

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEISHMANIASIS TEDAVİSİNDE EKSTRASELLÜLER
VEZİKÜLLER İÇEREN FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ
VE ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Gülnaz YILDIRIM KÖKEN

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Eş Danışman

Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Şubat, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEISHMANIASIS TEDAVİSİNDE EKSTRASELLÜLER VEZİKÜLLER
İÇEREN FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ

Gülnaz YILDIRIM KÖKEN tarafından hazırlanan tez çalışması 04.02.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Erdal KARAÖZ
İstinye Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İREZ, Üye
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Doç Dr. Serap DERMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi, Üye

Dr. Öğretim Üyesi Hakan DARICI
İstinye Üniversitesi, Üye

Danışmanım Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Leishmaniasis tedavisinde ekstrasellüler veziküller içeren formülasyonların geliştirilmesi ve etkinliğinin incelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Gölnaz YILDIRIM KÖKEN

İmza

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilimsel ve akademik anlamda her türlü desteği sağlayan, bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen Yıldız Teknik Üniversitesi Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarının kurucuları çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melahat BAĞIROVA'ya, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a en içten sevgilerimle teşekkür ediyorum.

Ayrıca, tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sağlayarak laboratuvarının kapısını açan Ulus Liv Hospital LivMedcell Rejeneratif Tıp ve Kök Hücre Üretim Merkezi Direktörü aynı zamanda eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e ve Merkez Sorumlusu Dr. Olga Nehir ÖZTEL'e desteklerinden ötürü teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin deneysel olarak değerlendirilme süreçlerinde bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, önerileri ve değerlendirmeleri ile çalışmaya katkıda bulunan çok değerli tez izleme komitesi jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK'a ve Prof. Dr. Tülay İREZ'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hayatımın her evresinde sonsuz destekleriyle yanımda olan, anlayış ve sevgilerini esirgemeyen sevgili babam Kuddusi YILDIRIM, sevgili annem Munise YILDIRIM ve çok sevdiğim kardeşlerim Kübra KOŞAR, Büşra ve Mürvet YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmam boyunca en az benim kadar çalışan, bu zor yolda her adımda bana yardımcı olan sevgili eşim Yusuf Yalