyallerinin temelinde kapsamlı bir düzenleyici ağın varlığını göstermektedir (Lunyak ve Rosenfeld, 2008).

1.3.2.1. MikroRNA'lar

İnsan genomunun sadece %1,2'si protein kodlasa da, genomun çok büyük bir kısmı transkripte edilmektedir. Kromozom chip dizileme çalışmaları, insan hücrelerinde saptanabilir ncRNA'ların aralığının, mRNA'ların temsil ettiğinden çok daha fazla olduğunu göstermiştir (Kapranov ve ark., 2002) ve insanlarda

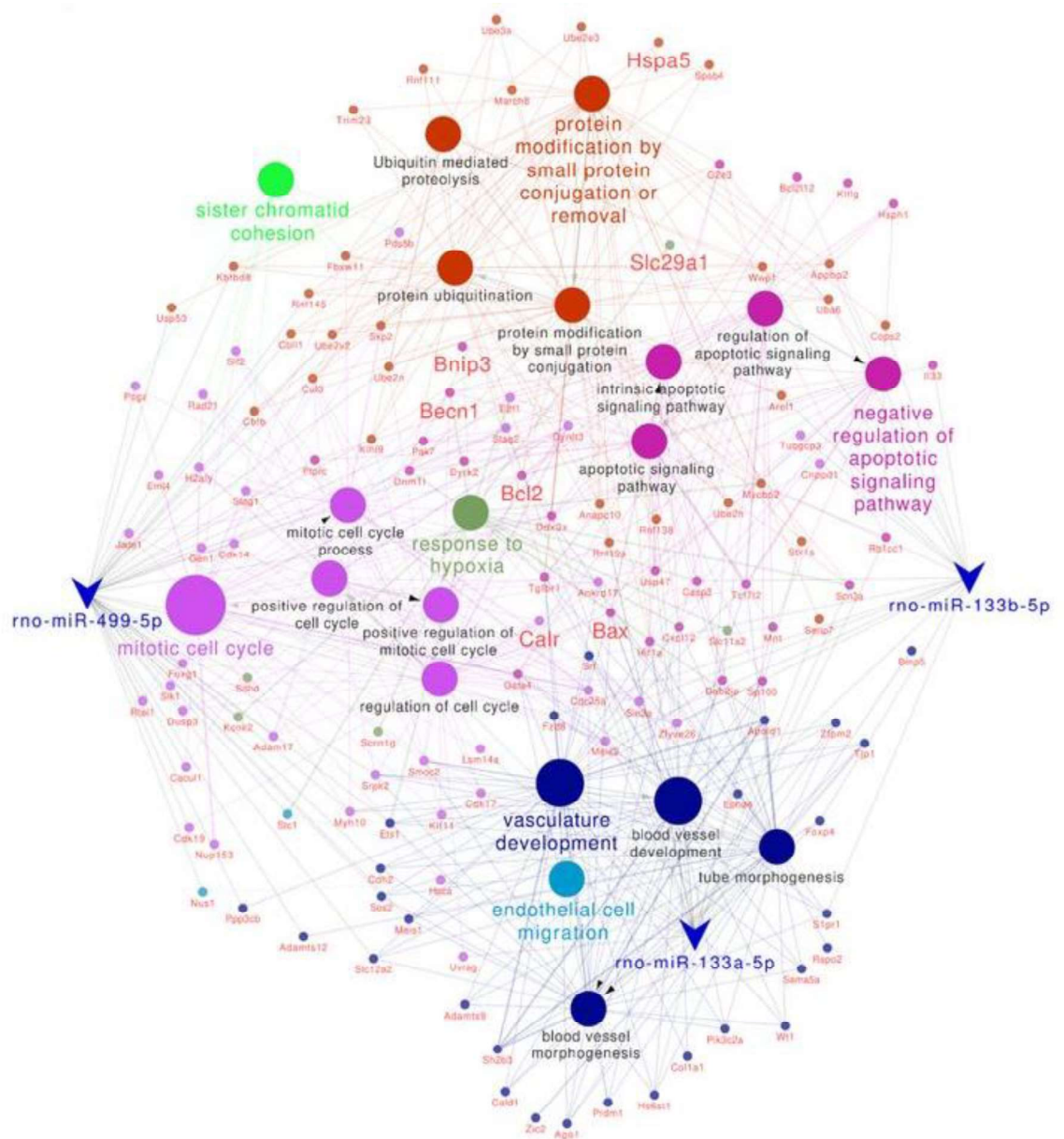
transkripsiyonel çıktının %98 kadarının ncRNA'lardan oluştuğu öne sürülmüştür (Mattick, 2003).

miRNA'lar, vücuttaki hemen hemen tüm hücreler tarafından üretilen yaklaşık 22 nükleotitlik, düzenleyici, küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır (Bartel, 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde, epigenetik mekanizmaların da hastalık riskinden sorumlu olabileceği hipotezi giderek güçlenmektedir (Zhang ve ark., 2018). Bu bağlamda, miRNA'ların, çeşitli hastalıkların biyobelirteçleri olarak potansiyel kullanımları olası görünmektedir. miRNA'lar kodlanmayan RNA'ların alt gruplarından biridir ve epigenetik düzenlemelerde oldukça önemli role sahiptir.

miRNA'ların metabolizma, hücre proliferasyonu, apoptoz, gelişimsel zamanlama ve hücre kaderi dahil olmak üzere pek çok gelişim sürecinde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Mattick ve Makunin, 2005). miRNA'ların mezenkimal kök hücreler üzerinde etkili olan düzenleyici rolleri arasında ise nöral gen ekspresyonu (Klein ve ark., 2005), beyin morfogenezi (Giraldez ve ark., 2005), kas farklılaşması (Naguibneva ve ark., 2006) ve kök hücre bölünmesi (Hatfield ve ark., 2005) gösterilebilir.

miRNA'lar potansiyel kardiyovasküler biyobelirteçler olarak giderek daha önemli bir rol üstlenmektedirler (Gurha, 2016). Yaklaşık 1500-2000 insan miRNA'sı arasından tanımlanan 19 adet miRNA'nın kardiyogenez, kalp fonksiyonu ve kardiyovasküler hastalık patolojisinde de önemli bir rol oynadığı, kardiyak hipertrofi, fibroz ve miyokard enfarktüsü (kalp krizi) gibi kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir. Bunların arasından özellikle miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499 miyokardda bol miktarda eksprese edilir, stabil ve saptanabilir durumdadır (Romaine ve ark., 2015). Ayrıca, diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, bu 4 miRNA'nın oksidatif stresle doğrudan bağlantılı olduğu ve hiperglisemide ifadelerinin düşmekte olduğu gösterilmiştir (Yıldırım ve ark., 2013).

Bitirim ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada, miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499'un biyolojik süreçlerle bağlantılı olduğu öngörülen hedeflerini de inceleyerek bu miRNA'ların, apoptoz yollarında negatif; hücre göçü, yara iyileşmesi ve hücrel stres yanıtında ise pozitif düzenleyiciler olarak yer aldıklarını göstermiştir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Diyabetik kardiyomiyopati ile ilişkili incelenen miRNA'lar tarafından düzenlenen biyolojik süreçlerin gen ontolojik doğrulanması (Bitirim ve ark., 2021).

Hedef genlerin bu miRNA'lar ile biyolojik ilişkisi, gen ontolojisi üzerinden gösterilmiş ve birlikte ele alındığında, bu analiz, hücresel stresin baskılanması, ROS üretimi ve hücre ölümü gibi biyolojik süreçlerin miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499 ile bağlantılı olabileceğini ortaya koymuştur (Bitirim ve ark., 2021).

1.3.3. Kök Hücre Kaderini Belirleyen Çevresel Faktörler

Kök hücre kaderini etkileyen diğer hücre dışı faktörler ise (Jiang ve Papoutsakis, 2013; Sisakhtnezhad ve ark., 2017);

- 1) Hücre-Hücre etkileşimleri
- 2) Başka hücre türleriyle birlikte kültür yapılması (co-culture)
- 3) Eksojen uzun mesafe sinyalleri: Morfojenler ve hormonlar gibi
- 4) Yakın mesafe hücre parakrin sinyallerin iletimi: eksozom vb. ekstraselüler kesecikler aracılığıyla
- 5) Mekanik Sinyaller: Elastiklik, Kayma Gerilimi (Shear Stress) ve Diğer Mekanik Gerilimler
- 6) 3 Boyutlu Kültür Şartları (Scaffoldlar): Hidrojeller, Makroporlu İskeleler, Lifli Örgüler, Mikroküreler, Nanotüpler
- 7) Kültür Ortamı: Serum, Sitokinler, Biyokimyasal Maddeler
- 8) Fizyokimyasal Şartlar: Oksijen, pH, Sıcaklık
- 9) Topografi: Hücre/Tanecik Organizasyonu, Hücre/Tanecik Boyutu, Geometri
- 10) Yüzey Biyokimyası: Fonksiyonel Gruplar, Hücre Dışı Matriks, Oligopeptitler

şeklinde sınıflanabilir.

Hücre dışı matris (ESM), dokuya özgü biyofiziksel, mekanik ve biyokimyasal özelliklere sahip, hücre davranışını düzenleyen dinamik ve kompleks bir ortamdır. Kök hücreler, niş olarak tanımlanan belirli bir mikro çevrede bulunurlar ve bu sayede köklülüklerini korurlar (Gattazzo ve ark., 2014; Morrison ve Spradling, 2008). ESM, kök hücre nişini düzenlemede en önemli unsurlardan biridir ve kök hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynar. ESM, sahip olduğu biyofiziksel ve biyokimyasal özellikleri sayesinde kök hücre kimliğinin sürdürülmesi, hücre farklılaşmasının yönlendirilmesi

veya kök hücre havuzunun korunması dinamiklerinin her birinde rol oynar (Gattazzo ve ark., 2014).

Kök hücreler ESM'e adhezyon molekülleri ile bağlanır. Bu adhezyon komplekslerinde yer alan aktin ve miyosin, kök hücrelerin şeklini değiştirmek için ESM'den geri bildirim alır (Schaap-Oziemlak ve ark., 2014). Bu nedenle ESM; sadece hücresel adhezyon veya hücre-hücre etkileşimi için değil, aynı zamanda farklılaşma için de önemli bir mikro-çevre bileşenidir. Sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar gibi biyomoleküller hücre çoğalmasını, farklılaşmasını veya metabolik aktiviteyi uyarabilirler. Doku oluşumu veya iyileşme gibi kök hücrelerin yoğun şekilde yer aldığı metabolik aktiviteler süresince; proteinler, büyüme faktörleri, hücre bölünmesi ve farklılaşmasını sağlayan biyomoleküller de çeşitli hücresel işlevleri desteklemektedirler.

Hücre kaderinde rol oynayan önemli faktörlerden bir diğeri ise hücreler arası etkileşimlerdir. Bu etkileşimler; hücreler arası sinyallerin, hormonların veya diğer sinyal moleküllerin aktarılması ile sağlanmakta ve organizmadaki yaşamsal faaliyetleri ve döngüleri organize etmektedir. Hücresel sinyal iletiminde oluşabilecek hatalar ve aksaklıklar kanser, otoimmün hastalıklar gibi bozukluklara neden olabileceğinden büyük önem taşımaktadır (Forman ve ark., 2003).

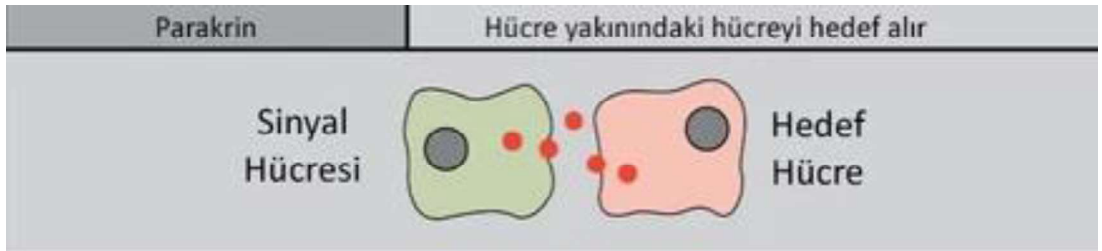
1.3.3.1. Hücresel Sinyaller

Hücresel sinyal iletimi, bir hücrenin çevresel veya içsel sinyalleri alma, işleme ve iletme yeteneğidir (Vu ve ark., 2017) ve tüm hücrelerin temel bir özelliğidir. Hücre dışı kaynaklı sinyaller mekanik basınç, voltaj, sıcaklık, ışık gibi fiziksel veya küçük moleküller, peptitler, gazlar gibi kimyasal sinyallerden meydana gelebilmektedir (Lodish ve ark., 2008). Sinyal molekülleri, çeşitli biyosentetik yollarla sentezlenerek pasif veya aktif taşıma yoluyla verici hücreden, hücre dışı boşluğa salınarak komşu hücrelere iletilmekte ve pasif veya aktif taşımayla alıcı hücre içine alınabilmektedir (Berridge, 2005).

Hücresel sinyal iletimi temel olarak, verici hücre tarafından üretilen sinyalin alıcı hücreye iletilmesini kapsamaktadır ancak verici ve alıcı hücreler birbirine yakın mesafede olmayabilir. Bu durumda hücreler arası mesafe ve sinyalin içeriği de göz önünde bulundurularak farklı sinyal iletim mekanizmaları kullanılmaktadır. Hücresel sinyaller otokrin, jukstakrin, parakrin, endokrin veya sinaptik olarak sınıflandırılabilir.

1.3.3.1.1. Parakrin Sinyaller

Birbirlerine yakın mesafede veya komşu hücreler arası gerçekleştirilen parakrin sinyalleşmede, bir hücre yakındaki hücrelerde çeşitli düzenleme veya değişiklikleri indüklemek için bir sinyal üretir ve bu hücrelerin davranışını değiştirir. Parakrin faktörler olarak bilinen kimyasal sinyal molekülleri nispeten kısa bir mesafeye yayılırlar ve bu nedenle lokal etkiye sahiptirler. Parakrin sinyal iletimi hücrelerin komşu hücreler ile gerekli aktivasyonları lokal olarak koordine etmesine izin vermektedir (Li ve Weisel, 2014). Şekil 1.7’de Parakrin sinyal iletimi gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Parakrin sinyal iletimi (Khan Akademi’den uyarlanmıştır).

Çeşitli alerjenlere tepkiler, doku onarımı, skar dokusu oluşumu, kan pıhtılaşması, eksozom gibi ekstraselüler keseciklerin hücreler arası iletimi (Zhang ve Grizzle, 2014) parakrin sinyallere örnek gösterilebilir.

1.3.3.1.2. Otokrin Sinyaller

Otokrin sinyal iletiminde, hücre tarafından verilen sinyal, yine aynı hücredeki otokrin reseptörlere bağlanarak, hücrenin kendisinde değişikliklere yol açan bir hormon veya kimyasal haberci niteliğinde bir otokrin ajandır. Hücre yanıtı, otokrin ajanın sentezlendiği hücrede etkisini göstermektedir. Hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere (veya sinyalin çeşidine bağlı olarak hücre içersindeki reseptörlere) bağlanabilen bir ligandı serbest bırakır. Tıbbi bir bakış açısından otokrin sinyal iletimi kanser gelişimi ve metastazda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Birçok durumda iletilen sinyal hem otokrin hem de parakrin etkiye sahip olmakla birlikte gönderici hücreye ve bölgedeki diğer komşu hücrelere bağlanabilmektedir. Otokrin hücreler kendi ürettikleri sinyal moleküllerine yanıt vererek kendileri ile benzer hücrelere de sinyal gönderilebilmektedir (Junger, 2011). Şekil 1.8’de otokrin sinyal iletimi gösterilmiştir.



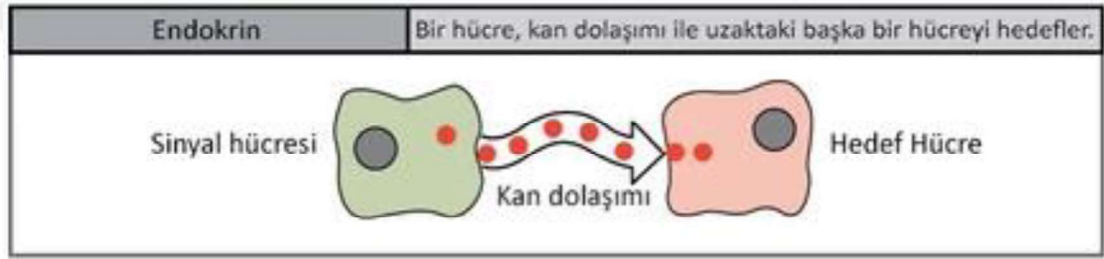
Şekil 1.8. Otokrin sinyal iletimi (Khan Akademi’den uyarlanmıştır).

1.3.3.1.3. Jukstakrin Sinyaller

Jukstakrin sinyaller, çok hücreli organizmalarda yakın temas gerektiren bir hücre-hücre veya hücre-hücre-hücre dışı matris (ESM) sinyalidir. Ayrıca, bakteri gibi tek hücreli organizmalarda, jukstakrin sinyaller, membran temasıyla etkileşimler şeklinde de gerçekleşebilmektedir (Müller ve ark., 2016). Jukstakrin sinyal yollarının parakrin sinyal yollarından temel farkı ise, hücrelerin doğrudan temas halinde olmaları ve sinyal moleküllerinin hücre dışı matrise salınmasını gerektirmemesidir. Bazı büyüme faktörleri, sitokin ve kemokin gibi önemli hücresel sinyallerde jukstakrin sinyaller görev almaktadır.

1.3.3.1.4. Endokrin Sinyaller

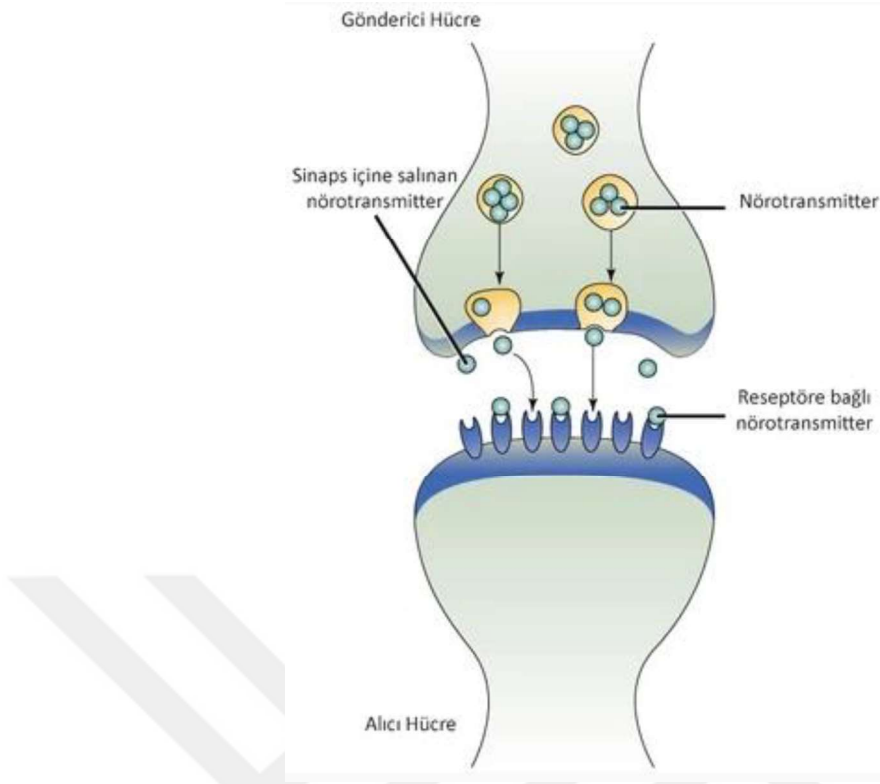
Endokrin sinyaller hormon olarak adlandırılmaktadır. Hormonlar endokrin hücreler tarafından üretilir ve kan yoluyla vücudun tüm bölgelerine ulaşırlar ancak yalnızca ilgili hücreler belirli bir hormona yanıt verebildiklerinden, endokrin sinyaller de belli bir seviyeye kadar özgüllüğe sahiptir (Köhrle ve ark., 2005; Vandenberg ve ark., 2012). Omurgalılarda hipotalamus, tüm endokrin sistemin sinirsel kontrol merkezidir. İnsanlarda başlıca endokrin bezleri ise tiroid bezi ve adrenal bezlerdir. Şekil 1.9’da sinaptik sinyal iletimi gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Endokrin sinyal iletimi (Khan Akademi’den uyarlanmıştır).

1.3.3.1.5. Sinaptik Sinyaller

Sinaptik sinyal iletimi iki sinir hücresi (nöron) arasında gerçekleşir ve bu özel bağlantılar sinaps olarak adlandırılmaktadır. Çevreden veya diğer sinir hücrelerinden gelen uyarılar ile aktive edilen nöronlar nörotransmitter (kimyasal haberci) sentezleyerek akson boyunca elektriksel uyarılar ile iletmektedir. Nörotransmitterler sinapslara ulaştıklarında, hücreler arasındaki boşluğu hızla geçerek alıcı hücrede ilgili reseptörlere bağlanır ve kimyasal bir değişikliğe neden olarak hücresel cevabı oluştururlar (Pavlovsky ve ark., 2012). Şekil 1.10’da sinaptik sinyal iletimi gösterilmiştir.

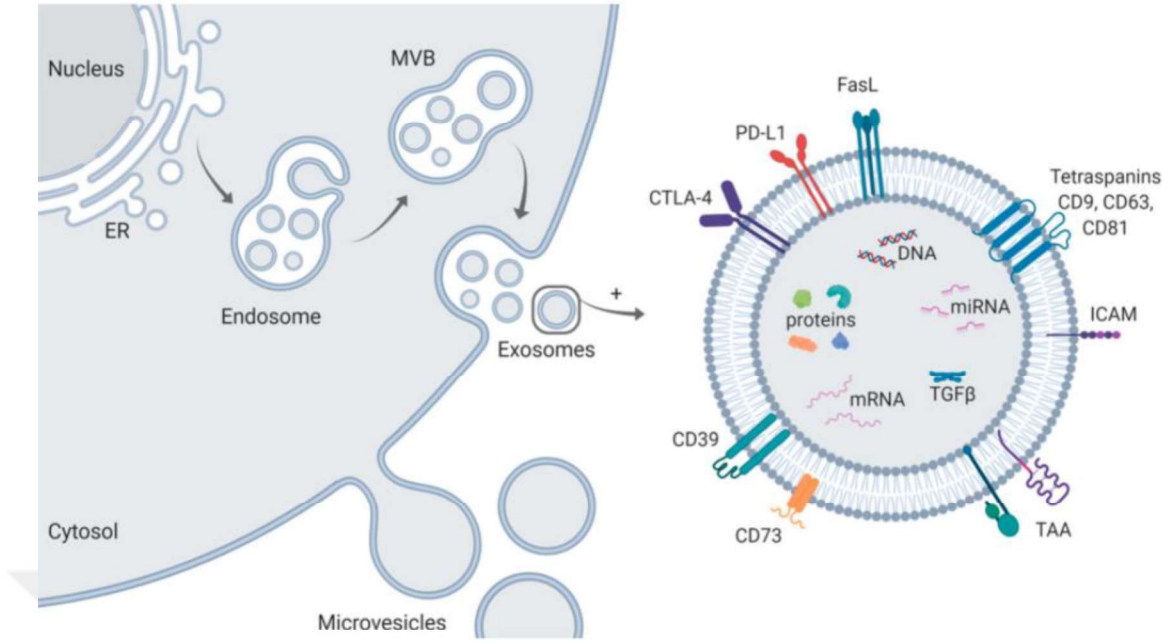


Şekil 1.10. Sinaptik sinyal iletimi (Khan Akademi'den uyarlanmıştır).

1.4. Eksozomlar

Tüm hücreler, prokaryotlar ve ökaryotlar, normal fizyolojilerinin bir parçası olarak veya anormal hallerde hücre dışı kesecikler (EV'ler) salgırlar. Eksozomlar; boyutları 30 nm-1 µm arası değişen, hücrelerin endozomal kompartmanlarından salınan parakrin etkili ekstrasellüler veziküllerdir.

Eksozomlar; endotelial hücreler, fibroblastlar, kardiyomyositler ve düz kas hücreleri arası moleküllerin transferini yaparak sinyal yollarını aktive eden mesajcılar gibi davranırlar (Qi ve ark., 2016). Kargo olarak protein, mRNA, miRNA gibi molekülleri taşırlar (Şekil 1.11), böylelikle hücreler arası iletişimde ve parakrin haberleşmede rol oynarlar. Eksozomlar hedef hücreye membran üzerinden füzyon veya endositoz yoluyla alınabilirler (Emanueli ve ark., 2015).



Şekil 1.11. Eksozom üretimi ve içeriğinin şematik gösterimi (Hofmann ve ark., 2020).

Eksozomlar kan, üre ve serum gibi vücut sıvılarında yoğun olarak bulunmaktadır; ayrıca hücre kültürü ortamında besiyerinde de bulunmaktadır. Ayrıca, çalışmalar, MKH'lerden türetilen eksozomların, neovaskülerizasyon, kardiyak rejenerasyon, anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkileri de içeren çeşitli mekanizmalar yoluyla miyokardiyal hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Jayaraman ve ark., 2021).

Eksozomların diğer bazı hücrel etkileri ise;

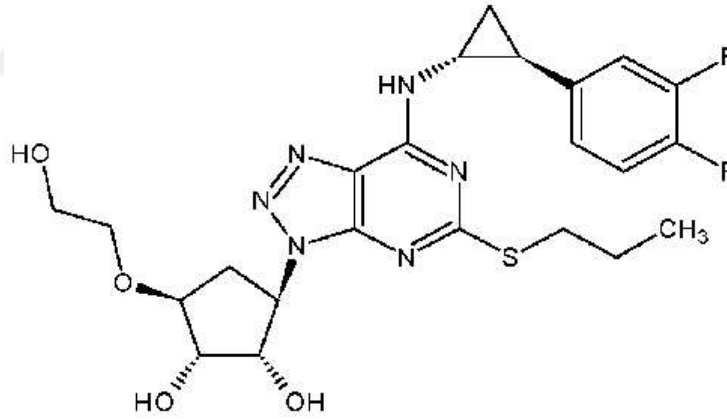
- gen transkripsiyonu ve translasyonunun düzenlenmesi
- hücre canlılığı
- hücre çoğalması
- hücre farklılaşması
- hücre gelişimi
- hücre göçü
- hücre yeniden programlanması
- hücrel metabolizma
- anjiyogenez
- yara iyileşmesi

- hücresel atıkların uzaklaştırılması
- viral immünite
- hücresel sinyallerin düzenlenmesi
- apoptoz

şeklinde özetlenebilir (Kalluri ve Lebleu, 2020).

1.5. Ticagrelor

2010 yılından beri ilaç pazarında olan ve Brilinta veya Brilique markasıyla satılmakta olan ticagrelorun kimyasal formülü $C_{23}H_{28}F_2N_6O_4S$ şeklindedir. Moleküler yapısı şekil 1.12’de sunulmuştur. Temel kullanım amacı; akut koroner sendromlu kişilerde felç ve kalp krizinin önlenmesi ve diyabetik hastalarda iskemi oluşumunun engellenmesidir. Bunun için, P2Y₁₂ reseptörünü antagonize ederek trombosit agregasyonu inhibitörü olarak görev yapmaktadır.



Şekil 1.12. Ticagrelorun kimyasal yapısı (Tabassum ve Sarvesh, 2017).

Antioksidan etkili pürinerjik reseptör P2Y₁₂ inhibitörü şeklinde çalışan bir ilaç olan ticagrelorun diyabetik hastalarda kullanıldığında iskemi oluşumunu kayda değer oranda düşürdüğü bilinmektedir. Ticagrelorun bilenen etkilerine ek olarak, equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT-1) aktivitesini inhibe ederek hücrenin adenosin alımını engellediği, böylece ATP salınımını arttırdığı ve hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiştir (Olgar ve ark., 2020). Ancak ticagrelorun etkisinin

hücre içi mekanizmalardaki karşılığı henüz aydınlatılamamıştır. Ticagrelorun kardiyak kök hücrelerden eksozom salınımını artırarak miyokardiyumda hücrelerin korunmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Casieri ve ark., 2020) ancak diyabet ve insülin direnci gibi kardiyak disfonksiyona sebep olan hastalıklarda ticagrelorun eksozom etkinliği üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Bununla beraber, P2Y12 antagonistlerinin aktif trombositlerden pro-koagulant ekstrasellüler vezikül salınımını azalttığı bilinmektedir (Casieri ve ark., 2020).

G protein-bağlı (GPCR) bir pürinerjik reseptör olan P2Y12, miyokardı iskemik yeniden şekillenmeye karşı korur. Bazı P2Y reseptörlerinin ek downstream sinyal yollarına bağlandığı da bilinmektedir. Örneğin, P2Y11 reseptörü, adenilsiklaz (AC)'ı uyarmak ve hücre içi halkasal adenosin monofosfat (cAMP) seviyesini yükseltmek için G_{α_s} -AC-cAMP sinyal yolağı ile de ilişkilendirilebilmektedir (von Kügelgen ve Harden, 2011). İnsan MKH'lerinde P2Y12 ve P2Y13 reseptörlerinin fonksiyonel ekspresyonu ile ilgili bilgi bulunmamakla birlikte (Jiang ve ark., 2016), hem adipoz hem de kemik iliği kaynaklı insan MKH'lerinde bilinen tüm P2YR alt tipleri için (P2Y1R, P2Y2R, P2Y4R, P2Y6R, P2Y11R, P2Y12R, P2Y13R, P2Y14R) mRNA ifadesi olduğu gösterilmiştir (Ferrari ve ark., 2011).

1.6. Hedefler

MKH'lerde ticagrelor uygulamasının, bu hücrelerin eksozomal çıktıları üzerindeki antioksidatif, anti-apoptotik yöndeki düzenlenmesine ek olarak kardiyoprotektif ve anjiyojenezi destekler yönde modülasyonunu da fonksiyonel deneyler olan yara iyileşmesi ve hücre göçü deneyleri ile göstermek hedeflenmiştir. Hipotezimize göre deney sonuçlarımız, ticagrelor uygulamasını takiben insan mezenkimal kök hücre hattından izole edilen eksozomların, diğer insan dokularında koruyucu ve düzenleyici etkisini işaret edecektir.

Çalışmamızda ticagrelorun pro-anjiyogenik ve proliferatif etkileri, ticagrelor uygulanmış sağlıklı insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerden izole edilen eksozomlar aracılığı ile incelenmiştir. Bunun için, ticagrelor ile muamele edilmiş MKH hattı hücrelerinden salınan eksozomlar HUVEC ve H9C2 hücrelerine verilerek; damar oluşumu ve hücre göçüne etkileri ile, diyabet ve kalp şekillenmesi ile ilişkisi gösterilmiş olan mikroRNA'ların ve hücre stres, otofaji ve apoptozla ilişkili genlerin ifadesi araştırılmıştır. Bu incelemelerin sonuçları, geleneksel olarak uygulanmakta olan klinik ticagrelor tedavisinin, yenilikçi eksozomal-parakrin mekanizma yoluyla geliştirmeyi amaçladığımız tedavi yaklaşımından farklarını ve benzerliklerini ortaya koymuştur.

Son olarak, hiperglisemiye bağlı gelişen diyabetle karakterize miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499'un ifadelerinin erken dönemde tespiti ve düzenlenmesinin kalbi yapısal ve fonksiyonel hasarlardan koruyacağını düşünmekteyiz. Ticagrelorun bilinen antioksidan etkisine ek olarak kalp disfonksiyonu üzerindeki olumlu etkilerini diyabet ve insülin direnci durumunda eksozomal parakrin etki mekanizması aracılığıyla sağladığını göstermek hedeflenmiştir.

1.7. Özgünlük

Ekstraselüler veziküllerin bir grubu olan eksozomlar taşıdıkları kompleks protein kargoları ve genetik materyaller sayesinde ideal terapötik ajanlar olarak kabul edilmektedirler. Eksozomların pro-anjiyogenik, pro-myojenik, proliferatif, hücre göçünü indükleyici ve anti-apoptotik rollerinin anlaşılması, bu mekanizmalarda rol alan mikroRNA'ların tespiti, eksozomları kardiyak hastalıkların veya diyabetin tedavisinde çok daha etkin bir şekilde kullanmamızı sağlayacaktır.

Klinikte yaygın olarak kullanılan bir anti-oksidan ilaç olan ticagrelorun, insülin direnci ve iskemi üzerindeki olumlu etkisi gösterilmiş olsa da ticagrelorun moleküler hücre içi etki mekanizması tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Özellikle ticagrelorun eksozomal-parakrin mekanizmalar aracılığı ile endotelial hücreler

üzerinde nasıl tedavi edici olarak rol alabileceğine dair herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu sebep ile çalışmamız, ticagrelorun eksozomal modülasyon yoluyla insan endotelial hücrelerinden meydana gelen dokulardaki iyileştirici etkisinin gösterileceği ilk çalışma olması açısından özgün değer taşımaktadır.

Diyabetik hastalara uygulanan antioksidan tedavilerinin kardiyovasküler hastalıkların gelişmesini geciktirdiği ve bazı durumlarda önlediğini gösteren çalışmalar literatürde yaygındır (Vassort ve Turan, 2010; Turan, 2010). Diyabetik kardiyomiyopatinin altında yatan sebeplerle oksidatif stresin ilişkisi ve antioksidan tedavisinin etkilerinin bu bağlamda incelenmesi oldukça önemlidir. Ticagrelorun klinikteki yaygın kullanımına rağmen diyabetik kardiyomiyopati üzerindeki durdurucu etkisinin altında yatan mekanizma hala anlaşılamamıştır.

Hipotezimize göre, ticagrelor ile ön-mumale edilmiş kemik iliği kaynaklı insan mezenkimal kök hücrelerinden salınan eksozomların tedavi amaçlı olarak endotelial hücrelere ve kardiyomiyositlere uygulanmasıyla hücre göçü, yara kapanması gibi faktörlerde iyileşme görülecektir. Çalışmamız, insan MKH'lerine uygulanan ticagrelor tedavisinin eksozomal modülasyon yoluyla, diğer insan hücreleri üzerindeki düzenleyici ve tedavi edici etkisinin gösterildiği ilk çalışma olması açısından özgün değer taşımaktadır.

Sonuçlarımız, ilaç tedavisinin ilaç etken maddesinin doğrudan etkisiyle değil, ilaca bağlı olarak değişen eksozomal parakrin etki ile hücreler arasında da etkisinin yayılmasının mümkün olup olmadığını göstermektedir. Ayrıca ticagrelor uygulaması ile kök hücre kaynaklı eksozomların modüle edilerek, kardiyomiyosit ve endotel hücre göçünün artması ve yara iyileşmesinin tetiklenmesi de çalışmamızda beklenen çıktılarımız arasında gösterilebilir.

Bu bağlamda, doğrudan ilaç uygulamaya alternatif, yenilikçi bir yöntem olan eksozomlarla tedavinin iyileştirici etkisinin fonksiyonel olarak incelenmesi de araştırmamızı özgün kılan bir diğer değerdir. Doğrudan yüksek dozda ilaç kullanımına

alternatif olarak geliştirilebilecek metotlar arasında görülen eksozom temelli uygulamaların da insan hücreleri üzerinde denenmesi bu bağlamda umut verici niteliktedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

Kullanılan genel laboratuvar gereçleri, deney kitleri, kimyasallar, cihazlar ve modelleri deneysel yöntemler içerisinde belirtilmiştir. Marka ve katalog numarası belirtilmeksizin tarafımızdan hazırlanan standart solüsyonların tarifleri ise Ek-1’de listelenmiştir.

Kullanılan kimyasallardan başlıcaları; Tris-Base tampon maddesi ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, moleküler ağırlık 121.14 g), kloroform (CHCl_3 , moleküler ağırlık 119.38 g, Sigma-Aldrich Katalog No: 24216), metanol (Invitrogen LifeTechnologies, CH_4O), etanol (Invitrogen LifeTechnologies, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), etidyum bromür solüsyonu (EtBr, Invitrogen, Katalog No: 15585), agaroz (Sigma Katalog No: A9539) şeklindedir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (MKH) hattı, insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) hattı ve sıçan kalp miyoblast hücre (H9C2) hattı kullanılmıştır. Hücre hatlarının tümü ATCC’den (American Type Culture Collection, Virginia, ABD) alınmış olup detaylı bilgi ve hücre hatlarının katalog numaraları Ek-2’de sunulmuştur.

Hücreler 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 bulunan ortamda inkübe edilmişlerdir. Hücrelerin besiyeri 3 günde bir fetal sıgır serumu (FBS) ve penisilin-streptomisin (PS) içeren taze besiyeri ile değiştirilmiş, haftada 1 ise hücreler pasajlanmıştır. Her bir hücre

hattı için kullanılan besiyeri ve içerdikleri FBS-PS oranları detaylı şekilde Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve besiyerleri.

Hücre Hattı	Hücre Türü	Kullanılan Besiyeri
MKH	insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücresi	%20 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren MSC NutriStem® XF Medium (Biological Industries, ABD)
HUVEC	insan umbilikal ven endotel hücresi	%10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM F12 Medium (Biological Industries, ABD)
H9C2	sıçan kalp miyoblast hücresi	%10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM Low Glucose Medium (Biological Industries, ABD)

2.2.2. Hücre İçi Oksidatif Stres (ROS) Ölçümü

Mezenkimal kök hücreler, 6 kuyulu hücre tabaklarında her bir kuyuya 100.000 hücre düşecek şekilde lamel üzerine ekilmiş ve 1 saat, 3 saat, 6 saat, 24 saat ve 48 saat deney gruplarının her biri için ayrı tabaklar hazırlanmıştır. Hücreler yaklaşık %50 konfluent olduklarında kontrol (ticagrelorsuz NutriStem besiyeri), 10^{-8} M Tica (1 mL besiyeri içinde 1 μ L ticagrelor) ve 10^{-6} M Tica (1 mL besiyeri içinde 100 μ L ticagrelor) şeklinde muamele edilmiştir.

Deney gruplarının her biri için gerekli sürelerin sonunda MKH’ler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak 2 defa $Mg^{2+}Ca^{2+}$ D-PBS ile yıkama yapılmış, ardından ROS indikatörü chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA, Katalog no: D6883) ile 1 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. $Mg^{2+}Ca^{2+}$ D-PBS ve DCFDA boyasının çözülmesi ve hazırlanması ile ilgili detaylı bilgi Ek-1’de sunulmuştur.

İnkübasyon süresi sonunda boyayı uzaklaştırmak için 2 defa $Mg^{2+}Ca^{2+}$ D-PBS ile yıkama yapıldıktan sonra cam lameller üzerindeki hücrelere 1 mL hacimde 10 mM

akut H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) uygulanmıştır. H₂O₂ uygulaması üzerinden vakit geçmeden 488 nm eksitasyon ve 560 nm emisyon dalga boyları ile konfokal mikroskopta (LEICA TCS SP5) ROS ölçümleri alınmış ve flüoresan yoğunluğundaki değişim kaydedilmiştir (Bitirim ve ark., 2021). Maksimum flüoresan yoğunluğu ROS üretimini göstermektedir, bu nedenle hücre içi ROS miktarı fazla olan hücrelerde H₂O₂ uygulamasından sonra daha az ROS artışı gözlemlenmektedir.

Bazal floresan yoğunluğu F₀, floresan yoğunluğunun yerel maksimum değeri F_{max} iken, her hücre için floresan yoğunluğu değişiklikleri ve hücre içi ROS miktarları Denklem 2.1’de gösterilen şekilde hesaplanmıştır.

$$\Delta F = F_{\max} - F_0 \quad (\text{Floresan yoğunluğundaki değişim})$$

$$ROS_{in} = \frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_{\max} - F_0}{F_0}$$

$$\text{Hücre içi ROS miktarı} = \frac{1}{ROS_{in}}$$

Denklem 2.1. Hücre içi floresan yoğunluğu değişiklikleri ve ROS miktarı matematiksel denklemleri.

2.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaştırılması ve Oil Red O Boyası ile Boyanması

MKH’ler 6 kuyucuklu hücre tabaklarına her bir kuyucuğa 100,000 hücre gelecek şekilde paylaştırılmış ve yüzeyin %80-90’ı kaplanana kadar %20 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren MSC-NutriStem ortamı ile inkübe edilmiştir. Bundan sonra ortam, 100 µM indometasin (Sigma, Almanya), 1 µM deksametazon (Sigma, Almanya), 0,5mM IBMX (Sigma, Almanya), 10 µg/mL insülin (Sigma, Almanya) içeren adipojenik indüksiyon ortamı ile değiştirilmiştir. Farklılaştırılmayacak negatif kontrol MKH’ler ise DMEM-Low Glucose ((Biological Industries, ABD) içinde %1 PS ve %10 FBS’li ortamda 21 gün süreyle inkübe edilmiştir ve besiyeri haftada üç kez değiştirilmiştir. İndüksiyon medyaları, her ortam değişikliğinden önce taze olarak

hazırlanmıştır. Ayrıca, ticagrelor ile muamele edilen hücrelerin üzerine her besiyeri değişiminde 1 μ M ticagrelor eklenmiştir.

Adipojenik farklılaşmanın 21. gününün sonunda hücreler üzerindeki besiyeri çekilmiş ve hücreler 1xPBS ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika %10 formaldehit içinde fikse edildilmiş ve bir kez 1xPBS ve ardından bir kez de su ile yıkanmıştır. Hücreler, 50 dakika boyunca oda sıcaklığında, filtrelenmiş 3 mM Oil Red O (Sigma, Almanya) çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Daha sonra Oil Red O solüsyonu aspire edilmiş ve hücreler önce 1xPBS, ardından su ile yıkanmıştır. Fotoğraflar ışık mikroskobu altında 20x ve 40x büyütmede çekilmiştir.

2.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaştırılması ve Alizarin Red S Boyası ile Boyanması

MKH'ler 6 kuyucuklu hücre tabaklarına her bir kuyucuğa 100,000 hücre gelecek şekilde paylaştırılmış ve yüzeyin %80-90'ı kaplanana kadar %20 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren MSC-NutriStem ortamı ile inkübe edilmiştir. Bundan sonra ortam, 0.1 μ M deksametazon, 10 mM gliserol fosfat tuz hidratı (Sigma, Almanya) ve 0,2 mM γ -ışınlı askorbik asit (Sigma, Almanya) içeren osteojenik indüksiyon ortamı ile değiştirilmiştir. Farklılaştırılmayacak negatif kontrol MKH'ler ise DMEM-Low Glucose ((Biological Industries, ABD) içinde %1 PS ve %10 FBS'li ortamda 21 gün süreyle inkübe edilmiştir ve besiyeri haftada üç kez değiştirilmiştir. İndüksiyon medyaları, her ortam değişikliğinden önce taze olarak hazırlanmıştır. Ayrıca, ticagrelor ile muamele edilen hücrelerin üzerine her besiyeri değişiminde 1 μ M ticagrelor eklenmiştir.

Osteojenik farklılaşmanın 21. gününün sonunda hücreler üzerindeki besiyeri çekilmiş ve hücreler 1xPBS ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat %70 etanol içinde fikse edildilmiş ve bir kez 1xPBS ve ardından bir kez de su ile yıkanmıştır. Hücreler, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında, filtrelenmiş 40 mM Alizarin Red S (Sigma, Almanya) çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Daha sonra Alizarin Red S solüsyonu aspire

edilmiş ve hücreler önce 1xPBS, ardından su ile yıkanmıştır. Fotoğraflar ışık mikroskobu altında 20x ve 40x büyütmede çekilmiştir.

2.2.5. Eksozom İzolasyonu

Eksozom izolasyonu yapılacak MKH'ler T75 flasklarda %80 doluluğa ulaşana kadar kültür edilmiştir. Doluluğa ulaştıktan sonra, kontrol grubu için serumsuz %1 penisilin-streptomisin içeren 10 mL MSC-NutriStem® besiyeri içerisinde, ticagrelor grubu için %1 penisilin-streptomisin ve 1uM ticagrelor içeren serumsuz 10 mL MSC-NutriStem® besiyeri ile muamele edilmiştir. Ticagrelor ile hem muamele edilen hem edilmeyen MKH'lerden 48 saat inkübasyon sonrası hücre besiyeri toplanmıştır. Toplanan besiyerleri, 10.000 x g'de 4°C'de 20 dakika santirfuj (ThermoFisher, Massachusetts, ABD) edilerek hücre ve debrileri uzaklaştırılmıştır, sıvı numuneler kolon izolasyonuna hazır hale getirilmiştir.

Eksozom izolasyonunda Column Exclusion metodu için 35 nm gözenek çaplı ve 10 mL toplam sıvı hacimden izolasyona imkân sağlayan qEV kolon sistemi kullanılmıştır (Izon Science – Katalog No: SP7). qEV izolasyonu, hücrelerden toplanmış olan besiyeri içerisindeki molekülleri ve parçacıkları gözenekli reçine parçacıklarından oluşan bir kolondan geçerken boyutlarına göre ayıran, boyut kromatografisi ilkelere dayanmaktadır. Büyük çaptaki partiküller, gözeneklere giremedikleri ve dolayısıyla reçinenin etrafından dolaştıkları için kolonu en erken terk eden grupta yer alırlar. Buna karşılık, izolasyon aralığından (35 nm) daha küçük partiküller reçinedeki gözeneklere girer ve kolondan daha geç toplanırlar (Izon Sciences, 2021).

1 saat oda sıcaklığında bekletilen kolon dik duracak şekilde standa sabitlenmiş ve ıslatmak için 2 rezervuar hacmi (yaklaşık 150 mL) 1x PBS geçirilmiştir, bu işlem biter bitmez kurutmadan 10 mL sıvı örnek yüklenerek izolasyona başlanmıştır. Örnek eklendikten sonra kolondan çıkan ilk 25 mL atık olarak kabul edilmiş ve uzaklaştırılmıştır. Hemen arkasından gelen 15 mL sıvı ise EV (ekstraselüler vezikül)

zone olarak saklanmıştır. Yeni numune ayırtırmaya geçilmeden önce kolondan yeniden 1.5 hacim (yaklaşık 120 mL) 1x PBS geçirilmiştir.

Kolondan elde edilen eksozom fazını yoğunlaştırmak için ultrasantrifüj (ThermoFisher, Massachusetts, ABD) ile 100.000 x g (=31.000 rpm)'de 4°C'de TH660 Swing-out Rotor ile 1 saat santrifüj edilerek eksozom pelleti haline getirilmiştir. Bir şırınga yardımıyla üst faz toplanıp atılmıştır, alt fazda kalan eksozomlar toplanmıştır. Hızlıca dondurulmak üzere önce sıvı azota batırılıp çıkarılan eksozom pelletleri, sonraki deneylere kadar -80°C derecede saklanmıştır. Kullanmadan en az 1 gece önce +4°C'ye alınan eksozomların yavaşça çözünmesi sağlanmıştır.

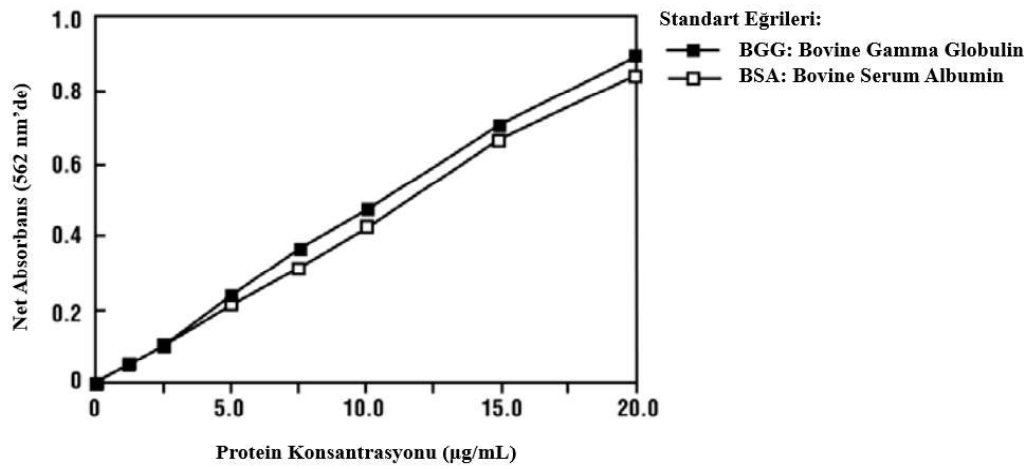
2.2.6. Micro BCA ile Eksozom Kantifikasyonu

İzolasyonu tamamlanan eksozom numunelerinin, öncelikle micro BCA (Bicinchoninic acid) protein testi kullanılarak içerdikleri eksozom miktarı tayin edilmiş, sonrasında akım sitometrisi kullanılarak karakterize edilmişlerdir. Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Katalog No: 23235, Illinois, ABD) üretici tarafından sağlanan kılavuzuna uygun şekilde kullanılmıştır (Thermo Fischer Scientific, 2015).

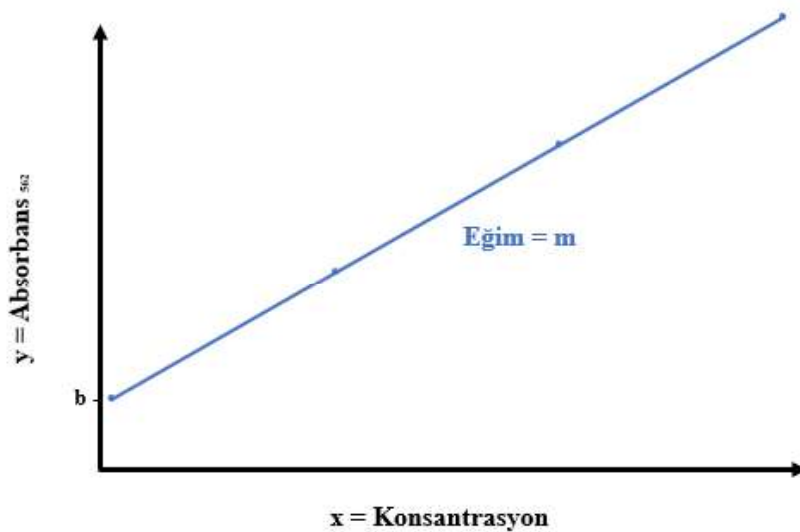
Standart 96-kuyucuklu hücre tabaklarına (Thermo Fischer, Katalog No: 15041) standart ve eksozom numunelerinden 150µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Her kuyuya 150µL tarife göre hazırlanmış Working Reagent karışımı eklenmiş ve 96-kuyucuklu tabak 30 saniye boyunca bir çalkalayıcı üzerinde iyice karıştırılmıştır. 96-kuyucuklu tabak 37°C'de 2 saat inkübe edilmiş ve protein miktarına bağlı olarak reaksiyon sonucu oluşan bicinchoninik asit miktarı bir mikropate okuyucuda (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, ABD) 562 nm'de absorbans ölçümüyle tayin edilmiştir.

Protein miktar analizinde; boş standart kopyaların ortalama 562nm absorbans okuması, diğer tüm standartların ve bilinmeyen numunelerin 562nm okumalarından

Çıkarılmış, her bir BSA standardı için $\mu\text{g/mL}$ cinsinden konsantrasyonuna karşılık gelen absorbands okuması çizilerek standart bir eğri hazırlanmıştır. Kit reticisi tarafından sunulan rnek BSA protein konsantrasyonu – absorbands eğrisi şekil 2.1’de gösterildiği biçimdedir. İçeriğindeki protein miktarı bilinmeyen her bir örneğin protein konsantrasyonunu belirlemek için şekil 2.2’de gösterilen bu standart eğri ve Denklem 2.2 kullanılmıştır.



şekil 2.1. Pierce BCA Protein Assay Kit Prosedürü kullanılarak standart rnekler BSA ve BGG için tipik absorbands eğrileri (Thermo Fischer’den uyarlanmıştır, 2015).



şekil 2.2. Bilinmeyen rnekler için oluşturulacak standart absorbands-konsantrasyon eğrisi.

$$y = m \cdot x + b$$

$$x = \frac{y-b}{m}$$

Denklem 2.2. Düz bir çizginin matematiksel denklemleri.

2.2.7. Akım Sitometri ile Eksozom Karakterizasyonu

Micro BCA sonucuna göre, her numunede 1×10^8 adet eksozom olacak şekilde hazırlanan eksozom örnekleri, insan CD9 antikoruyla (Biolegend, SanDiego, ABD, Katalog No: 312102) kaplanmış manyetik boncuklardan 1 μ L ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS ile toplam hacim 500 μ L'ye tamamlanarak rotatorda gece boyu, +4 °C'de inkübe edilmiştir.

Eksozom ve manyetik boncuk karışımı, PE-konjuge insan CD81 antikor (Biolegend, SanDiego, ABD, Katalog No: 104905) ile 2 saat süreyle karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve akım sitometri cihazında (NovoCyte, ACEA, Belçika) okuma alınmıştır. Stained (boyalı) olarak belirtilen örnekler PE-CD81 antikor ile kaplanmışken, unstained (boyasız) örnekler CD81 antikor ile muamele yapılmamıştır. Isotype (izotip) kontrolü ise, fare IgG-PE konjuge antikor ile bağlanarak deneysel kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.8. Elektron Mikroskobu (CTEM) ile Eksozomların Görüntülenmesi

2 μ g eksozom PBS ile 10 μ L toplam hacme seyreltilmiş ve 10 μ L %4 Paraformaldehit (PFA) ile karıştırılarak 10 dakika buz üzerinde fikse edilmiştir. Karışımdan 15 μ L alınarak TEM grid'ine yüklenip 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Eksozomlu grid ters biçimde 100 μ L PBS üzerine konularak 2 dakika süreyle numune yıkanmıştır. Filtrelenmiş 50 μ L %1 Gluteraldehid (GA) üzerine eksozomlu grid ters biçimde konularak 5 dakika süreyle 2. fiksasyon yapılmıştır. Eksozomlu grid ters biçimde 100 μ L ddH₂O üzerine konularak 2'şer dakika süreyle 8

yıkama yapılmıştır. Uranil Asetat (Agar Scientific, İngiltere, Katalog No: AGR1260A) boyasından 50 µL üzerinde 5 dakika boyama yapılmış ve 100 µL ddH₂O'da 2 dakikalık yıkama ardından oda sıcaklığında kurutularak TEM grid'i üzerinde numuneler hazırlanmıştır.

Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu ile numunelerin görüntülenmesi için ODTÜ Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alınarak Zeiss EM900 Transmission Electron Microscope (TEM) cihazında 120 kV'de görüntü alınmıştır.

2.2.9. Konfokal Mikroskopi ile Hücre İçindeki Eksozomların Görüntülenmesi

Konfokal Lazer Tarama Mikroskobunda Dil boyası ile işaretlenmiş eksozomların hücre içine girdiğinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, HUVEC ve H9C2 hücreleri her bir kuyucuğa yaklaşık 50,000 hücre gelecek şekilde 6-kuyucuklu hücre tabaklarına bölüştürülmüş ve %10 FBS, %1 PS içeren besiyerinde büyütülmüştür. Hücreler tabak yüzeyinin yaklaşık %50-60'ını kapladığında üzerlerindeki besiyeri çekilerek eksozom içermeyen FBS'li besiyeri ile değiştirilmiştir.

Dil boyası (1,1' Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate) ile işaretlenmiş eksozomların hazırlanması için 10 µM Dil'C18(3) (Invitrogen, Massachusetts, ABD, Katalog No: D3911) boyası ile 100 µg eksozom 1 mL toplam hacim PBS içerisinde karıştırılıp 40 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında artık boyaların uzaklaştırılması için 110,000 G'de, 2 saat, +4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet ise PBS ile çözülerek eksozom ile muamele edilecek hücrelere paylaştırılmıştır.

24 saat Dil boyalı eksozomlarla muamele edilen hücreler üzerindeki medya aspire edilip 2 defa 5'er dakika PBS yıkamasının ardından %3.7 paraformaldehit ile oda sıcaklığında ve karanlıkta, 5 dakika fikse edilmiş ve yeniden 2 defa 5'er dakika PBS yıkaması yapılmıştır. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyası (Fluoroshield

Mounting Medium with DAPI, Abcam, İngiltere, Katalog No: ab104139) ile lam üzerine kapatılan örnekler Konfokal Lazer Tarama Mikroskopunda (Zeiss LSM 880, AxioObserver) Dil ve DAPI (emisyon dalgaboyları sırasıyla 611 ve 498 nm) kanallarında görüntülenmiş ve görüntüler birleştirilmiştir.

2.2.10. Matrijel ile İnvazyon Testi (Hücre Göçü)

İnvazyon testinde, ticagrelor ile ön muameleye tabi tutulmuş MKH'lerden salınan eksozomların hücre göçüne etkisinin H9C2 hücreleri kullanılarak gösterilmesi hedeflenmiştir. H9C2 sıçan kardiyomiyosit hücrelerinin, in vitro olarak hücre göçünü ölçmek için Matrijel (Biolegend, SanDiego, Katalog No: 104905) ve 24 kuyucuklu hücre tabaklarına uyumlu, 8.0 µm gözenek çaplı ThinCert™ (Greiner Bio-one, Avusturya, Katalog No: 662638) hücre kültürü zarları kullanılmıştır. Bu gözenekli membran ile biri FBS'li ve biri FBS'siz olacak şekilde iki ayrı hücre besiyeri ortamı ayrılmış, zardaki gözenekleri bloke ederek ekstraselüler matrisi (ESM) taklit etmek amacıyla ise Matrijel kullanılmıştır. İnvaziv hücreler matrisi bozmak suretiyle ESM katmanını aşarak zarın altındaki haznede toplanırken, non-invaziv hücreler ESM katmanından geçememekte ve üst haznede kalmaktadır. Bu şekilde, gözenekli zarın altına geçmiş olan hücrelerin boyanıp sayılmasıyla, hücrelerin invazyon yeteneği hakkında fikir edinilebilmektedir.

Matrijel bazal membran matrisi 100 µL FBS- medya ile 250 µg/mL konsantrasyona seyreltilerek 24 kuyucuklu hücre tabaklarının yüzeyi kaplanmış ve 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilerek jelleşmesi sağlanmıştır. Ertesi gün Matrijel üzerinde yer alan alt hazneye 750 µL %10 FBS'li medya, ThinCert membranların üstündeki hazneye ise her bir kuyucuğa 50,000 hücre gelecek şekilde, H9C2 hücreleri 200 µL FBS- medya içerisinde ekilmiştir. Hücreler ekimden hemen sonra deney gruplarına göre 1 µg/mL veya 10 µg/mL ticagrelorlu veya ticagrelorsuz eksozom ile muamele edilerek 72 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiş ve hücre göçü gözlenmiştir.

72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda besiyerleri uzaklaştırılmış, membranlar 1xPBS ile 2 defa yıkanmış ve %3.7 PFA ile 2 dakika, oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Sonrasında yeniden 1xPBS ile 2 defa yıkanan membranlar 20 dakika %100 metanolde bekletilerek permeabilize edilmiştir. Yeniden 1xPBS ile 2 defa yıkanan membranların her birine yaklaşık 500 µL Gimsa boyası eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilerek boyanmıştır. Membranların üstünde kalan non-invaziv hücreler silinmiş ve son defa 1xPBS ile 2 defa yıkanan membranlar kurutulduktan sonra bistüri yardımıyla kesilerek çıkarılmıştır ve mounting buffer ile lama sabitlenerek numuneler hazırlanmıştır. Hücreler floresan mikroskopun (Zeiss, Axio Vision, Almanya) Brightfield modunda görüntülenmiş ve 10x,20x,40x büyütmelemlerde 5 ayrı bölgeden görüntü alınarak invaziv hücre sayıları tayin edilmiş ve ortalama alınmıştır.

2.2.11. Çizik Testi (Yara İyileşmesi)

Yara iyileşmesi veya çizik testi, in vitro hücre göçünün analizi için uygun ve ucuz bir yöntemdir. Bu deneylerde de endotelial hücrelerin hücre göçüne uygun nitelikleri dolayısıyla yine HUVEC hücre hattı ile çalışılmaktadır. Ticagrelor ile ön muameleye tabi tutulmuş MKH'lerden salınan eksozomların hücre göçüne etkisi HUVEC hücreleri kullanılarak gösterilmiştir.

6 kuyucuklu hücre tabaklarına her bir kuyucuğa 80.000 hücre gelecek şekilde HUVEC hücreleri ekilmiş ve hücrelerin yüzeyin tamamını kaplamasını takiben, her kuyucuğa çapı boyunca 2 mm eninde çizikler atılmıştır. Hücreler, çizigin atılmasından sonraki 48 saat boyunca 37° C'de 1 µg eksozom ile inkübe edilerek hücrelerin çizik bölgesine göçü gözlenmiş ve bir yara iyileşmesi modeli simüle edilmiştir (Bitirim ve ark., 2021). Hücreler ışık mikroskobu altında (Zeiss Axio Vert) her 6 saatte bir görüntülenmiş ve çizik bölgesindeki kapanma ImageJ programı (NIH, USA) üzerindeki "Wound-Healing Size Plugin" (Suarez-Arnedo ve ark., 2020) kullanılarak belirlenmiştir. Hücre göçü miktarı ve yara iyileşmesi yüzdeleri ise Denklem 2.3'te gösterilen formüllerle hesaplanmıştır.

W: çizik genişliği (i: başlangıç, f: final)

A: yara alanı

t: zaman (saat), Δt: belli bir ana kadar geçen toplam zaman

Hücre Göçü Miktarı;

$$R_M = \frac{W_i - W_f}{t}$$

Yara İyileşme Yüzdesi;

$$\% WC = \left(\frac{A_{t=0} - A_{t=\Delta t}}{A_{t=0}} \right) \times 100$$

Denklem 2.3. Çizik testi sonucu hücre göçü miktarı ve yara iyileşmesi yüzdelерinin hesaplanması.

2.2.12. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için yaklaşık 800,000 kemik iliğı kaynaklı mezenkimal kök hücresi 2 farklı T75 hücre flaskına ekilerek 37°C’de inkübe edilmiş ve en az %80 konfluent olmaları beklenmiştir. Yeterli oranda konfluent olan flasklardan birine 1 µM (10⁻⁶ M) ticagrelor 10 mL hücre besiyeri (%20 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren MSC NutriStem XF Medium) içerisinde uygulanmıştır. Kontrol grubu içinse herhangi bir uygulama yapılmaksızın 10 mL taze besiyeri verilmiştir.

Ticagrelor ile muamele edilen ve edilmeyen MKH’lerin 37 °C’de 48 saat inkübasyonunun ardından hücrelerin üzerlerindeki besiyeri çekilmiş ardından 2 defa 1xPBS ile yıkama yapıldıktan sonra hücreler hücre kazıyıcı ile (Corning, New York, ABD) kaldırılmıştır. Ardından 1200 RPM’de 5 dk santrifüj ile pellet haline getirilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

RNA izolasyonunda RiboEx™ Total RNA İzolasyon kiti (GeneAll Biotechnology, Katalog No: 301-001, Kore) kendi protokolü izlenerek kullanılmıştır (GeneAll, 2017). Elde edilen RNA örneklerinin kantitasyon (yoğunluk) ve kalifikasyon (saflık) değerleri Epoch Spektrofotometri cihazı (Biotek, ABD) ile ölçülmüştür. RNA örneklerinin saflığının hesaplanma prensibi Denklem 2.4'te gösterilen şekildedir. 260 nm'deki ve 280 nm'deki absorbans ölçümleri oranı 2.0-2.1 arasında yer alan örnekler için saf RNA olduğu ifade edilebilecekken, oran bu değerin altına düştüğünde DNA kontaminasyonundan şüphe edilmektedir.

Saf RNA örneği için;

$$A_{260}/A_{280} \geq 2.0$$

Denklem 2.4. RNA Örnekleri için saflık hesaplaması.

Spektrofotometrik ölçümle RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıklarının belirlenmesinin ardından, RNA örneklerinden 2 µL kadarı 1:1 yükleme boyası ile karıştırılarak hazırlanan örnekler öncelikle, 65 °C'de 10 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiştir. Ardından %1'lik agaroz jelde 70 Volt gerilimde RNA örneklerine jel elektroforezi yapılarak örneklerde RNA bandının varlığı kontrol edilmiş, ayrıca degradasyon ve DNA kontaminasyonu olmadığı da gösterilmiştir. Deneysel prosedür boyunca buz üzerinde çalışılmış ve total RNA ürünleri -80 °C'de saklanmıştır.

2.2.13. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile miRNA İfadesi Ölçümü

Kardiyogenez, kalp fonksiyonu ve kardiyovasküler hastalık patolojisinde önemli rol oynadığı belirlenen miRNA'ların (miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499) ve bu miRNA'ların hedef genlerinin belirlenmesinde TargetScan v7.2 (Dwep ve Gretz, 2015) ve miRDB (Chen ve Wang, 2020) veritabanları, Bitirim ve arkadaşları (2021) tarafından tarif edilen şekilde kullanılmıştır.

48 saatlik 1 μ M ticagrelor tedavisi sonrası MKH’lerde seçilen miRNA’ların ifadelerinin değişimini saptamak amacıyla Stem-loop RT-qPCR (Kök döngü kantitatif ters transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu) (Kramer, 2011) yöntemi uygulanmıştır. miRNA dizileri miRBase (miRBase, University of Manchester) data yazılımı yardımıyla belirlenmiştir. Forward miRNA primer sekansları “Genomics miRNA primer design” ve Primer3 (Primer3, University of Tartu) programları ile dizayn edilmiş ve Bitirim ve arkadaşları (2021) tarafından uygulanan miRNA qRT-PCR yöntemi ile primer dizaynları referans alınmıştır ve Stem-loop primer sekansları Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. miRNA-qRT-PCR prosedüründe kullanılan stem-loop primer sekansları.

miRNA	Stem-loop primer sekansları
miR-1-5p	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG GGG TAC ATA-3'
miR-133a-5p	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC ATT TGG TTC- 3'
miR.-133b-5p	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC ACT TGG TTC- 3'
miR-499-5p	5'- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC AAA CAT CAC TG- 3'

Stem-loop cDNA sentezinde, ticagrelor uygulaması yapılmış ve yapılmamış MKH’lerden izole edilen saf total RNA numuneleri Entlink cDNA sentez kiti (Elk Biotechnologies, Wuhan) kullanılarak, üretici tarafından tavsiye edilen deneysel prosedür takip edilerek ters transkripte edilmişlerdir. 1000 ng RNA, 1 μ L gDNA silici, 2 μ L 5xgDNA silici ve ddH₂O ile toplam 10 μ L hacme tamamlanarak 42 °C’de 2 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 2 μ L RT Primer karışımı, 1 μ L 10 mM dNTP karışımı ve 2 μ L ddH₂O ilave edilerek 15 μ L’ye ulaşan toplam hacim 5 dakika 70 °C’de inkübe edilmiştir. Son olarak 1 μ L ters transkriptaz ile 4 μ L 5xRT tampon eklenmiştir. Karışım elle hafifçe karıştırıldıktan sonra 30 saniye kadar mini-spin ile karışımın çökmesi sağlanmış ve 37 °C’de 60 dakika, hemen arkasından 95 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Deneysel prosedür boyunca buz üzerinde çalışılmış ve cDNA ürünleri -20 °C’de saklanmıştır.

Normalizasyon için miRNA normalizasyonunda sıklıkla kullanılan küçük nükleer RNA RNU6B (U6) kullanılmıştır (Yand ve ark., 2014). miRNA-1, miRNA-133a, miRNA-133b ve miRNA-499 için kullanılan forward primerler, U6 forward ve reverse primerleri ile antisens olarak kullanılan universal reverse primerin dizileri Çizelge 2.3'te sunulduğu biçimdedir.

Çizelge 2.3. miRNA-qRT-PCR prosedüründe kullanılan forward ve reverse primer sekansları.

miRNA	Primer sekansları
miR-1-Forward	5'- GAT CAG GCA CAT ACT TCT TTA -3'
miR-133a-Forward	5'- GAT GAG AGC TGG TAA AAT GG -3'
miR.-133b- Forward	5'- TAA TAA GCT GGT CAA ACG GA -3'
miR-499- Forward	5'- GAT TAA TTA AGA CTT GCA GTG CA -3'
U6-Forward	5'- GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T -3'
U6-Reverse	5'- CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT -3'
Universal reverse primer	5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'

Tüm primerler için PCR ürünlerini çoğaltmak ve miRNA ifadesini saptamak için LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche, Katalog No: 04707516001) kullanılmıştır. Sonuçlar relative CT metodu ile ($2 - \Delta\Delta CT$) analiz edilmiştir (Kang ve ark., 2017).

2.2.14. Ticagrelor Uygulanan MKH'lerin Gen İfadelerindeki Değişimin Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile İncelenmesi

İnsan MKH'leri 6 kuyucuklu hücre tabaklarına ekilerek besiyeri üç günde bir taze %20 fetal sıgır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren MSC-NutriStem Medium ile değiştirilmiş ve hücrelerin çoğalarak yüzeyi %80-90 oranında kaplaması beklenmiştir. Yüzeyin kaplanması ardından, ticagrelor grubu hücrelere 1 μM

ticagrelor uygulaması yapılmış, kontrol grubu hücrelere herhangi bir kimyasal verilmemiş olup hücreler 37° C'de 48 saat kültür edilmiştir.

Kültürü tamamlanan hücrelerden RiboEx (GeneAll, Kore) ile 2.2.10'uncu kısımda tarif edilen şekilde total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra ters transkripsiyon yöntemi ile cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezinde, ticagrelor uygulaması yapılmış ve yapılmamış MKH'lerden izole edilen saf total RNA numuneleri Entlink cDNA sentez kiti (Elk Biotechnologies, Wuhan) kullanılarak, üretici tarafından tavsiye edilen deneysel prosedür takip edilerek ters transkripte edilmişlerdir. 1000 ng RNA, 1µL gDNA silici, 2µL 5xgDNA silici ve ddH₂O ile toplam 10 µL hacme tamamlanarak 42 °C'de 2 dakika inübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 2 µL RT Primer karışımı, 1 µL 10 mM dNTP karışımı ve 2 µL ddH₂O ilave edilerek 15 µL'ye ulaşan toplam hacim 5 dakika 70 °C'de inkübe edilmiştir. Son olarak 1 µL ters transkriptaz ile 4 µL 5xRT tampon eklenmiştir. Karışım elle hafifçe karıştırıldıktan sonra 30 saniye kadar minispin ile karışımın çökmesi sağlanmış ve 37 °C'de 60 dakika, hemen arkasından 95 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Deneysel prosedür boyunca buz üzerinde çalışılmış ve cDNA ürünleri -20 °C'de saklanmıştır.

Hücresel stres, otofaji ve apoptoz belirteci (GRP78, Bnip3, Beclin-1, Calregulin ve ENT-1) genlerinin ifadelerinin qRT-PCR ile mRNA düzeyinde incelenmesi amacıyla, gen dizileri Ensembl Genom Tarayıcı'dan (Ensembl Genome Browser, ensembl.org) belirlenmiştir. İleri ve geri primer sekansları Primer3 (Primer3, University of Tartu) ile dizayn edilmiştir ve primer dizileri Çizelge 2.4'te sunulan şekildedir. Normalizasyon için GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) geni kullanılmıştır. Seçilen tüm genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ürünlerini amplifiye etmek ve eşzamanlı olarak ölçmek için GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, A6001) ve quantitative real-time PCR cihazı (Roche Light Cycler 480) kullanılmıştır. PCR reaksiyonu koşulları ve siklus detayları ise Çizelge 2.5'te özetlenen şekildedir. Sonuçlar Delta Delta CT metodu ile analiz edilmiştir.

Çizelge 2.4. qRT-PCR prosedüründe kullanılan forward ve reverse primer sekansları.

Gen	İleri Primer Sekansı (5'-3')	Geri Primer Sekansı (3'-5')	PCR Ürünü Uzunluğu (bp)
Beclin-1	GTGAACAGTTACAGATGGAGCT	GCTTCCTCCTGATCCAGTCT	151
Bnip3	CAGCAATAATGGGAACGGGG	GAGCTACTCCGTCCAGACTC	108
Calreticulin	ACACACCTGTACACACTGATTG	CTCATCCCAGTCTTCCGGTT	159
ENT-1	TCCCAGAATGTGTCCTTGGT	GGAAGGAGTTGAGGTAGGTGA	169
GRP78	GAAGACTTTGACCAGCGTGT	TCAAATTTGGCCCGAGTCAG	218

Çizelge 2.5. qRT-PCR reaksiyonu koşulları.

Başlangıç Denatürasyonu	95°C	5 dk.	} (40 siklus)
Denatürasyon	95°C	30 sn.	
Bağlanma	60°C	20 sn.	
Uzama	72°C	1 dk.	
Final Uzama	72°C	5 dk.	

2.2.15. Eksozom Uygulanan Endotel Hücrelerin Gen İfadelerindeki Değişimin Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile İncelenmesi

6 kuyucuklu hücre tabaklarına ekilen insan endotel hücrelerinin (HUVEC) besiyeri üç günde bir taze %10 fetal sıgır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM F-12 ile değiştirilmiş ve hücrelerin çoğalarak yüzeyi %80-90 oranında kaplaması beklenmiştir. Bunun ardından hücrelere, deney gruplarına göre, fetal sıgır serumu içermeyen 1 mL DMEM F-12 medya içinde 1 µg eksozom uygulanmıştır. -Eksozom kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken, +Eksozom ve +Eksozom (Tica) gruplarına sırasıyla Ticagrelor uygulanmamış ve uygulanmış MKH'lerden toplanan eksozomlar 1 µg/mL final konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hesaplanarak 48 saat süreyle 37° C'de muamele edilmiştir.

Kültürü tamamlanan hücrelerden RiboEx (GeneAll, Kore) ile 2.2.10'uncu kısımda tarif edilen şekilde total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra GRP78, Bnip3, Beclin-1, Calregulin ve ENT-1 genlerinin ifadeleri qRT-PCR ile mRNA düzeyinde incelenmiştir. Normalizasyon için GAPDH geni kullanılmıştır. Seçilen tüm genlerin PCR ürünlerini amplifiye etmek ve eşzamanlı olarak ölçmek için GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, A6001) ve quantitative real-time PCR cihazı (Roche Light Cycler 480) kullanılmış ve PCR tepkimesi 2.2.12'inci kısımda tarif edilen şekilde kurulmuştur. Sonuçlar Delta Delta CT metodu ile analiz edilmiştir.

2.2.16. İstatistiksel Analiz

Deney tekrarları n=3 olarak şekilde gerçekleştirilmiş; sonuçlar GraphPad (Prism 5.0) yazılımı grafikleştirilmiş ve istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar deney değerlendirmesine uygun olarak parametrik ve non-parametrik testler ile (Student t-test ve ANOVA) ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama (standart sapmalı) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre değerlendirilmiştir. Anlamlılık derecelendirmeleri ise $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$ şeklinde gösterilmiştir.

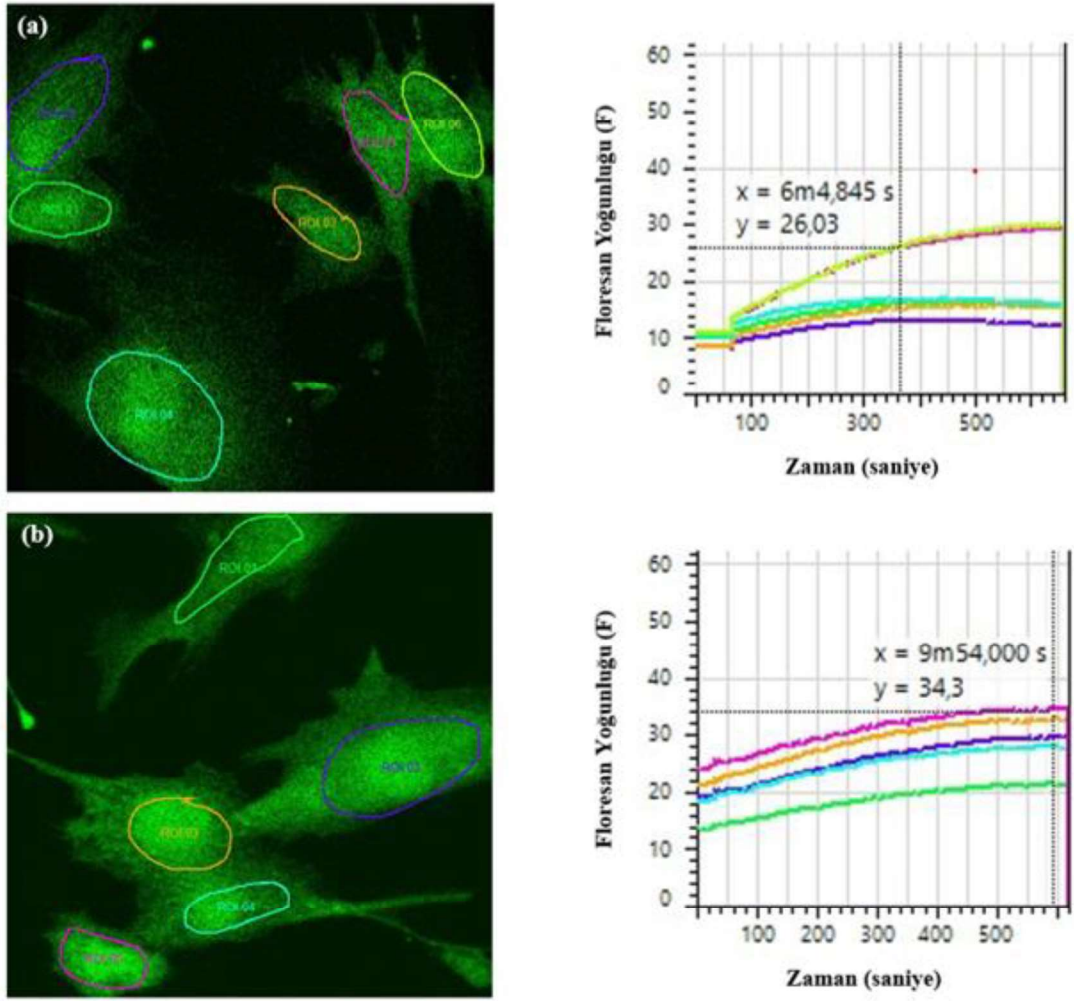
3. BULGULAR

Ticagrelor'un, mezenkimal kök hücrelerdeki antioksidan, düzenleyici, pro-anjiyonjenik ve proliferatif etkilerinin incelendiği bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda ticagrelor uygulamasını takiben MKH'lerden ROS ölçümü alınarak hücre içi oksidatif stres incelenmiştir. Bunlara ek olarak, diyabetle ve kardiyovasküler hastalıklarla bağlantısı bilinen mikroRNA'ların ve hücresel stres, otofaji ve apoptoz belirteci olarak kabul edilen çeşitli genlerin ifadelerinin MKH'lere ticagrelor uygulamasıyla nasıl değişim gösterdiği araştırılmıştır.

Sonrasında, ticagrelor uygulanmış sağlıklı insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomlar, HUVEC ve H9C2 hücrelerine verilerek; yara iyileşmesi ve hücre göçüne etkileri incelenmiştir.

3.1. Hücre İçi Oksidatif Stres (ROS) Ölçümü

Farklı konsantrasyonlarda ticagrelor uygulamasını takiben, MKH'lere 1-3-6-24 ve 48. saatlerde DCFDA boyaması yapılmış, sonrasında hücrelere akut H_2O_2 uygulanmış ve konfokal mikroskopla hücre içi floresan sinyal ölçümü alınarak ROS miktarı tayin edilmiştir. Ticagrelor uygulanmamış kontrol grubu hücrelerinden ve ticagrelorlu mezenkimal kök hücrelerden alınan floresan görüntüsü ve akut H_2O_2 ile muameleyi takiben hücrelerden alınan ortalama floresan sinyal yoğunluğunun zamana bağlı değişimi sırasıyla Şekil 3.1 a ve b'de gösterilmiştir.

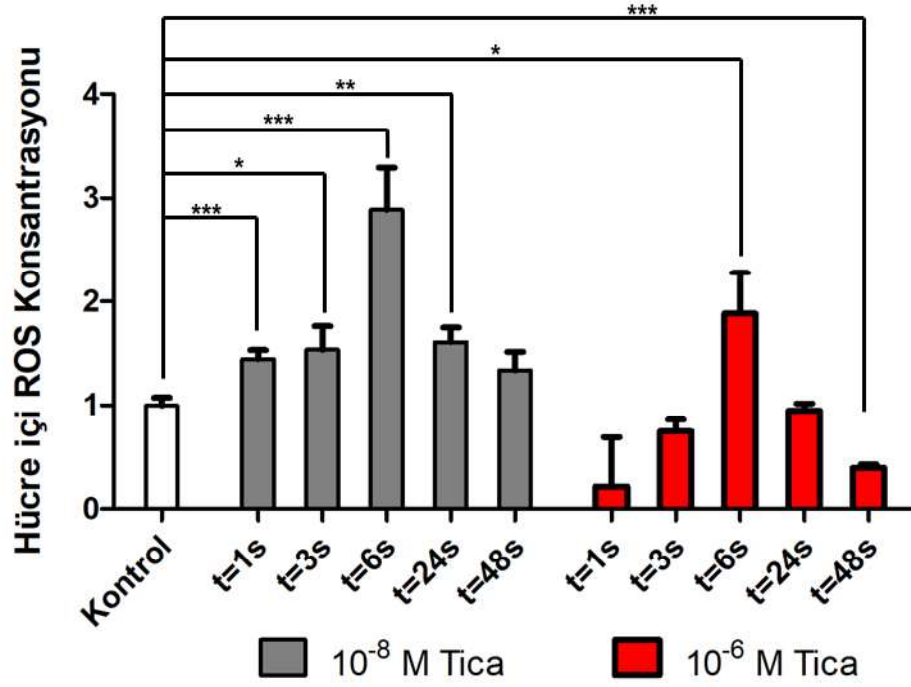


Şekil 3.1. (a) Ticagrelor uygulanmamış kontrol grubu mezenkimal kök hücrelerden (b) Ticagrelor uygulanan mezenkimal kök hücrelerden alınan floresan görüntüsü ve akut H_2O_2 muamelesini takiben bu hücrelerden alınan ortalama floresan sinyal yoğunluğunun zamana bağlı değişim grafiği.

Hem 10^{-8} M, hem de 10^{-6} M konsantrasyonda en yüksek hücre içi ROS miktarı 6. saatte gözlemlenmiştir. 10^{-8} M ticagrelor uygulamasının ardından 6. saatte hücre içi ROS miktarı kontrolün 2.89 katına ulaşırken ($P < 0.0001^{***}$), 10^{-6} M uygulamanın ardından ise 6. saatte hücre içi ROS miktarı kontrolün 1.88 katıdır ($P = 0.0167^*$). Hücre içi ROS miktarı, 10^{-8} M ticagrelor uygulamasını takip eden 1. saatte kontrolün 1.44 katına ($P = 0.0006^{***}$), 3. saatte kontrolün 1.54 katına ($P = 0.0152^*$), 24. saatte kontrolün 1.61 katına ($P = 0.0014^{**}$) eşit olup, 10^{-8} M için ölçülmüş en düşük ROS değeri 48. saat için ticagrelorsuz kontrolün 1.34 katıdır. 10^{-6} M ticagrelor ile muamele edilen hücrelerin, her ölçüm saati için 10^{-8} M ile muamele edilen hücrelere göre daha

düşük ROS miktarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. 10^{-6} M ticagrelor ile muamele edilen hücreler için ise, en düşük ROS miktarı sırasıyla 1. (kontrolün %21.9'u) ve 48. saatlerde (kontrolün %39.8'i, $P=0.0648^*$) ölçülmüştür.

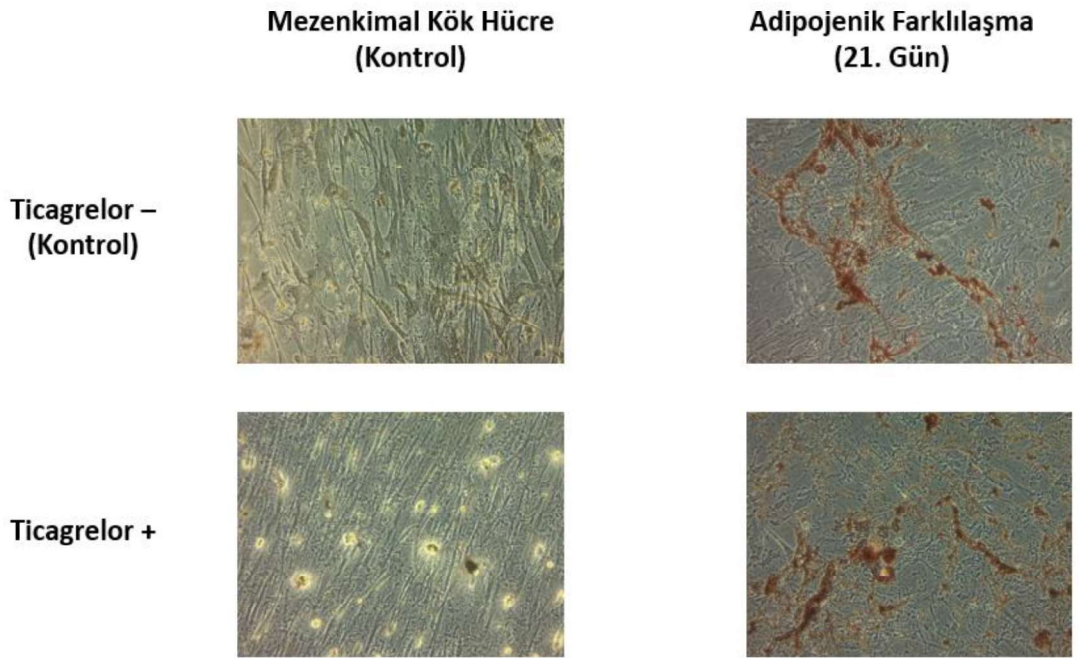
Her iki konsantrasyon için de $t=1$, $t=3$, $t=6$, $t=24$ ve $t=48$ saatlerinde alınan hücre içi ROS ölçümü sonuçları Şekil 3.2'de sunulmuştur. Aynı zamanda bu şekilde ticagrelor'un antioksidan etkisinin en yüksek verimde olduğu zaman ve dozaj belirlenerek 48 saat ve 10^{-6} M konsantrasyonda ticagrelor uygulanmış MKH'lerden eksozom izole edilmesi kararlaştırılmıştır.



Şekil 3.2. 10^{-8} M ve 10^{-6} M ticagrelor ile muamele edilmiş mezenkimal kök hücrelerden $t=1$, $t=3$, $t=6$, $t=24$ ve $t=48$ saatlerinde alınan hücre içi ROS ölçümü sonuçları.

3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaştırılması ve Oil Red O Boyası ile Boyanması

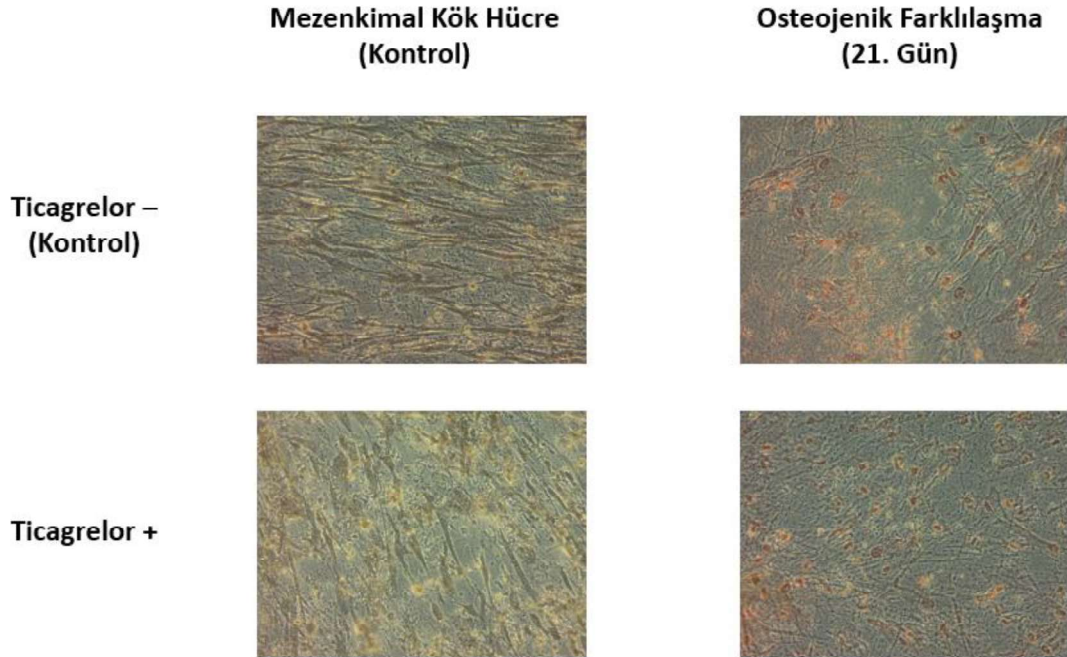
MKH'lerin potenslerini koruması veya adipositlere farklılaşması sırasında ticagrelorun etkili olup olmadığını araştırmak amacıyla, hücreler 21 gün süreyle adipojenik indüksiyona tabi tutulurken aynı zamanda ticagrelor ile muamele edilmişlerdir. Farklılaşmayı kontrol etmek için adipojenik indüksiyonun 21. gününde Oil Red O ile boyanmış ve ışık mikroskobunda görüntü alınmıştır. Negatif kontrol olarak hücreler, ticagrelor varlığında ve yokluğunda 21 gün boyunca hiçbir farklılaşma indüksiyon faktörü olmadan DMEM-Low Glucose içinde inkübe edilmiştir. İndüklenmemiş hücreler de farklılaşmanın 21. gününde Oil Red O boyası ile boyanmıştır (Şekil 3.3). İndüksiyonun 21. gününün sonunda adipojenik indüksiyona tabi tutulan hücrelerde lipid vakuol oluşumu artmıştır. Negatif kontrollerde ise yağ damlacığı görülmemiştir.



Şekil 3.3. Kontrol (ticagrelorsuz) ve Ticagrelorlu Mezenkimal Kök Hücrelerin 21 gün boyunca adipojenik farklılaştırma prosedürü sonrası Oil Red O boyası ile muamele edilerek alınan ışık mikroskobu görüntüleri.

3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaştırılması ve Alizarin Red S Boyası ile Boyanması

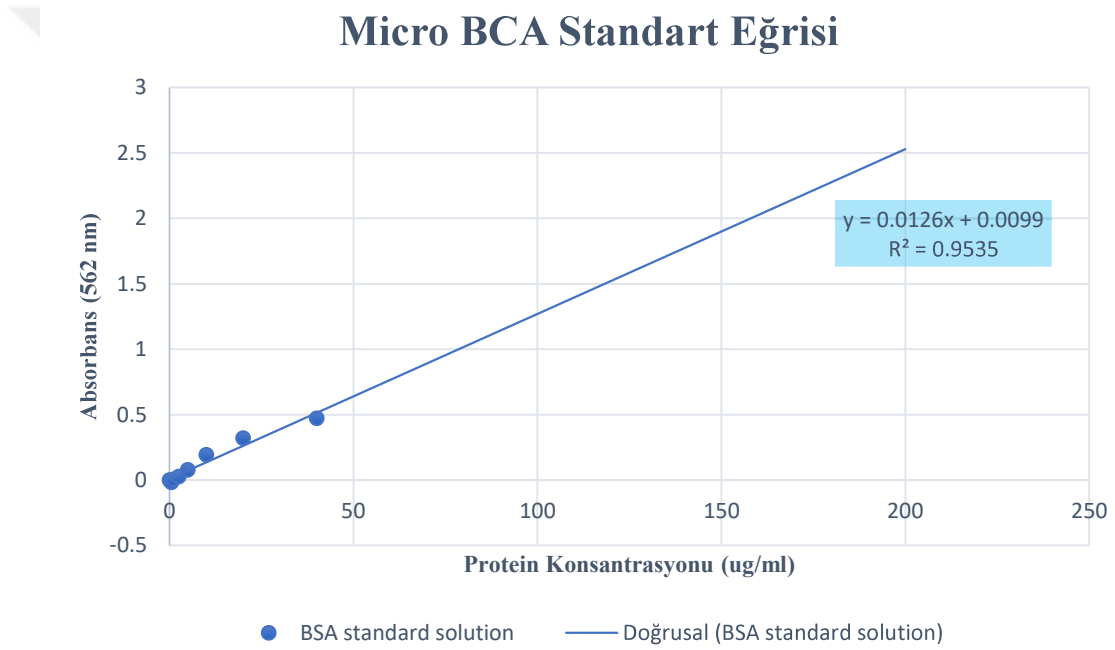
MKH'lerin potenslerini koruması veya osteositlere farklılaşması sırasında ticagrelorun etkili olup olmadığını araştırmak amacıyla, hücreler 21 gün süreyle osteojenik indüksiyona tabi tutulurken aynı zamanda ticagrelor ile muamele edilmişlerdir. Farklılaşmayı kontrol etmek için osteojenik indüksiyonun 21. gününde Alizarin Red S ile boyanmış ve ışık mikroskobunda görüntü alınmıştır. Negatif kontrol olarak hücreler, ticagrelor varlığında ve yokluğunda 21 gün boyunca hiçbir farklılaşma indüksiyon faktörü olmadan DMEM-Low Glucose içinde inkübe edilmiştir. İndüklenmemiş hücreler de farklılaşmanın 21. gününde Alizarin Red S boyası ile boyanmıştır (Şekil 3.4). İndüksiyonun 21. gününün sonunda osteojenik indüksiyona tabi tutulan hücrelerde kalsiyum birikintileri tespit edilmiştir. Negatif kontrollerde ise boyama görülmemiştir.



Şekil 3.4. Kontrol (ticagrelorsuz) ve Ticagrelorlu Mezenkimal Kök Hücrelerin 21 gün boyunca osteojenik farklılaştırma prosedürü sonrası Alizarin Red S boyası ile muamele edilerek alınan ışık mikroskobu görüntüleri.

3.4. Micro BCA ile Eksozom Kantifikasyonu

Eksozom izolasyonu sonrası micro BCA protein testi kullanılarak numunelerin eksozom içeriği analiz edilmiştir. Pierce™ BCA Protein Assay Kit (üretici tarafından sağlanan kılavuzuna uygun şekilde kullanılmış ve Şekil 3.5'te sunulmuş olan standart micro BCA (absorbans/konsantrasyon) eğrisindeki bilinen BSA (sığır serum albümin) protein konsantrasyonlarıyla karşılaştırılmıştır. Buna göre, ticagrelor ile muamele edilen ve edilmeyen MKH'lerden izole edilmiş numunelerdeki eksozom konsantrasyonu hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.



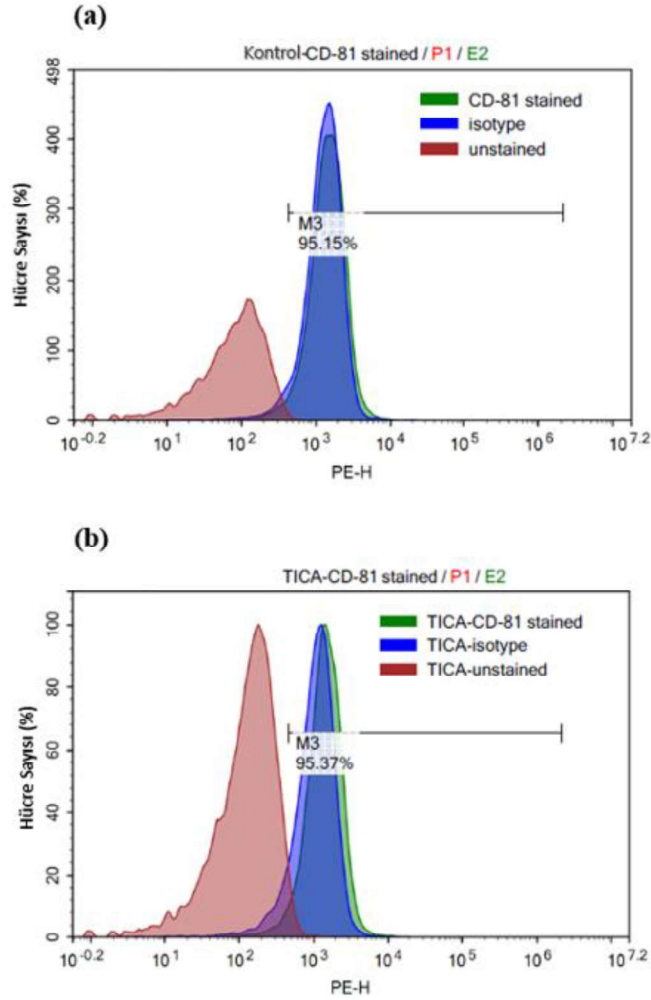
Şekil 3.5. BCA Protein Assay Kit Prosedürü kullanılarak BSA standardı için oluşturulmuş absorbans – protein konsantrasyonu eğrisi.

Çizelge 3.1. Micro BCA ile tayin edilen eksozom konsantrasyonları.

Numune	Konsantrasyon (µg/µL)
Kİ-MKH Eksozom Kontrol	0.342896825
Kİ-MKH Eksozom Ticagrelor	0.18218254

3.5. Akım Sitometri ile Eksozom Karakterizasyonu

Hem ticagrelor ile muamele edilmiş hem de edilmemiş mezenkimal kök hücrelerden alınan eksozomlar, akım sitometrisi ile karakterize edilmiştir. 1×10^8 adet eksozom öncelikle insan CD9 antikoru ile kaplanmış manyetik boncuklarla inkübe edilmiş, ardından PE-konjuge insan CD81 antikoru ile inkübe edilmiş ve akım sitometrik ölçüm alınmıştır. Kontrol (ticagrelorsuz) ve ticagrelorlu eksozomlar için akım sitometri sonuçları sırasıyla, Şekil 3.6 a ve b’de gösterilen şekildedir. Detaylı akım sitometri sonuçları, hücre dağılımları ve kapılamalar ise Ek-3’te sunulmuştur.

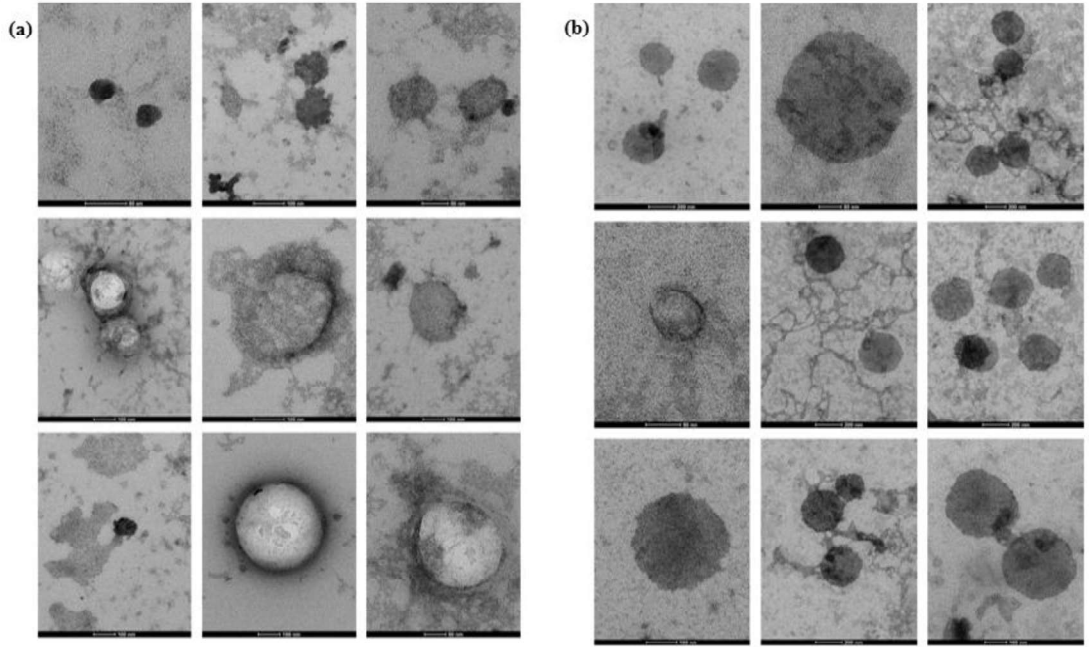


Şekil 3.6. (a) Kontrol (ticagrelorsuz) ve (b) Tica (ticagrelorlu) eksozomlar için akım sitometri sonuçları.

Stained (boyalı) olarak belirtilen örnekler PE-CD81 antikoru ile kaplanmışken, unstained (boyasız) örnekler CD81 antikoru ile muamele yapılmamıştır. Isotype (izotip) kontrolü ise, fare IgG-PE konjuge antikoru ile bağlanarak deneysel kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6. Elektron Mikroskobu (CTEM) ile Eksozomların Görüntülenmesi

Ticagrelorle muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerden izole edilen eksozom numuneleri Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu ile 120 kV'de alınan görüntüler Şekil 3.7'de sunulmuştur.

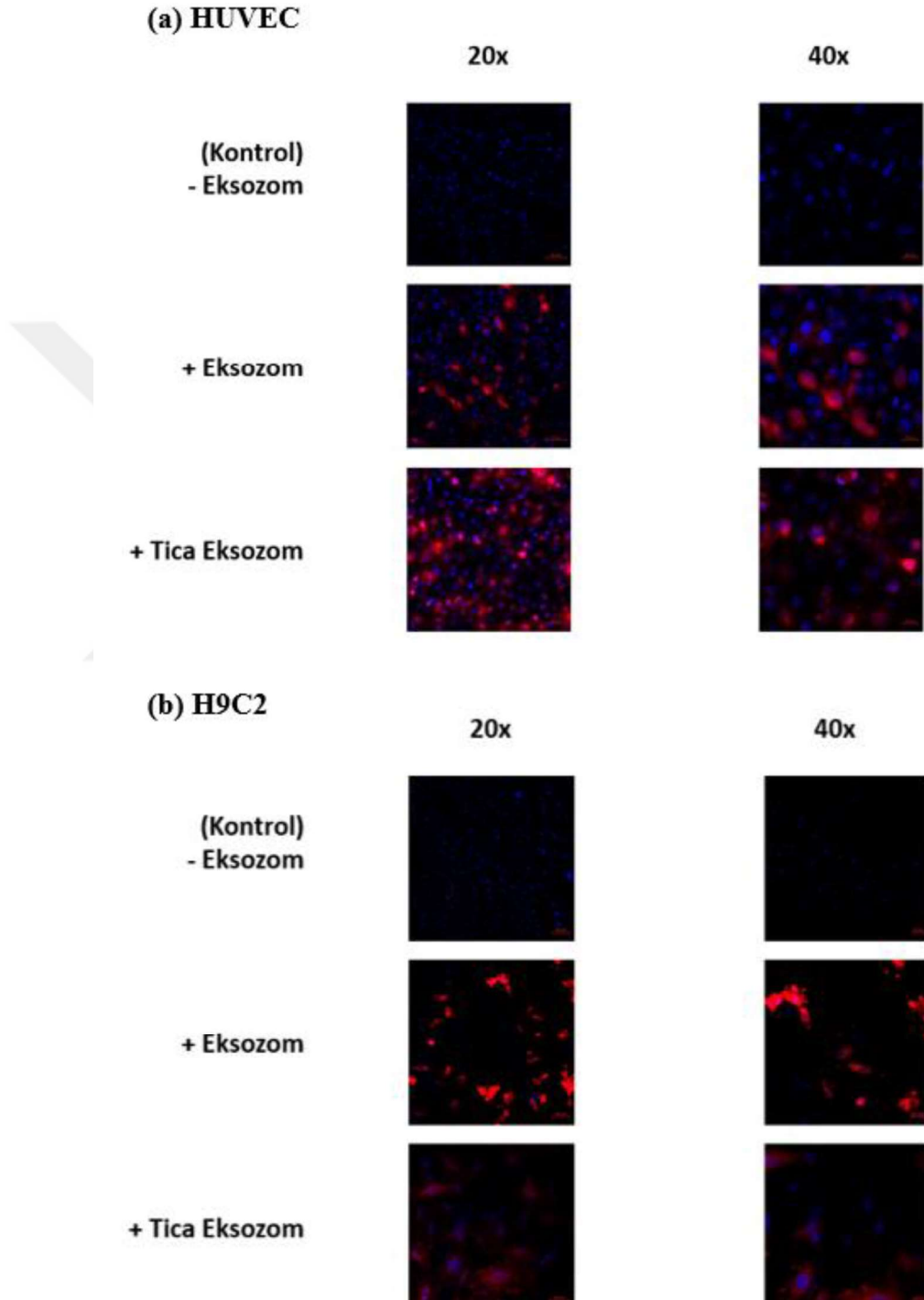


Şekil 3.7. (a) Kontrol (ticagrelorsuz) ve (b) Tica (ticagrelorlu) eksozomlar için representatif elektron mikroskobu görüntüleri.

3.7. Konfokal Mikroskopi ile Hücre İçindeki Eksozomların Görüntülenmesi

Hem ticagrelor ile muamele edilmiş hem de edilmemiş MKH'lerden alınan eksozomlar, akım sitometrisi ile karakterize edildikten ve konsantrasyon analizi

yapıldıktan sonra bu eksozomların H9C2 ve HUVEC hücreleri içerisine girdiği de konfokal mikroskopi (CLSM) ile doğrulanmıştır (Şekil 3.8).



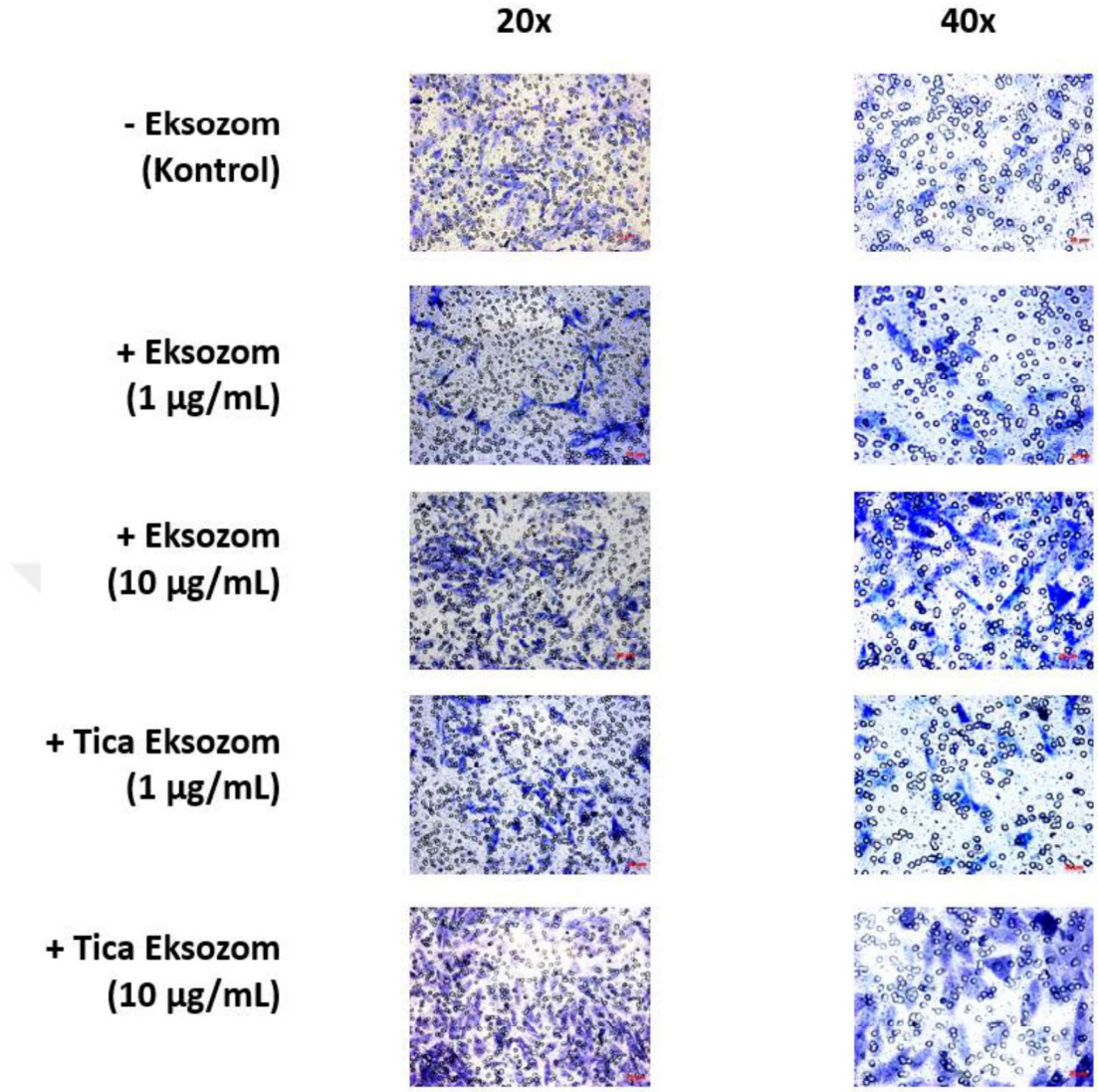
Şekil 3.8. (a) HUVEC ve (b) H9C2 hücreleri Dil boyası ile işaretlenmiş eksozomlar ile muamele edildikten sonra alınmış CLSM görüntüleri.

Hücreler, Dil'C18(3) boyası ile işaretlenmiş eksozomlar ile 24 saat inkübe edilmiş ve sonrasında DAPI çekirdek boyası ile preparatlar kapatılmıştır. CLSM ile hem mavi DAPI (hücre çekirdeklerini boyar) hem de kırmızı Dil (sitoplazmaya girmiş hücre dışı kesecikleri boyar) kanallarından görüntü alınmış ve görseller yazılım yardımıyla birleştirilmiştir. Ayrıca, kontrol hücrelerine de eksozom verilmese dahi, negatif görüntü almak üzere, eksozom içermeyen PBS de Dil'C18(3) boyası ile boyanmış ve hücreler 24 saatliğine muamele edilmiştir. Alınan görüntülerde, eksozom içermeyen hücrelerin sitoplazmasında Dil boyası kanalından herhangi bir ışıma alınmazken, hücre çekirdeklerinin DAPI ile boyandığı görülmektedir.

3.8. Matrijel ile İnvazyon Testi (Hücre Göçü)

MKH'lerden salınan eksozomların H9C2 hücrelerinin göçüne etkisinin gösterilmesinin hedeflendiği invazyon testinde, gözenekli zarın altına geçmiş olan hücreler Gimsa boyası ile boyanmıştır. Daha sonra floresan mikroskopta 10x, 20x ve 40x büyütmede alınan görüntüler (Şekil 3.9) üzerinden invaziv hücreler sayılarak, hücrelerin göç yeteneklerinin eksozom etkisiyle değişim göstermediği incelenmiştir.

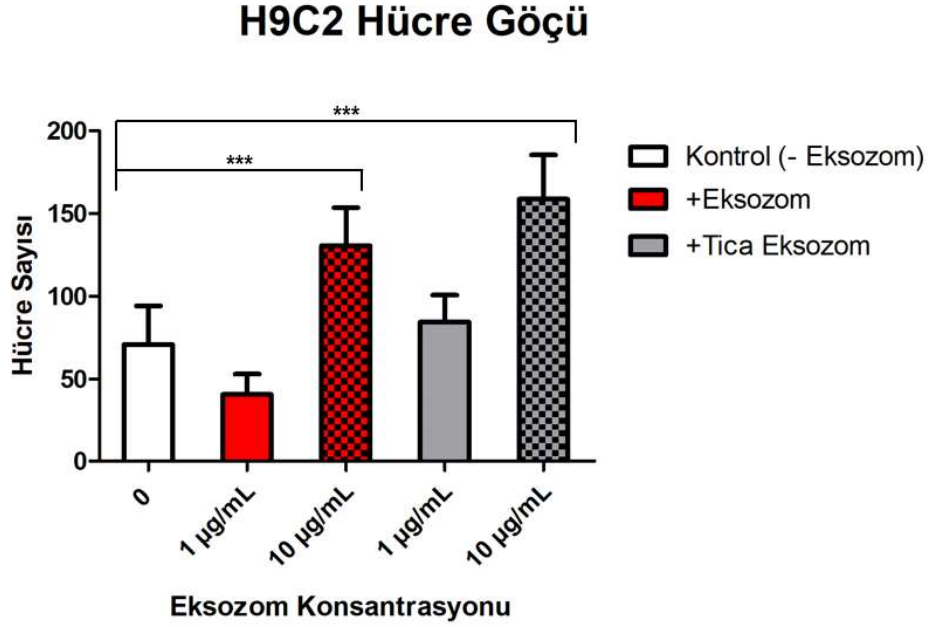
Uygulanan eksozom konsantrasyonu arttıkça hücre göçü de olumlu yönde etkilenmektedir (Şekil 3.10). 1 µg/mL kontrol eksozomla muamele edilen H9C2 hücrelerinde göç eden hücre sayısı eksozomsuz kontrolün %57'si ($P=0.0020^{**}$), 1 µg/mL ticagrelorlu eksozomla muamele edilen H9C2 hücrelerinde ise eksozomsuz kontrolün %119'u ($P=0.1437$) kadardır. 10 µg/mL kontrol eksozomla muamele edilen H9C2 hücrelerinde invazyon miktarı eksozomsuz kontrolün %184'ü ($P<0.0001^{***}$), 10 µg/mL ticagrelorlu eksozomla muamele edilen H9C2 hücrelerinde ise eksozomsuz kontrolün %224'ü ($P<0.0001^{***}$) kadardır.



Şekil 3.9. 72 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda eksozom ile muamele edilen ve gözenekli membrandan geçen H9C2 hücrelerinin Gimsa boyasıyla boyanarak alınan 20x ve 40x büyütmeleli representatif mikroskop görüntüleri.

Aynı konsantrasyonda uygulanmış olsalar bile, ticagrelorle muamele edilmiş MKH'lerden elde edilen eksozomlar, ticagrelorsüz olanlara göre hücre göçünü daha fazla artırma etkisine sahiptir (Şekil 3.10). 1 µg/mL ticagrelorlu eksozomla muamele edilen H9C2 hücrelerinden membrandan geçebilenlerin sayısı, aynı konsantrasyonda ticagrelorsüz eksozom verilen hücrelere göre 2.07 kat ($P < 0.0001^{***}$) fazladır. 10 µg/mL ticagrelorlu eksozomla muamele edilen H9C2 hücrelerinden membrandan

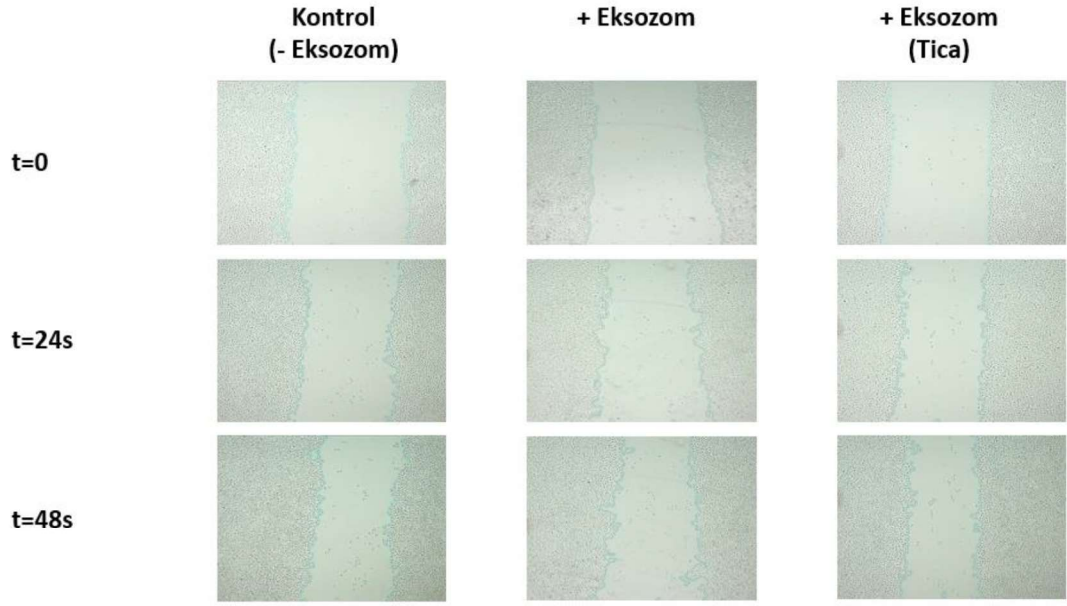
geçebilenlerin sayısı, aynı konsantrasyonda ticagrelorsuz eksozom verilen hücrelere göre 1.22 kat ($P=0.0206^*$) fazladır.



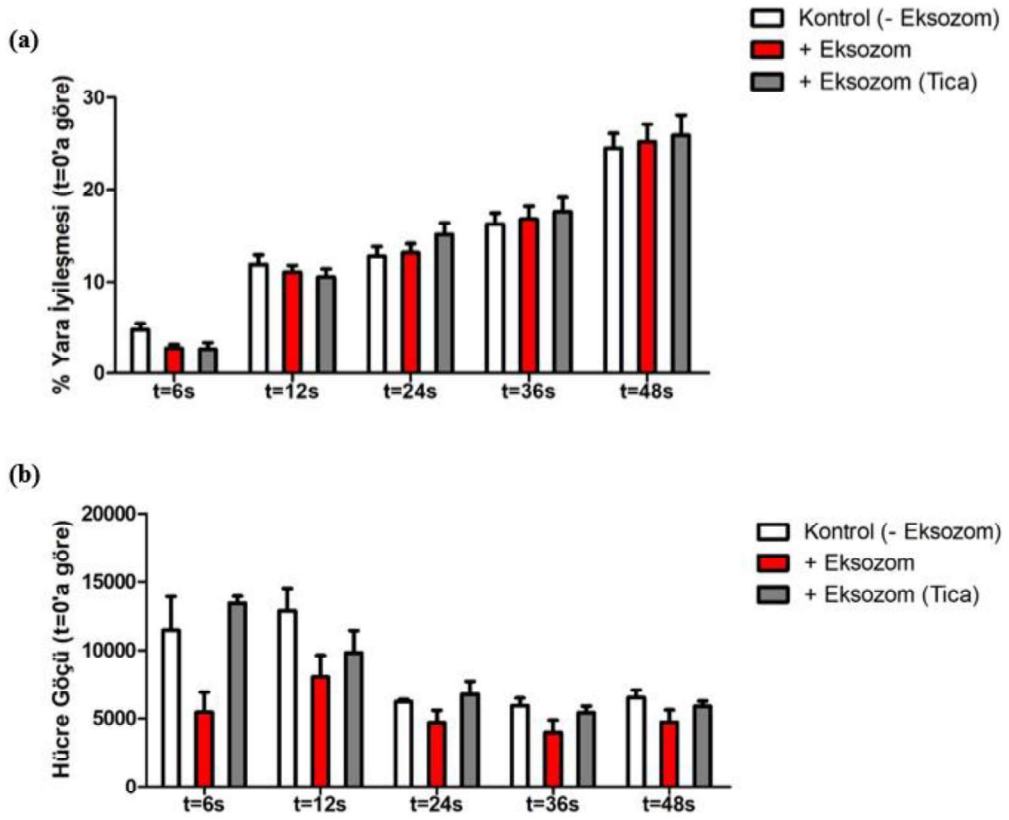
Şekil 3.10. 1 µg/mL ve 10µg/mL konsantrasyonlarda eksozomlarla muamele edilen ve edilmeyen H9C2 hücrelerine yapılan invazyon testinden 72 saat sonrası için hücre göçü miktarları.

3.9. Çizik Testi (Yara İyileşmesi)

Ticagrelor uygulanmış MKH'lerden izole edilmiş eksozomların hücre göçüne etkisi HUVEC hücreleri kullanılarak gösterilmiştir. Hücreler, çizik oluşturulmasından sonraki 48 saat boyunca 1 µg eksozom ile muamele edilerek hücrelerin çizik bölgesine göçü gözlenmiş ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Başlangıç anı ile 24. ve 48. saatlerdeki yara bölgesinin deney gruplarına göre karşılaştırmalı görselleri Şekil 3.11'de sunulmuştur. Yara bölgesindeki kapanma ve hücre göçü miktarı ImageJ programı (NIH, USA) kullanılarak hesaplanmıştır ve sonuç grafikleri Şekil 3.12 a ve b'de sunulmuştur.



Şekil 3.11. Çizik testinin başlangıç anı ile 24. ve 48. saatlerde yara bölgesindeki HUVEC hücreleri.



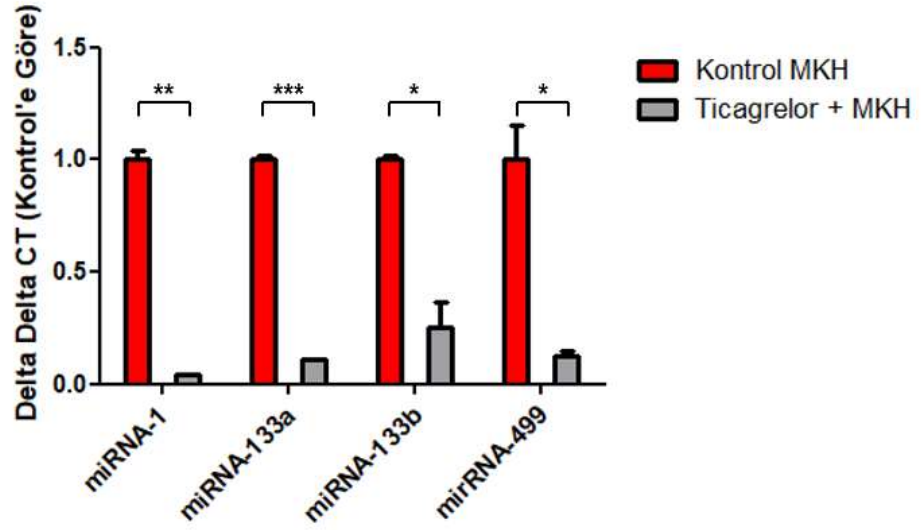
Şekil 3.12. HUVEC hücrelerine yapılan çizik testinden 48 saat sonrası için (a) yara bölgesindeki kapanma ve (b) hücre göçü miktarları.

24, 36 ve 48. saatlerde MKH eksozomuyla muamele edilmiş HUVEC'ler için yara iyileşme yüzdeleri kontrole göre daha yüksektir. 24. saatte kontrol için yara kapanması %12.77 iken, ticagrelorlu ve ticagrelorsuz MKH eksozomlarıyla muamele edilen HUVEC'lerde yara kapanması sırasıyla %13.14 ve %15.09, 36. saatte sırasıyla %16.23, %16.80 ve %17.59, 48. saatte ise sırasıyla %24.45, %25.13 ve %25.83 şeklinde gözlemlenmiştir. Başlangıçtan itibaren 0-12. saatler arasında ise eksozom verilmeyen hücrelerde yara kapanma yüzdesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark bulunmamaktadır.

Çizik testi sonuçlarına göre, eksozomsuz kontrol ve ticagrelorlu eksozomlu deney grupları için $t=0$ 'a göre hücre göçü miktarları, ticagrelorsuz eksozomla muamele edilen deney grubuna göre 48 saat boyunca daha yüksek olarak bulunmuştur. Ancak deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

3.10. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile miRNA İfadesi Ölçümü

Kardiyovasküler hastalıkların patolojisinde görevli olduğu düşünülerek belirlenen miRNA'ların (miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499) ifadelerinin ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerde farkını belirlemek amacıyla, öncelikle MKH'lerden total RNA izole edilmiştir. İzole edilen RNA numunelerinin verifikasyonu amacıyla agaroz jelde elektroforez yapılarak RNA bantları gösterilmiş (Ek-4) ve spektrofotometrik ölçüm ile RNA saflığı ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Buna göre de sırasıyla, stem-loop cDNA sentezi ve qRT-PCR işlemi yapılarak miRNA ifadesi araştırılmıştır. Sonuçların analizinde relative CT metodu ($2^{-\Delta\Delta CT}$) kullanılmış ve U6'ya göre normalize edilmiştir. Kontrol değerleri 1'e eşit kabul edilerek kat değişimi incelenmiş ve miRNA ifadelerini gösteren grafik Şekil 3.13'te sunulmuştur.



Şekil 3.13. Ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerdeki miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499 ifadeleri.

Tüm miRNA'ların ifadesinin ticagrelor ile muamele sonrası düştüğü saptanmıştır. Ticagrelorlu MKH grubunda, miR-1 kontrol MKH'lerin %4.42'si kadar ($P=0.0019^{**}$), miR-133a kontrolün %10.74'ü kadar ($P=0.0005^{***}$), miR-133b kontrolün %25'i kadar ($P=0.0234^{*}$) ve miR-499 kontrolün %12.39'u kadar ($P=0.0284^{*}$) ifade edilmektedir.

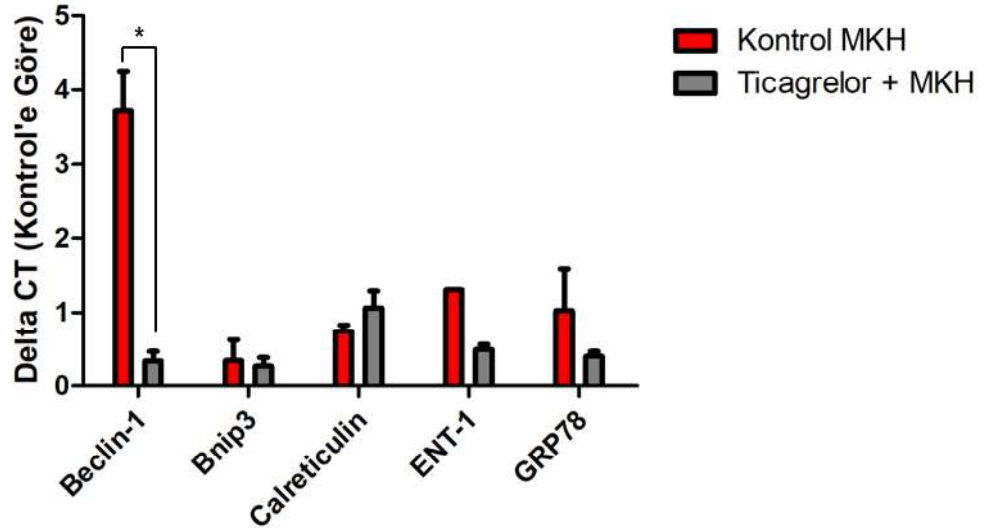
3.11. Ticagrelor Uygulanan MKH'lerin Gen İfadelerindeki Değişimin Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile İncelenmesi

Kök hücrelerin kendini yenilemesi, ER stresi, otofaji gibi faktörlerde etkili olduğu bilinen genlerin (Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78) ifadelerinin ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerde farkını belirlemek amacıyla, öncelikle MKH'lerden total RNA izole edilmiştir. İzole edilen RNA numunelerinin verifikasyonu amacıyla agaroz jelde elektroforez yapılarak RNA bantları gösterilmiş (Ek-4) ve spektrofotometrik ölçüm ile RNA saflığı ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Buna göre de sırasıyla, cDNA sentezi ve qRT-PCR işlemi yapılarak gen ifadesi araştırılmıştır. Sonuçların analizinde relative CT metodu ($2^{-\Delta CT}$) kullanılmış ve

GAPDH genine göre normalize edilmiştir. Gen bazında istatistiksel inceleme yapılırken gruplar kendi aralarında Student t-test ile karşılaştırılmıştır.

Ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerdeki Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78 genlerinin ifadelerini gösteren grafik Şekil 3.14'te sunulmuştur. MKH'lere Ticagrelor uygulanması sonrası, gen ifadesindeki en büyük fark Beclin-1'de görülmüş olup ticagrelorle muamele edilen MKH'lerde ifade ticagrelorsuz kontrolün %8.96'sına düşmüştür ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($P=0.0257^*$). Bnip3 geni için ticagrelorle muamele edilen MKH'lerde ifade ticagrelorsuz kontrolün %77.7'si ($P=0.8160$), Calreticulin geni için kontrolün %142'si ($P=0.3162$), ENT-1 geni için kontrolün %37.3'ü ($P=0.7463$), GRP78 geni için ise kontrolün %38.5'i ($P=0.3803$) kadardır. Bu veriler ise, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

MKH'lerdeki Gen İfadeleri

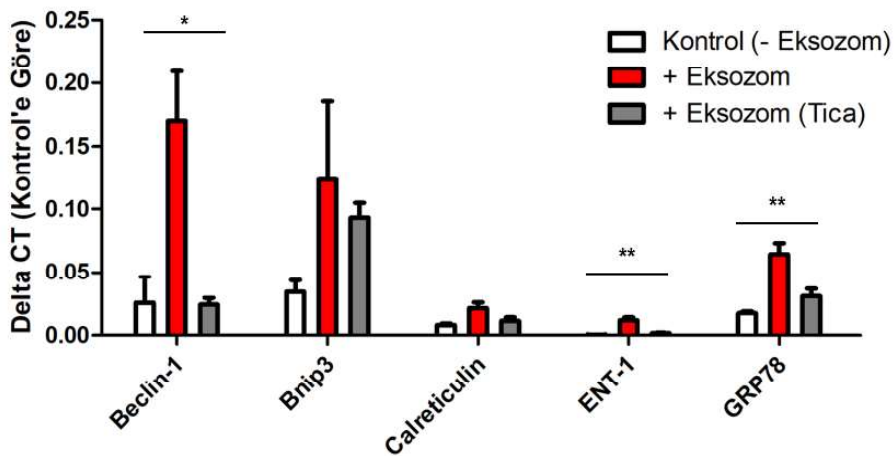


Şekil 3.14. Ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerdeki Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78 genlerinin ifadeleri.

3.12. Eksozom Uygulanan Endotel Hücrelerin Gen İfadelerindeki Değişimin Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile İncelenmesi

ER stresi, otofaji ve kardiyovasküler hastalıklara yatkınlık gibi faktörlerde etkili olduğu bilinen genlerin (Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78) ifadelerinin eksozom ile muamele edilmiş ve edilmemiş HUVEC’lerdeki ifadesinin farkı araştırılmıştır. Bu amaçla, öncelikle HUVEC’ler 48 saat boyunca eksozomsuz, kontrol eksozomlu ve ticagrelorlu MKH’lerden elde edilmiş eksozomlu ortamda inkübe edilmiştir. Sonrasında, bu hücrelerden total RNA izole edilmiştir. İzole edilen RNA numunelerinin verifikasyonu amacıyla agaroz jelde elektroforez yapılarak RNA bantları gösterilmiş (Ek-4) ve spektrofotometrik ölçüm ile RNA saflığı ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Buna göre de sırasıyla, cDNA sentezi ve qRT-PCR işlemi yapılarak gen ifadesi araştırılmıştır. Sonuçların analizinde relative CT metodu ($2^{-\Delta CT}$) kullanılmış ve GAPDH genine göre normalize edilmiştir. Gen bazında istatistiksel inceleme yapılırken gruplar kendi aralarında tek yönlü ANOVA ile karşılaştırılmıştır. Eksozom ile muamele edilmiş ve edilmemiş HUVEC’lerdeki Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78 genlerinin ifadelerini gösteren grafik Şekil 3.15’te sunulmuştur.

HUVEC'lerdeki Gen İfadeleri



Şekil 3.15. Eksozom ile muamele edilmiş ve edilmemiş HUVEC’lerdeki Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78 genlerinin ifadeleri.

Beclin-1 geni için, ticagrelorsuz eksozomla muamele edilen HUVEC'lerde ifade eksozomsuz kontrolün 6.59 katına çıkmıştır, ticagrelorlu eksozom içinse eksozomsuz kontrolün %93'ü kadardır ($P= 0.0107^*$). Bnip3 geni, ticagrelorsuz eksozomla muamele edilen HUVEC'lerde eksozomsuz kontrolün 3.59 katı ifade edilirken, ticagrelorlu eksozom içinse Bnip3 ifadesi eksozomsuz kontrolün 2.72 katı kadardır ($P= 0.2979$). Calreticulin geni, ticagrelorsuz eksozomla muamele edilen HUVEC'lerde eksozomsuz kontrolün 2.69 katı, ticagrelorlu eksozom içinse eksozomsuz kontrolün 1.43 katı kadar ($P= 0.0594$) ifade edilmektedir. ENT-1 geni için, ticagrelorsuz eksozomla muamele edilen HUVEC'lerde ifade eksozomsuz kontrolün 24.88 katına çıkmıştır, ticagrelorlu eksozom içinse eksozomsuz kontrolün 3.79 katı kadardır ($P= 0.0011^{**}$). GRP geni ise, ticagrelorsuz eksozomla muamele edilen HUVEC'lerde eksozomsuz kontrolün 3.71 katı, ticagrelorlu eksozom içinse eksozomsuz kontrolün 1.78 katı kadar ($P= 0.0044^{**}$) ifade edilmektedir.

4. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar, kalp damar sistemini etkileyen bozukluklar için kullanılan genel bir terimdir. Başta kalp krizi, felç, aritmi, anevrizma olmak üzere, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, hiperglisemi, hiperpihtılaşma ve hipertansiyon dahil olmak üzere pek çok risk faktörünü tedavi etmeyi amaçlayan çok faktörlü bir yaklaşım içermektedir. Yayımlanan çalışmalarda insülin direnci ile kalp yetmezliği arasında net bir korelasyon olduğu gösterilmiş olsa da ikisi arasındaki ilişkinin moleküler temellerini göstermek için çalışmalar devam etmektedir (Kahn ve ark., 2005).

Reaktif oksijen türleri (ROS), O₂'den oluşan oldukça reaktif kimyasallardır. Biyolojik açıdan ROS, normal oksijen metabolizmasının yan ürünüdür ve hücre sinyalizasyonu ve homeostazında role sahiptir (Edreva, 2005). ROS, normal hücrelerde düşük ve sabit seviyelerde bulunmaktadır (Herb ve ark., 2021). Artmış ROS üretimi ile karakterize diyabetik kardiyomiyopatide ise, artan oksidatif strese bağlı miyokardiyal disfonksiyon, kardiyak yeniden modelleme ve nihayetinde kalp yetmezliği görülebilmektedir.

Antioksidan etkili purinerjik reseptör P2Y₁₂ inhibitörü ticagrelorun diyabetik hastalarda kullanıldığında iskemi oluşumunu kayda değer oranda düşürdüğü ve miyokardiyumu sol ventrikül yeniden modellemesine karşı koruduğu bilinmektedir (Olgar ve ark., 2020). Antiinflamatuvar ve antioksidan etkileriyle bilinen MKH'lere (da Costa Gonçaves ve ark., 2017) antioksidan ticagrelor tedavisi uygulanması ardından gerçekleştirilen ROS ölçümlerinde 10⁻⁶ M konsantrasyonda ve 48 saat sonunda ticagrelorun hücre içi ROS miktarını anlamlı şekilde düşürdüğü görülmüştür. Ticagrelor muamelesi sonrası hücre içi ROS miktarı kontrolün %39.8'ine düşmüştür. Bu dozaj ve zaman aralığının ticagrelorun MKH'lerdeki terapötik penceresi olduğu kabul edilmiş ve dolaylı tedavi ve hücresel düzenleme amaçlı kullanılacak eksozomların bu pencerede izolasyonuna karar verilmiştir.

Multipotent özelliğe sahip olan mezenkimal kök hücreler, mezodermden köken alırlar. Kemik iliği, yağ dokusu, kalp, akciğerler, göbek kordonu, akciğerler, periferik kan, sinovial mermbran, diş pulpası, böbrekler ve karaciğer gibi birçok farklı tür dokuda bulunur, in vitro ve in vivo olarak adiposit, kondrosit, osteosit, myoblast, kardiyomiyosit ve nöron gibi farklı hücre türlerine farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Farklılaşarak diğer doku türlerini oluşturmak kök hücrelerin belirleyici özelliklerinden biri olduğundan, ticagrelor tedavisinin MKH'ler üzerinde farklılaşmayı baskılayıcı veya indükleyici bir etkisi olup olmadığını görmek amacıyla 21 günlük adipojenik ve osteojenik farklılaştırma prosedürleri uygulanmış ve ticagrelorun bu yönde herhangi bir etkisi olmadığı bulunmuştur.

Ticagrelorun klinikteki yaygın kullanımına rağmen, kardiyovasküler hastalıklara karşı durdurucu etkisinin altında yatan hücresel mekanizmalar halen anlaşılamamıştır. Özellikle ticagrelorun eksozomal-parakrin mekanizmalar aracılığı ile kardiyomiyositler ve endotelial hücreler üzerinde nasıl tedavi edici olarak rol alabileceğine dair, literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebep ile çalışmamızın fonksiyonel deneylerini oluşturan yara iyileşmesi ve hücre göçü, ticagrelorun eksozomal modülasyon yoluyla diyabetik kardiyomiyopati ve diğer kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki düzenleyici etkisinin gösterildiği ilk çalışma olması açısından özgün değere sahiptir.

Diyabetik hastalara uygulanan antioksidan tedavilerinin kardiyovasküler hastalıkların gelişmesini geciktirdiği ve bazı durumlarda önlediğini gösteren çalışmalar literatürde yaygındır (Vassort ve ark., 2010; Turan ve ark., 2010). Diyabetik kardiyomiyopatinin altında yatan sebeplerle oksidatif stresin ilişkisi ve antioksidan tedavisinin etkilerinin bu bağlamda incelenmesi oldukça önemlidir.

Ekstraselüler veziküllerin bir grubu olan eksozomlar taşıdıkları kompleks protein kargoları ve genetik materyaller sayesinde ideal terapötik ajanlar olarak kabul edilmektedirler. Eksozomların pro-anjiyogenik, pro-miyojenik, proliferatif, hücre göçünü indükleyici ve anti-apoptotik rollerinin anlaşılması ve bu mekanizlarda rol alan

eksozomal mikroRNA'ların tespiti, eksozomları yenilikçi kardiyovasküler tedavi yaklaşımlarında çok daha etkin bir şekilde kullanmamızı sağlayacaktır. Eksozomlar endotelial hücreler, fibroblastlar, kardiyomyositler ve düz kas hücreleri arası molekül transferi yaparak sinyal yollarını aktive eden mesajcılar gibi davranırlar (Qi ve ark., 2016).

Eksozomlar hedef hücrede; gen transkripsiyonu ve translasyonunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ve farklılaşması, hücre gelişimi ve yeniden programlanması, anjiyogenez, atıkların uzaklaştırılması, immünite, apoptoz, hücrel sinyallerin düzenlenmesi gibi pek çok olayda role sahiptir (Kalluri ve Lebleu, 2020). Hücre göçü ve yara iyileşmesi de eksozomların hücre içerisinde yer aldığı pek çok yola ve hücrel düzenleme mekanizmasının arasında gösterilebilir. MKH'lerden ticagrelor tedavisi sonrası toplanan eksozomlarla muamele edilen hücrelerde gerçekleştirdiğimiz fonksiyonel deneylerle hücre göçü ve yara iyileşmesinde eksozomların etkisi incelenmiştir.

MKH'lerden salınan eksozomların H9C2 hücrelerinin göçüne etkisinin gösterilmesinin hedeflendiği matrijel ile invazyon testinde, hücreler iki farklı konsantrasyonda (1 ve 10 µg/mL) ve ticagrelor içeren veya içermeyen hücrelerden izole edilmiş eksozomla muamele edilmiştir. Aynı konsantrasyonda uygulanmış olsalar bile, ticagrelorle muamele edilmiş MKH'lerden elde edilen eksozomların, ticagrelorsüz olanlara göre hücre göçünü daha fazla artırma etkisine sahip olduğu ve eksozom konsantrasyonu arttıkça hücre göçü miktarının da artış gösterdiği görülmüştür. Ticagrelor tedavisinin dolaylı, eksozomların ise doğrudan hücre göçünü indükleyici etkiye sahip olduklarını söylemek mümkündür.

MKH kaynaklı eksozomların HUVEC hücrelerinde yara iyileşmesini tetikleyici bir etkiye sahip olup olmadığını gözlemlemek amacıyla ise, çizik testi yapılarak hücrelerin hasarlı dokuya ulaşma ve çoğalarak hasarlı dokuyu onarma yetenekleri karşılaştırılmıştır. Başlangıçtan itibaren 0-12. saatler arasında eksozom verilmeyen hücrelerde yara kapanma yüzdesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. 24, 36 ve 48. saatlerde ise MKH eksozomuyla muamele edilmiş HUVEC'ler için yara iyileşme

yüzdeleri kontrole göre daha yüksektir. Çizik testi sonuçlarına göre, eksozomsuz kontrol ve ticagrelorlu eksozomlu deney grupları için $t=0$ 'a göre hücre göçü miktarları, ticagrelorsuz eksozomla muamele edilen deney grubuna göre 48 saat boyunca daha yüksek olarak bulunmuştur. Ancak deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

ER stresi, otofaji ve kardiyovasküler hastalıklara yatkınlık gibi faktörlerde etkili olduğu bilinen ve hücre skiklusu, apoptoz ve benzeri transkripsiyonal düzenlemelerde de rolü olabileceği düşünülen Beclin-1, Bnip3, Calreticulin, ENT-1 ve GRP78 genlerinin ifadelerinin ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerdeki ve bunlardan izole edilmiş eksozomlarla muamele edilmiş HUVEC'lerdeki değişimi araştırılmıştır. Böylelikle ticagrelorun hücrelere hem doğrudan uygulanması hem de dolaylı eksozomal parakrin yoldan uygulanması sonucu yarattığı antioksidan ve hücrel protektif etkinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Bulgularımıza göre, MKH'lere ticagrelor uygulanması sonrası, gen ifadesindeki en büyük fark Beclin 1'de görülmüş olup ticagrelorle muamele edilen MKH'lerde ifade ticagrelorsuz kontrolün %8.96'sına düşmüştür. Diğer tüm genler (Beclin-1, Bnip3, ENT-1 ve GRP78) için ticagrelorle muamele edilen MKH'lerde ifade ticagrelorsuz kontrole göre düşüş gösterirken, Calreticulin geni için kontrolün 1.42 katına çıkmıştır. Bu genlerin ifadelerindeki artışın, ER stresinin neden olduğu kardiyak disfonksiyon ve kardiyomiyopati ile ilişkili olduğu gösterilmiş olduğundan (Roe ve Ren, 2013), ifadedeki düşüşün de ticagrelorun MKH'ler üzerindeki antioksidan ve antiapoptotik etkisinin bir göstergesi olduğu çıkarımına varmak mümkündür. Aynı genlerin eksozomla muamele edilmiş HUVEC'lerde ifadesi ise, yüksekten alçağa sırasıyla ticagrelorsuz eksozomlu, eksozomsuz kontrol ve ticagrelorlu eksozomlu hücreler şeklinde görülmüştür. Ticagrelorlu eksozom uygulanan HUVEC'lerde, doğrudan ticagrelor uygulanan MKH'lere benzer bir düşüş görülmüş olması iki deneyi doğrular niteliktedir. Buna ek olarak, vücuttaki çok çeşitli hücre türlerinin, hem doğrudan hem de dolaylı eksozomal parakrin yoldan uygulanan ticagrelor tedavisine, benzer şekillerde antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik yanıtlar oluşturduğu gösterilmiştir.

miRNA'lar, özellikle de eksozomlar gibi hücre dışı keseciklerin (EV'ler) kargosunda yer alanlar, farklı dokular arasında parakrin ve endokrin iletişimine aracılık edebilmekte ve böylece gen ekspresyonunu ve çevre hücrelerin işlevini modüle edebilmektedir (Mori ve ark., 2019). Eksozomal miRNA repertuvarının hücre dışı faktörler ile muamele sonucu değiştirilebildiği, eksozomal parakrin etkinin de bu miRNA profiliyle doğrudan ilişkili etki gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu, hücresel stres, apoptoz ve diyabet ile ilişkilendirilen miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499 miRNA'larının ifadelerindeki değişim incelenmiştir. İncelenen tüm miRNA'ların ifadesinin ticagrelor ile muamele sonrası düştüğü saptanmıştır. Bu da ticagrelor ile doğrudan muamele edilen hücrelerde hem ROS seviyesinin düşmesi, hem otofaji ve hücresel stres belirteçlerinin ifadesinin azalmasını destekler nitelikte bir bulgudur.

Aslen P2Y₁₂ reseptör inhibitörü olan ticagrelor, sahip olduğu antioksidan ve trombosit agregasyonunu engelleyici etki sayesinde ilaç pazarında yaygın kullanımı olan bir etken madde ve umut vadeden bir oral ilaç tedavisidir. Ticagrelorun sahip olduğu antidiyabetik, antiapoptotik ve proliferatif etkileri tam olarak hangi hücresel mekanizmalar üzerinden gerçekleştirmekte olduğu ise henüz tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamız için ticagrelorun tercih edilmesinin sebebi, kardiyovasküler sistem üzerinde bilinen direkt etkilerinin yanı sıra, hücre-hücre etkileşimleri üzerinden eksozomal parakrin yolakla da etkisini indirekt olarak gösteriyor olma olasılığının kuvvetli oluşudur. Hem ticagreloru hücrelere doğrudan uyguladığımız hem de ticagrelor uygulanmış hücrelerin eksozomal repertuvarını başka hücrelere uyguladığımız fonksiyonel deneylerde alınan sonuçlar da bu önermeyi destekler niteliktedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamız kapsamında, ticagrelorun insan MKH'leri üzerindeki doğrudan etkisi, MKH'lerin eksozomal çıktıları aracılığıyla da kardiyovasküler sistemdeki dolaylı etki mekanizmalarının incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, sıçan kardiyomiyosit hücreleri (H9C2) ile kalp, insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ile ise damar sistemi modellenmiştir. Sonuçlarımız, ticagrelor tedavisinin ilaç etken maddesinin doğrudan etkisiyle değil, ilaca bağlı olarak değişen eksozomal parakrin etki ile hücreler arasında da etkisinin yayılmasının mümkün olabileceğini göstermiştir. Ayrıca ticagrelor uygulaması ile kök hücre kaynaklı eksozomların kardiyoprotektif etkisi de gösterilmiştir. Ticagrelor tedavisinin MKH kaynaklı eksozomları modüle ederek, endotel hücre göçünü artırdığı ve yara iyileşmesini tetiklediği, bu yolla kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici etki gösterdiği bulunmuştur.

Çalışmamızda, ticagrelor ile ön muameleye tabi tutulmuş insan Kİ-MKH'lerinde ROS üretiminde; hücresel stres, otofaji ve apoptoz belirteçlerinin ifadelerinde azalma gözlenmiş; ayrıca bu hücrelerden salınan eksozomların tedavi amaçlı olarak H9C2 ve HUVEC'lere uygulanmasının ardından bu hücrelerde yara iyileşmesi ve hücre göçü etkenlerinde iyileşme görülmüştür. Buna ek olarak, MKH'lerin ticagrelor ile muamele sonrası kök hücre özelliklerini sürdürmekte oldukları ve ticagrelor tedavisinin kök hücre farklılaşması üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada, kardiyogenez, kalp fonksiyonu ve kardiyovasküler hastalık patolojisinde önemli rol oynadığı bilinen 4 miRNA'nın (miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499) ifadesi ticagrelor ile muamele edilmiş MKH'lerden izole edilmiş total RNA aracılığıyla incelenmiştir. Yapılan çalışmalar, eksozomlar içerisinde taşınan miRNA'ların mikro-çevreye müdahale etme, hücre büyümesi, hücre göçü, metastaz, anjiyogenez ve ilaç direnci gibi metabolik süreçleri modüle ettiğini göstermiştir (Sun ve ark., 2018). Bu nedenle, eksozomal miRNA'lar da kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalık patogenezinde önemli işleve sahiptir. Bu bağlamda,

ileri çalışmalarda kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen miRNA'ları eksozomal seviyede incelemek uygun olacaktır.

Hücrel stres ve ROS ağırlıklı olarak mitokondri kaynaklı kavramlardır. Mitokondri, hücrel solunum tepkimesindeki tek elektronlu taşıyıcılar aracılığıyla reaktif oksijen türlerinin üretiminde yer almaktadır; mitokondriyal yapılar ayrıca; lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve mitokondriyal DNA (mtDNA) mutasyonları üzerine yapılmış çalışmalarda gösterildiği üzere oksidatif strese karşı çok hassastır (Lenaz, 1998). Oksidatif stres, mitokondri yapısında ve fonksiyonunda bozukluklara yol açabilmektedir ve mitokondri, apoptoz ve diğer planlı hücre ölümü mekanizmalarında önemli bir role sahiptir. Düzgün çalışan bir mitokondri hücrenin metabolik faaliyetlerinin sağlıklı devam etmesini sağlayan en önemli faktörlerdendir. Bu nedenle, ileri çalışmalarda mitokondriyal ROS üretiminin spesifik bir şekilde ölçümü ve seçici bir şekilde engellenmesi, mitokondriyonların fonksiyonu üzerinde olumlu etkiler yapabileceği ve böylece de kardiyovasküler hastalıklar kapsamında umut verici bir terapötik kardiyoprotektif strateji olabileceği hipotezini kuvvetlendirmektedir (Olgar ve ark., 2020).

Oral yolla alınan ve karaciğerde metabolize edilip safra kesesi yoluyla vücuttan atılan bir kimyasal ilaç etken maddesi olan ticagrelorun in vitro etkilerinin incelendiği bu çalışmada, ticagrelorun direkt etkileri kemik iliği kaynaklı MKH'ler üzerinde gösterilmiştir. Normal şartlarda, antioksidan ve antidiyabetik bir ilaç olarak kullanılan ticagrelorun kök hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi bakımından yenilikçi olan çalışmamızın devamında, ticagrelorun in vivo sistemik etkilerini incelemek ve diğer hücre tipleri üzerindeki etkilerini gözlemleyebilmek açısından in vivo hayvan modelleri oluşturulması planlanmaktadır.

ÖZET

Ticagrelor ile Muamele Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Eksozomların Hücre Göçü ve Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisi

Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, hiperglisemi, hiperpıhtılaşma ve hipertansiyon dahil olmak üzere pek çok risk faktörünün tedavi etmeyi amaçlayan çok faktörlü bir yaklaşım içerir. Hiperglisemi ve insülin direnci, organlarda gözlenen fonksiyon bozuklarını, özellikle kardiyak fonksiyon bozukluklarını başlatan en önemli faktörler arasında kabul edilmektedir. Ticagrelor, dolaşım sorunlarından kaynaklanan akut koroner sendrom, kalp krizi veya felç gibi sorunların önlenmesinde kullanılan bir ilaçtır. Yapılan çalışmalarla, antioksidan etkili P2Y₁₂ pürinerjik reseptör antagonisti olan ticagrelorun, insülin direnci ve iskemi üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiş ancak ticagrelorun moleküler hücre içi etki mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Hipotezimize göre, ticagrelor sağlıklı kemik iliği mezenkimal kök hücrelerden (MKH) salınan eksozomları modüle ederek eksozomal repertuarı etkilemekte ve bu şekilde eksozomların kardiyoprotektif, antioksidatif ve anti-apoptotik etkisini arttırmaktadır. Bu sebeple, ticagrelorun endotelial hücrelerdeki ve kardiyomiyositlerdeki düzenleyici ve tedavi edici etkisini eksozomal-parakrin mekanizmalar üzerinden incelenmiştir. Çalışmamızda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu, stres ve apoptoz belirteçleri ile diyabetle ilişkilendirilen miR-1, miR-133a, miR-133b ve miR-499 miRNA'larının ifadelerindeki değişim de incelenmiştir. Buna ek olarak çalışmamızda; insan MKH'lerine uygulanan ticagrelor tedavisinin, eksozomal modülasyon yoluyla, endotel ve kardiyomiyosit hücreleri üzerindeki düzenleyici ve tedavi edici etkileri gösterilmiştir. Son olarak, doğrudan yüksek dozda ilaç kullanımına alternatif olarak geliştirilebilecek metotlar arasında görülen eksozom temelli uygulamalar kalp ve damar hücreleri üzerinde denenerek hücre göçü ve yara iyileşmesi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: eksozom, hücre göçü, mezenkimal kök hücre, mikroRNA, ticagrelor

SUMMARY

The Effect of Ticagrelor Induced-Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Cell Migration and Wound Healing

Prevention of cardiovascular diseases involves a multifactorial approach aimed at treating many risk factors, including hyperglycemia, hypercoagulation and hypertension. Hyperglycemia and insulin resistance are considered to be among the most important factors that initiate dysfunctions in organs, especially cardiac dysfunction. Ticagrelor is a medication used to prevent dysfunctions caused by circulatory problems such as acute coronary syndrome, heart attack or stroke. Studies have shown that ticagrelor, an antioxidant-acting P2Y₁₂ purinergic receptor antagonist, has a positive effect on insulin resistance and ischemia, but the molecular intracellular mechanism of action of ticagrelor has still not been fully elucidated. According to our hypothesis, ticagrelor modulates exosomes released from healthy bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) to affect the exosomal output, thereby increasing the cardioprotective, antioxidative and anti-apoptotic effect of exosomes. For this reason, we aimed to demonstrate the regulatory and therapeutic effects of ticagrelor on endothelial cells and cardiomyocytes through exosomal-paracrine mechanisms. In our study, we also examined the changes in the expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-499 microRNAs associated with reactive oxygen species (ROS) formation, stress and apoptosis markers and diabetes. In addition, by this study; we demonstrated the regulatory and therapeutic mechanisms by which ticagrelor functions, during the treatment of cardiomyocytes and endothelial cells via exosomal modulation, utilizing human MSC exosomes. Another output of this study was testing exosome-based applications, which are among the methods that can be developed as an alternative to direct high-dose drug use, on heart and vein cells, as well as their migration and wound healing capabilities.

Keywords: cell migration, exosomes, mesenchymal stem cells, microRNA, ticagrelor

KAYNAKLAR

- BARTEL, D. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, **173**(1): 20-51.
- BECKER, A., McCULLOCH, E., TILL, J. (1963). Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature*, **197**: 452-454.
- BERRIDGE, M.J. (2005). Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.*, **67**: 1-21.
- BİCİM G., GULER E.M., KİLİNC A., EKER C., KUMUSOGLU H., YALCIN A.S. (2013). Oxidative stress biomarkers and antioxidant gene polymorphisms: European Cooperation in Science and Technology (COST) Action. BM1203 EU-ROS Working Group Meeting., Poster Sunumu.
- BİTİRİM, C., OZER, Z., AYDOS, D., GENC, K., DEMİRİSOY, S., AKCALI, K., TURAN, B. (2021). Ticagrelor-Pretreated Cardiomyocyte Derived Exosomes Provide Cardioprotection Under Hyperglycemia Through Alleviation In Oxidative Stress, Apoptosis, And ER-Stress.
- BRAGANCA, J. (2015). Is CITED2 a general regulator of stem cell functions?. *Stem Cell And Translational Investigation*. **2**: e755.
- CAN A. (2014). Kök hücrelerin genel özellikleri, embriyonik ve yetişkin kök hücrelere genel bakış. *Hematology*. **4**:238-254.
- CASİERİ V, MATTEUCCI M, PASANİSİ E. (2020). Ticagrelor Enhances Release of Anti-Hypoxic Cardiac Progenitor Cell-Derived Exosomes Through Increasing Cell Proliferation In Vitro. *Sci Rep*. **10**(1).
- CHAI C, LEONG KW. (2007). Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Mol Ther*. **15**(3):467-480.
- CHAO MP, JAISWAL S, WEISSMAN-TSUKAMOTO R, ALIZADEH AA, GENTLES AJ, VOLKMER J, WEISKOPF K, WILLINGHAM SB, RAVEH T, PARK CY, MAJETI R, WEISSMAN IL. (2010). Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Science Translational Medicine*. **2** (63): 63-94.
- CHAPMAN R, SİDRAUSKİ C, WALTER P. (1998). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **14**: 459-85.
- CHEN, Y., WANG, X. (2020). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res*, **48**: 127-131.
- DA COSTA GONÇALVES, F., GRİNGS, M., NUNES, N., PİNTO, F., GARCEZ, T., VİSİOLİ, F. (2016). Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. *Biotechnology Letters*, **39**(4):613-622.
- DAVIDSON, J., WARREN-GASH, C. (2019). Cardiovascular complications of acute respiratory infections: current research and future directions. *Expert Review Of Anti-Infective Therapy*, **17**(12): 939-942.
- DE KONING, J., VAN BEKKUM, D., DICKE, K., DOOREN, L., VAN ROOD, J., RÁDL, J. (1969). Transplantation Of Bone-Marrow Cells And Fetal Thymus In An Infant With Lymphopenic Immunological Deficiency. *The Lancet*, **293**(7608): 1223-1227.

- DRAPER JS, SMİTH K, GOKHALE P, MOORE HD, MALTBY E, JOHNSON J, MEİSNER L, ZWAKA TP, THOMSON JA, ANDREWS PW. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* **22**:53–54.
- DULAK J, SZADE K, SZADE A, NOWAK W, JÓZKOWICZ A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* **62**: 329-337.
- DWEEP, H., GRETZ, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature methods*, **12**: 697.
- EDREVA, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **106**(2-3): 119-133.
- EMANUELİ C, SHEARN A, ANGELİNİ G, SAHOO S. (2015). Exosomes and exosomal miRNAs in cardiovascular protection and repair. *Vascul Pharmacol.* **71**: 24-30.
- ENSEMBL GENOME BROWSER (2021). Ensembl Release 105 (Dec 2021) Erişim Adresi: [<https://www.ensembl.org/index.html>]. Erişim Tarihi: 25/12/2021.
- FERRARİ, D., GULİNELİ, S., SALVESTRİNİ, V., LUCCHETTİ, G., ZİNİ, R., MANFREDİNİ, R. (2011). Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Experimental Hematology*, **39**(3): 360-374.
- FORMAN, H., FUKUTO, J., TORRES, M. (2004). Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles (1. Baskı). Springer Netherlands. 326-344.
- FRIEDENSTEİN AJ, CHAILAKHYAN RK, LATSİNİK NV, PANASYUK AF, KEİLİSS-BOROK IV. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Cloning in vitro and retransplantation in vivo Transplantation.* **17**(4): 331-40.
- FU HY, MİNAMİNO T, TSUKAMOTO O, SAWADA T, ASAI M, KATO H, ASANO Y, FUJİTA M, TAKASHİMA S, HORİ M, KİTAKAZE M. (2008). Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovascular Research.* **79** (4): 600–610.
- FUCHS E, TUMBAR T, GUASCH G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* **116**: 769–778.
- GATTAZZO, F., URCİUOLO, A., BONALDO, P. (2014). Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et biophysica acta*, **1840**(8): 2506-19.
- GENEALL (2017). RiboEx™ Erişim Adresi: [[https://geneall.com/upload/prod/13.%20RiboEx%20\(Ver.1.1\)_en.pdf](https://geneall.com/upload/prod/13.%20RiboEx%20(Ver.1.1)_en.pdf)]. Erişim Tarihi: 03/01/2022.
- GİRALDEZ AJ, CİNALLİ RM, GLASNER ME, ENRİGHTE AJ, THOMSON JM, BASKERVİLE S. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science.* **308**(5732):833–838.
- GLICK, D., BARTH, S., MACLEOD, KF., (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology.* **221** (1): 3-12.
- GRİFFİTHS M, BEAUMONT N, YAO SY, SUNDARAM M, BOUMAH CE, DAVİES A. (1997). Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nature Medicine.* **3** (1): 89–93.
- GURHA P. (2016). MicroRNAs in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol.* **31**(3): 249-254.

- HATFIELD SD, SHCHERBATA HR, FISCHER KA, NAKA-HARA K, CARTHEW RW, RUOHOLA-BAKER H. (2005). Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*. **435**: 974–978.
- HENDERSHOT LM, VALENTINE VA, LEE AS, MORRIS SW, SHAPIRO DN. (1994). Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. *Genomics*. **20** (2): 281–4.
- HERB, M., GLUSCHKO, A., SCHRAMM, M. (2021). Reactive Oxygen Species: Not Omnipresent but Important in Many Locations. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, **9**.
- HIEW VV, SIMAT SFB, TEOH PL (2017). The Advancement of Biomaterials in Regulating Stem Cell Fate. *Stem Cell Rev*. **14**(1):43-57.
- HO AD (2005). Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Experimental hematology*, **33**: 1–8.
- HOFMANN, L., LUDWIG, S., VAHL, J., BRUNNER, C., HOFFMANN, T., THEODORAKI, M. (2020). The Emerging Role of Exosomes in Diagnosis, Prognosis, and Therapy in Head and Neck Cancer. *International Journal Of Molecular Sciences*, **21**(11): 4072.
- IZON SCIENCE (2021). How qEV Isolation Columns Work. Erişim Adresi: [https://www.izon.com/qev/overview]. Erişim Tarihi: 02/01/2022.
- IZON SCIENCE (2021). qEV10 / 35nm - 1 Pack. Erişim Adresi: [https://store.izon.com/collections/qev/products/qev10-35nm-1-pack]. Erişim Tarihi: 02/01/2022.
- JAYARAMAN, S., GNANASAMPANTHAPANDIAN, D., RAJASINGH, J., PALANIYANDI, K. (2021). Stem Cell-Derived Exosomes Potential Therapeutic Roles in Cardiovascular Diseases. *Frontiers In Cardiovascular Medicine*, **8**.
- JIANG, J., PAPOUTSAKIS, E.T. (2013). Stem-cell niche based comparative analysis of chemical and nano-mechanical material properties impacting ex vivo expansion and differentiation of hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Advanced healthcare materials*, **2**(1): 25-42.
- JIANG, L., HAO, Y., MOUSAWI, F., PENG, H., YANG, X. (2016). Expression of P2 Purinergic Receptors in Mesenchymal Stem Cells and Their Roles in Extracellular Nucleotide Regulation of Cell Functions. *Journal Of Cellular Physiology*, **232**(2): 287-297.
- JUNGER, W.G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology*. **11**(3): 201-212.
- KAHN, R., BUSE, J., FERRANNINI, E., STERN, M. (2005). The Metabolic Syndrome: Time for a Critical Appraisal. *Diabetes Care*, **28**(9): 2289-2304.
- KALLURI, R., LEBLEU, V. (2020). The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science*, **367**(6478).
- KANG, S., HSIEH, Y., FENG, C., CHEN, Y., YANG, P., CHEN, W. (2017). miPrimer: an empirical-based qPCR primer design method for small noncoding microRNA. *RNA*, **24**(3): 304-312.
- KAPRANOV, P., CAWLEY, S., DRENKOW, J., BEKIRANOV, S., STRAUSBERG, R., FODOR, S., GINGERAS, T. (2002). Large-Scale Transcriptional Activity in Chromosomes 21 and 22. *Science*, **296**(5569): 916-919.

- KARLSSON H, ERKERS T, NAVA S, RUHM S, WESTGREN M, RINGDEN O. (2012). Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings in vitro. *Clin Exp Immunol.* **167**:543-555.
- KELLER, A., DZIEDZIĆKA, D., ZAMBELLİ, F., MARKOULİ, C., SERMON, K., SPİTS, C., GEENS, M. (2018). Genetic and epigenetic factors which modulate differentiation propensity in human pluripotent stem cells. *Human Reproduction Update*, **24**(2): 162-175.
- KHAN ACADEMY (2007). Introduction to cell signaling. Erişim Adresi: [https://www.khanacademy.org/science/biology/cell-signaling]. Erişim tarihi: 24/06/2020.
- KLEİN ME, IMPEY S, GOODMAN RH. (2005). Role reversal: the regulation of neuronal gene expression by microRNAs. *Curr Opin Neurobiol.* **15**(5): 507-513.
- KÖHRLE, J., JAKOB, F., CONTEMPRÉ, B., DUMONT, J. (2005). Selenium, the Thyroid, and the Endocrine System. *Endocrine Reviews*, **26**(7): 944-984.
- KRAMER, M. (2011). Stem-Loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols In Molecular Biology*, **95**(1).
- KUMAR, V., ABBAS, A., ASTER, J. (2015). Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9. Baskı, Elsevier Saunders, Philadelphia.
- KUSENDA, B., MRAZ, M., MAYER, J., POSPİŠILOVA, S. (2006). MicroRNA Biogenesis, Functionality And Cancer Relevance. *Biomedical Papers*, **150**(2): 205-215.
- LAI Y, TSE CM, UNADKAT JD. (2004). Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *The Journal of Biological Chemistry*. **279** (6): 4490-7.
- LEE, J., CHO, Y., JUNG, H., CHOI, I. (2018). Pharmacological Regulation of Oxidative Stress in Stem Cells. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, **2018**: 1-13.
- LENAZ, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1366**(1-2): 53-67.
- LI, R., WEISEL, R. (2014). Cardiac Regeneration and Repair (1. Baskı). Toronto: Woodhead Publishing Ltd. 118-137.
- LIANG XH, KLEEMAN LK, JIANG HH, GORDON G, GOLDMAN JE, BERRY G. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of Virology*. **72** (11): 8586-96.
- LODİSH, H; BERK, A.; KAİSER, CA.; KRİEGER, M.; SCOTT, MATTHEW P.; BRETSCHER, ANTHONY; PLOEGH, HİDDE; MATSUDAİRA, PAUL (2008). "Cell signaling I: Signal transduction and short-term cellular processes". Molecular Cell Biology (6. Baskı). New York: W.H. Freeman and Company. 623-664.
- LUNYAK, V., ROSENFELD, M. (2008). Epigenetic regulation of stem cell fate. *Human Molecular Genetics*, **17**(R1): 28-36.
- LUTOLF M. P., GİLBERT P. M., BLAU H. M. (2009). Designing materials to direct stem-cell fate, *Nature*, **462**: 433-441.
- MAHLA, R.S. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International journal of cell biology*, **2016**, 6940283.

- MARTIN, G. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, **78**(12): 7634-7638.
- MATTICK, J. (2003). Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays*, **25**(10): 930-939.
- MATTICK J, MAKUNIN IV. (2005). Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet*. **14**: 121-132.
- MAYSHAR Y, BEN-DAVID U, LAVON N, BIANCOTTI J-C, YAKIR B, CLARK AT, PLATH K, LOWRY WE, BENVENISTY N. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **7**: 521–531.
- MCCAULIFFE DP, ZAPPI E, LIEU TS, MICHALAK M, SONTHEIMER RD, CAPRA JD (1990). A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal RAL-1 antigen and an alysia "memory molecule". *The Journal of Clinical Investigation*. **86** (1): 332-335.
- MENYHART O, HARAMI-PAPP H, SUKUMAR S, SCHÄFER R, MAGNANI L, DE BARRIOS O, GYÖRFFY B. (2016). Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. **1866** (2): 300–319.
- MICHALAK M, LYNCH J, GROENENDYK J, GUO L, ROBERT PARKER JM, OPAS M. (2002). Calreticulin in cardiac development and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1600** (1–2): 32–37.
- MORI, M., LUDWIG, R., GARCÍA-MARTÍN, R., BRANDÃO, B., KAHN, C. (2019). Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metabolism*, **30**(4): 656-673.
- MORRISON, S., UCHIDA, N., WEISSMAN, I. (1995). The Biology of Hematopoietic Stem Cells. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, **11**(1): 35-71.
- MORRISON, S.J., SPRADLING, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, **132**(4): 598-611.
- MÜLLER, E., WANG, W., QIAO, W., BORNHÄUSER, M., ZANDSTRA, P., WERNER, C., POMPE, T. (2016). Distinguishing autocrine and paracrine signals in hematopoietic stem cell culture using a biofunctional microcavity platform. *Scientific Reports*, **6**(1).
- NAGUIBNEVA I, AMEYAR-ZAZOUA M, POLESSKAYA A, AIT-SI-ALI S, GROISMAN R, SOUIDI M. (2006). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*. **8**: 278–284.
- NI M, LEE AS. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Letters*. **581** (19): 3641–51.
- OKAMURA K, KIMATA Y, HIGASHIO H, TSURU A, KOHNO K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **279** (2): 445–50.
- OLGAR Y, TUNCAY E, BİLLUR D, DURAK A, OZDEMİR S, TURAN B. (2020). Ticagrelor reverses the mitochondrial dysfunction through preventing accumulated autophagosomes-dependent apoptosis and ER stress in insulin-resistant H9c2 myocytes. *Mol Cell Biochem*. **469**(1-2): 97-107.
- ÖREN, H. (2019). Stem Cells. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. **33**(3): 271-280.

- PAVLOWSKY, A., CHELLY, J., BILLUART, P. (2012). Major synaptic signaling pathways involved in intellectual disability. *Molecular Psychiatry*, **17**(7), 663.
- PLUSA, B., HADJANTONAKIS, A. (2018). "Cell Fate in Mammalian Development" Current Topics in Developmental Biology. (I. Baskı). Academic Press. London. 6-10.
- QI, X., ZHANG, J., YUAN, H., XU, Z., LI, Q., NIU, X. (2016). Exosomes Secreted by Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Repair Critical-Sized Bone Defects through Enhanced Angiogenesis and Osteogenesis in Osteoporotic Rats. *International Journal Of Biological Sciences*, **12**(7): 836-849.
- RINALDI, L., BENITAH, S. (2014). Epigenetic regulation of adult stem cell function. *FEBS Journal*, **282**(9): 1589-1604.
- RODRÍGUEZ, R., VELKEY, J., LUTZKO, C., SEERKE, R., KOHN, D., O'SHEA, K., FÍRPO, M. (2007). Manipulation of OCT4 Levels in Human Embryonic Stem Cells Results in Induction of Differential Cell Types. *Experimental Biology And Medicine*, **232**(10): 1368-1380.
- ROE ND, REN J. (2013). Oxidative activation of Ca(2+)/calmodulin-activated kinase II mediates ER stress-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. **304** (6): 828–839.
- ROMAÏNE S, TOMASZEWSKI M, CONDORELLI G, SAMANI N. (2015). MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. **101**(12): 921-928.
- SALEM, H., THIEMERMANN, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*, **28**: 585–596.
- SASSONE J, COLCIAGO C, MARCHI P, ASCARDI C, ALBERTI L, DI PARDO A. (2010). Mutant Huntingtin induces activation of the Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein (BNip3). *Cell Death & Disease*. **1** (1): 7.
- SCHAAP-OZIEMŁAK, A. M., KÜHN, P. T., VAN KOOTEN, T. G., VAN RIJN, P. (2014). Biomaterial-stem cell interactions and their impact on stem cell response. *Royal Society of Chemistry Advances*, **4**, 53307–53320.
- SEET, C., HE, C., BETHUNE, M., LI, S., CHICK, B., GSCHWENG, E. (2017). Generation of mature T cells from human hematopoietic stem and progenitor cells in artificial thymic organoids. *Nature Methods*, **14**(5): 521-530.
- SHAHRİYARI L, KOMAROVA NL (2013). Symmetric vs. Asymmetric Stem Cell Divisions: An Adaptation against Cancer?. *PLOS ONE*, **8**(10): 76195.
- SISAKHTNEZHAD, S., ALIMORADI, E., AKRAMI, H. (2017). External factors influencing mesenchymal stem cell fate in vitro. *European journal of cell biology*, **96**(1): 13-33.
- SUAREZ-ARNEDO, A., TORRES FIGUEROA, F., CLAVIJO, C., ARBELÁEZ, P., CRUZ, J., MUÑOZ-CAMARGO, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLOS ONE*, **15**(7), e0232565.
- SUN, Z., SHI, K., YANG, S., LIU, J., ZHOU, Q., WANG, G. (2018). Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications. *Molecular Cancer*, **17**(1).
- TABASSUM K, SARVESH R (2017). ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION STUDIES OF TICAGRELOR TABLETS BY RP-HPLC. *International Journal Of Applied Pharmaceutics*, **9**(4): 10.

- TAKAHASHI K, YAMANAKA S (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, **126**(4): 663-676.
- TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K., YAMANAKA, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, **131**(5): 861-872.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC (2015). Erişim Adresi: [https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf]. Erişim Tarihi: 25/12/2021.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC (2020). Cell Tracing, Tracking, and Morphology Erişim Adresi: [<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-tracing-tracking-and-morphology.html>]. Erişim Tarihi: 25/12/2021.
- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. AND JONES, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, **282**(5391): 1145-1147.
- TURAN, B. (2010). Role of Antioxidants in Redox Regulation of Diabetic Cardiovascular Complications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **11**(8), 819-836.
- VANDENBERG, L., COLBORN, T., HAYES, T., HEINDEL, J., JACOBS, D., LEE, D. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, **33**(3): 378-455.
- VASSORT, G., TURAN, B. (2010). Protective Role of Antioxidants in Diabetes-Induced Cardiac Dysfunction. *Cardiovascular Toxicology*, **10**(2): 73-86.
- VOLPE, G., WALTON, D., DASSÉ, E., DEL POZZO, W., O'NEILL, L., GÖTTGENS, B. (2009). Distinct Mechanisms Regulate the Expression of flt3 Gene in Normal and Leukaemia-Like Stem Cells. *Blood*, **114**(22): 4586-4586.
- VON KÜGELGEN, I., HARDEN, T. (2011). Molecular Pharmacology, Physiology, and Structure of the P2Y Receptors. *Advances In Pharmacology*: 373-415.
- VU TQ, DE CASTRO RM, QİN L (2017). Bridging the gap: microfluidic devices for short and long distance cell-cell communication. *Lab on a Chip*. **17** (6): 1009–1023.
- WEİ X, YANG X, HAN ZP, QU FF, SHAO L, SHİ YF. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. **34**(6): 747–754.
- YANG, L. H., WANG, S. L., TANG, L. L., LIU, B., YE, W. L., WANG, L. L., WANG, Z. Y., ZHOU, M. T., CHEN, B. C. (2014). Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PloS one*, **9** (12): e115293.
- YANG, Q., MAS, A., DIAMOND, M., AL-HENDY, A. (2015). The Mechanism and Function of Epigenetics in Uterine Leiomyoma Development. *Reproductive Sciences*, **23** (2): 163-175.
- YILDIRIM, S., AKMAN, D., CATALUCCI, D., TURAN, B. (2013). Relationship Between Downregulation of miRNAs and Increase of Oxidative Stress in the Development of Diabetic Cardiac Dysfunction: Junctin as a Target Protein of miR-1. *Cell Biochemistry And Biophysics*, **67**(3): 1397-1408.
- ZAEHRES H, SCHÖLER H (2007). Induction of Pluripotency: From Mouse to Human. *Cell*, **131**(5): 834-835.

- ZHANG W, SONG M, QU J, LIU G. (2018). Epigenetic Modifications in Cardiovascular Aging and Diseases. *Circ Res.* **123**(7):773-786.
- ZHANG H, GRIZZLE W (2014). Exosomes. *The American Journal Of Pathology*, **184**(1), 28-41.
- ZHONG W, CHIA W (2008). Neurogenesis and asymmetric cell division. *Current opinion in neurobiology* **18**: 4-11.
- ZHONG Y, WANG QJ, LI X, YAN Y, BACKER JM, CHAIT BT. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature Cell Biology.* **11** (4): 468-76.



EKLER

Ek-1: Standart Solüsyonlar ve Tampon Çözeltiler

10x PBS

80 g NaCl

2 g KCl

8,01g Na₂HPO₄.2H₂O

2g KH₂PO₄

1 L ddH₂O pH: 7,2

1X PBS; 10X PBS'in 1:10 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Mg²⁺Ca²⁺ D-PBS

50 mL D-PBS

5 mg CaCl₂ (MW: 110.98 g/mol) = 0.0009 M

5 mg MgCl₂.6H₂O (MW: 203.30 g/mol) = 0.0005 M

50X TAE Tamponu

2M Tris Base (242 g)

57,1 mL Glacial Acetic Acid

50mM EDTA

ddH₂O ekleyerek 1 L hacime tamamlanır. 1XTAE; 50X TAE'nin 1:50 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

10 X Agaroza Jel Yükleme Boyası

0,009g BFB

0,009g XC

2,8mL ddH₂O

1,2mL 0,5M EDTA

Glisero1 ekleyerek 15 mL hacime tamamlanır. Jele yüklemeden önce 1:10 oranında seyreltilmiştir.

Immünfloresan Boyama için Bloklama Solüsyonu

1% BSA

3 mL 1XPBS

15 µL tween-20

DCFDA (chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)

(MW: 487.29 g/mol)

1 mL'de 10 mM DCFDA stok hazırlamak için 0.00487 gram toz tartılır.

Permeabilizasyon Solüsyonu

0,1 g sodyum asetat

100µL Triton X-100

100 mL ddH₂O

Ek-2: Kullanılan Hücre Hatları ve Genel Özellikleri

MKH

Tür: İnsan (Homo sapiens)

Hücre tipi: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre

Hücre hattı referans numarası: ATCC PCS-500-012™ (ATCC - American Type Culture Collection, Virginia, ABD)

Kullanılan besiyeri: %20 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren MSC-NutriStem® XF Medium (Biological Industries, ABD)

HUVEC

Tür: İnsan (Homo sapiens)

Hücre tipi: Umbilikal ven endotel hücresi

Hücre hattı referans numarası: ATCC CRL-1730™

Kullanılan besiyeri: %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM F-12 Medium (Biological Industries, ABD)

H9C2

Tür: Rat (Rattus norvegicus)

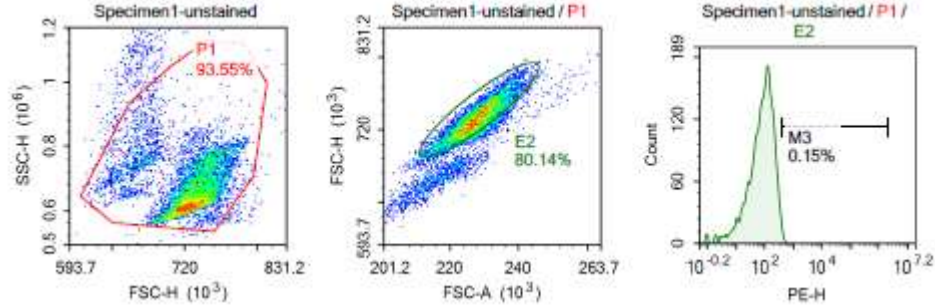
Hücre tipi: Kalp miyoblast hücresi

Hücre hattı referans numarası: ATCC CRL-1446™

Kullanılan besiyeri: %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM Low-Glucose Medium (Biological Industries, ABD)

Ek-3: Akım Sitometri Sonuç Raporları

KONTROL (Ticagrelorsuz) Eksozomlar:



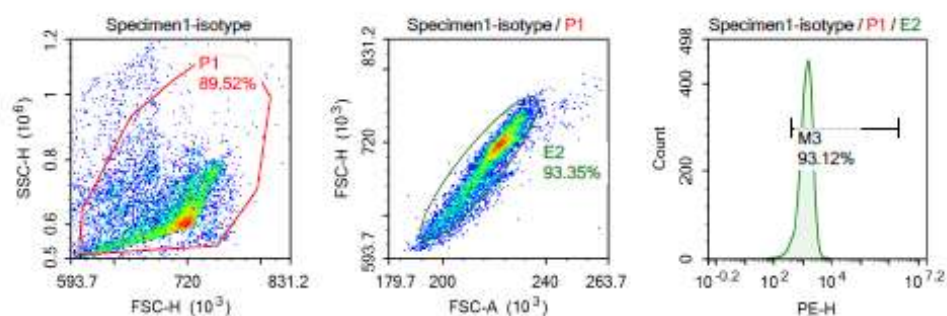
Gate	Count	% All	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000	100.00 %	732,892	709,846	36.96 %	67.73 %	727,091	656,797
P1	9,355	93.55 %	723,735	674,883	4.08 %	11.53 %	727,450	652,388

Gate	Count	% P1	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
P1	9,355	100.00 %	227,403	723,735	7.36 %	4.08 %	227,074	727,450
E2	7,497	80.14 %	227,755	732,674	2.62 %	2.54 %	227,737	731,653

Gate	Count	% E2	Mean X	CV X	Median X
E2	7,497	100.00 %	57	199.50 %	48
M3	11	0.15 %	508	6.62 %	488

Sample Statistics of unstained

Gate	Count	% Parent	X	Y	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000									
P1	9,355	93.55 %	FSC-H	SSC-H	723,735	674,883	4.08 %	11.53 %	727,450	652,388
E2	7,497	80.14 %	FSC-A	FSC-H	227,755	732,674	2.62 %	2.54 %	227,737	731,653
M3	11	0.15 %	PE-H	Count	508		6.62 %		488	



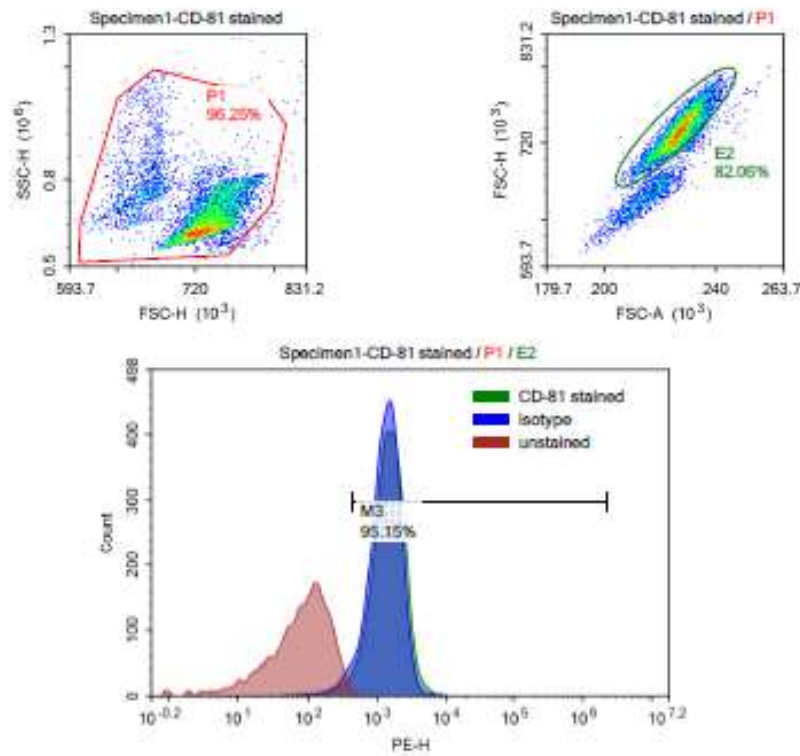
Gate	Count	% All	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000	100.00 %	707,525	675,206	49.04 %	63.45 %	706,156	629,840
P1	8,952	89.52 %	698,177	646,510	5.26 %	12.41 %	709,303	625,866

Gate	Count	% P1	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
P1	8,952	100.00 %	218,582	698,177	7.61 %	5.26 %	219,928	709,303
E2	8,357	93.35 %	217,836	699,955	4.22 %	4.86 %	219,943	710,344

Gate	Count	% E2	Mean X	CV X	Median X
E2	8,357	100.00 %	1,487	101.35 %	1,379
M3	7,782	93.12 %	1,585	95.44 %	1,442

Sample Statistics of isotype

Gate	Count	% Parent	X	Y	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000									
P1	8,952	89.52 %	FSC-H	SSC-H	698,177	646,510	5.26 %	12.41 %	709,303	625,866
E2	8,357	93.35 %	FSC-A	FSC-H	217,836	699,955	4.22 %	4.86 %	219,943	710,344
M3	7,782	93.12 %	PE-H	Count	1,585			95.44 %	1,442	



Gate	Count	% All	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000	100.00 %	739,740	704,820	52.56 %	54.63 %	728,582	658,269
P1	9,625	96.25 %	722,920	685,823	4.38 %	14.08 %	728,059	657,197

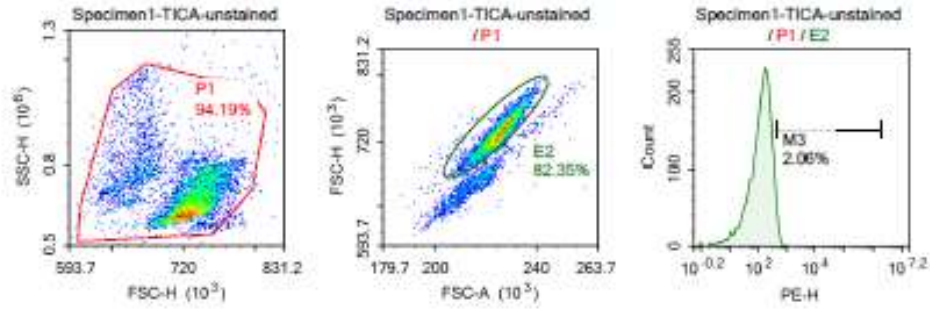
Gate	Count	% P1	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
P1	9,625	100.00 %	226,282	722,920	12.81 %	4.38 %	225,823	728,059
E2	7,898	82.06 %	226,703	733,466	2.72 %	2.64 %	226,830	732,704

#	Sample	Gate	Count	% E2	Mean X	CV X	Median X
1	CD-81 stained	E2	7,898	100.00 %	1,667	58.69 %	1,520
1	CD-81 stained	M3	7,515	95.15 %	1,745	53.69 %	1,567
2	isotype	E2*	8,357	100.00 %	1,487	101.35 %	1,379
2	isotype	M3	7,782	93.12 %	1,585	95.44 %	1,442
3	unstained	E2*	7,497	100.00 %	57	199.50 %	48
3	unstained	M3	11	0.15 %	508	6.62 %	488

Sample Statistics of CD-81 stained

Gate	Count	% Parent	X	Y	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000									
P1	9,625	96.25 %	FSC-H	SSC-H	722,920	685,823	4.38 %	14.08 %	728,059	657,197
E2	7,898	82.06 %	FSC-A	FSC-H	226,703	733,466	2.72 %	2.64 %	226,830	732,704
M3	7,515	95.15 %	PE-H	Count	1,745		53.69 %		1,567	

TICA (Ticagrelorlu) Eksozomlar:



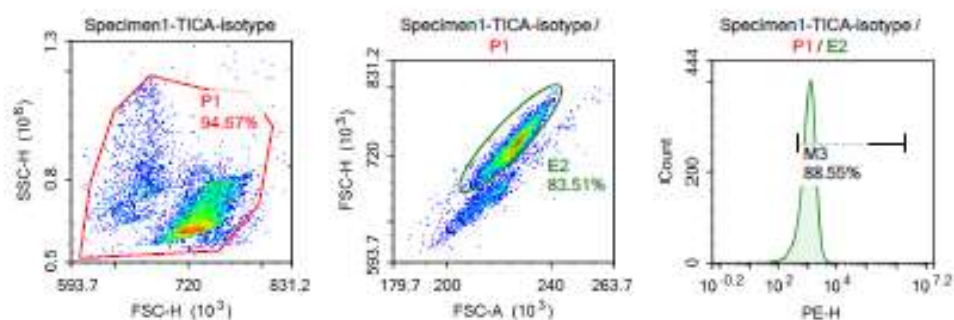
Gate	Count	% All	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000	100.00 %	821,109	699,084	89.13 %	77.65 %	725,756	653,034
P1	9,419	94.19 %	720,130	685,565	4.29 %	14.39 %	724,647	654,519

Gate	Count	% P1	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
P1	9,419	100.00 %	223,978	720,130	7.02 %	4.29 %	224,046	724,647
E2	7,757	82.35 %	224,828	730,319	2.50 %	2.60 %	224,978	728,967

Gate	Count	% E2	Mean X	CV X	Median X
E2	7,757	100.00 %	125	126.69 %	113
M3	160	2.06 %	594	64.55 %	515

Sample Statistics of TICA-unstained

Gate	Count	% Parent	X	Y	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000									
P1	9,419	94.19 %	FSC-H	SSC-H	720,130	685,565	4.29 %	14.39 %	724,647	654,519
E2	7,757	82.35 %	FSC-A	FSC-H	224,828	730,319	2.50 %	2.60 %	224,978	728,967
M3	160	2.06 %	PE-H	Count	594			64.55 %	515	



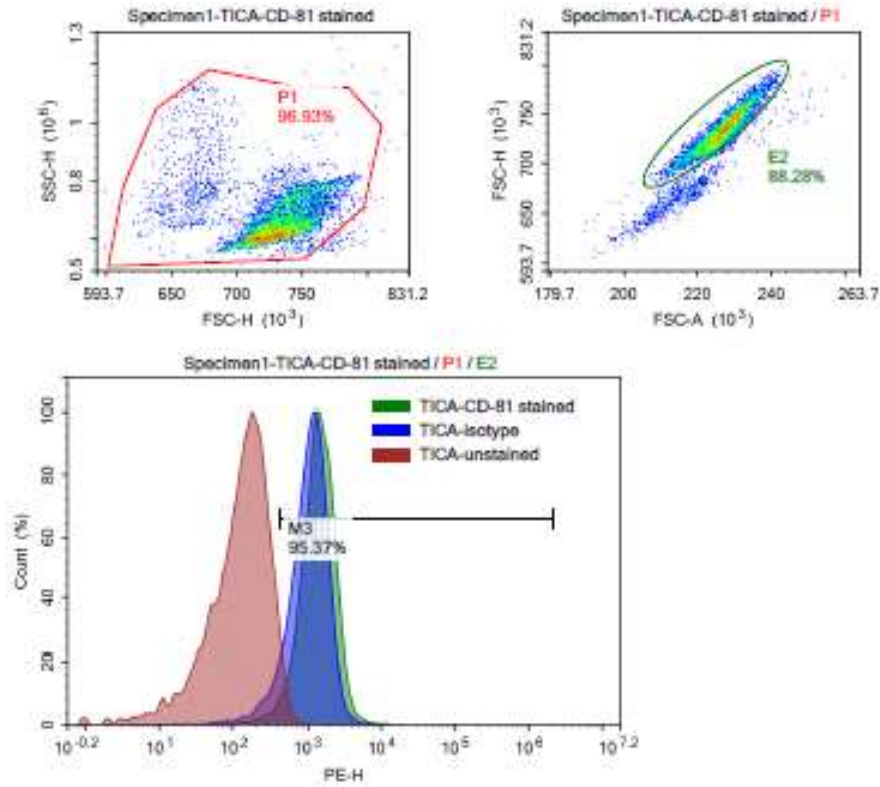
Gate	Count	% All	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000	100.00 %	776,854	705,165	75.12 %	70.27 %	727,652	654,086
P1	9,467	94.67 %	722,168	685,534	4.23 %	14.16 %	726,980	654,404

Gate	Count	% P1	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
P1	9,467	100.00 %	224,319	722,168	6.08 %	4.23 %	224,716	726,980
E2	7,906	83.51 %	225,384	732,030	2.44 %	2.57 %	225,623	731,132

Gate	Count	% E2	Mean X	CV X	Median X
E2	7,906	100.00 %	1,205	76.47 %	1,129
M3	7,001	88.55 %	1,343	52.93 %	1,223

Sample Statistics of TICA-isotype

Gate	Count	% Parent	X	Y	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000									
P1	9,467	94.67 %	FSC-H	SSC-H	722,168	685,534	4.23 %	14.16 %	726,980	654,404
E2	7,906	83.51 %	FSC-A	FSC-H	225,384	732,030	2.44 %	2.57 %	225,623	731,132
M3	7,001	88.55 %	PE-H	Count	1,343		52.93 %		1,223	



Gate	Count	% All	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000	100.00 %	734,808	687,634	32.51 %	44.74 %	731,223	649,788
P1	9,693	96.93 %	727,799	676,771	3.90 %	12.91 %	730,717	649,630

Gate	Count	% P1	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
P1	9,693	100.00 %	225,952	727,799	6.24 %	3.90 %	226,190	730,717
E2	8,557	88.28 %	226,637	734,615	2.52 %	2.65 %	226,841	733,737

#	Sample	Gate	Count	% E2	Mean X	CV X	Median X
1	TICA-CD-81 stained	E2	8,557	100.00 %	1,609	62.20 %	1,460
1	TICA-CD-81 stained	M3	8,161	95.37 %	1,681	57.27 %	1,500
2	TICA-isotype	E2*	7,906	100.00 %	1,205	76.47 %	1,129
2	TICA-isotype	M3	7,001	88.55 %	1,343	52.93 %	1,223
3	TICA-unstained	E2*	7,757	100.00 %	125	126.69 %	113
3	TICA-unstained	M3	160	2.06 %	594	64.55 %	515

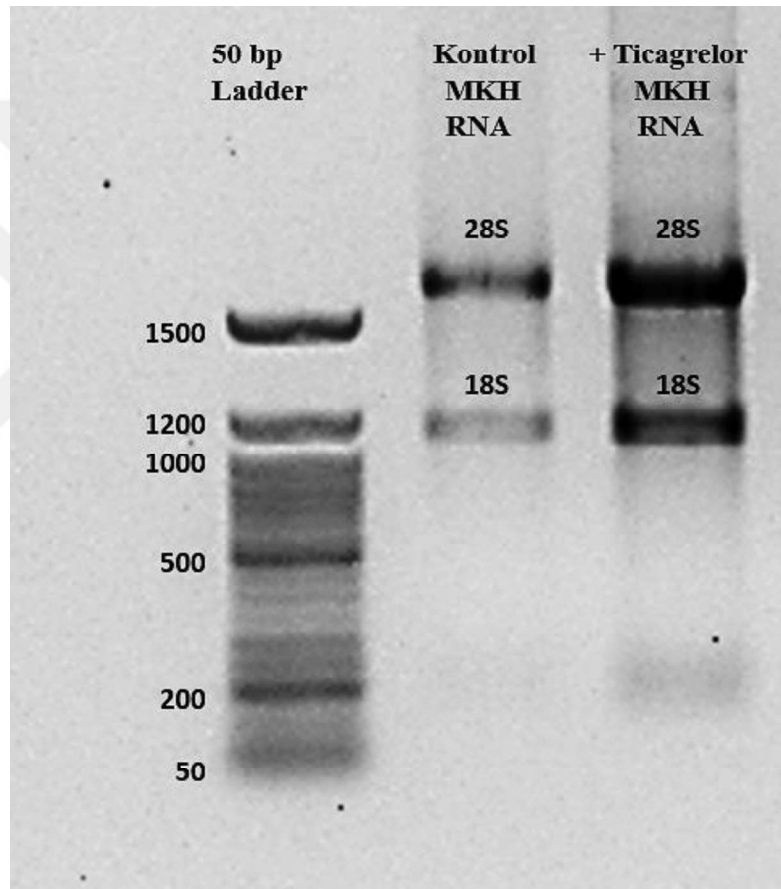
Sample Statistics of TICA-CD-81 stained

Gate	Count	% Parent	X	Y	Mean X	Mean Y	CV X	CV Y	Median X	Median Y
All	10,000									
P1	9,693	96.93 %	FSC-H	SSC-H	727,799	676,771	3.90 %	12.91 %	730,717	649,630
E2	8,557	88.28 %	FSC-A	FSC-H	226,637	734,615	2.52 %	2.65 %	226,841	733,737
M3	8,161	95.37 %	PE-H	Count	1,681			57.27 %		1,500

Ek-4: Total RNA İzolasyonu Sonuçları

Ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerden izole edilen total RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları.

Örnek	A260	A280	260/280 (Saflık)	Konsantrasyon (ng/ μ L)
Kontrol MKH RNA	1.124	0.571	1.968	898.862
+Ticagrelor MKH RNA	2.769	1.471	1.883	2215.498



Ticagrelor ile muamele edilmiş ve edilmemiş MKH'lerden izole edilen total RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezindeki representatif bant görüntüleri.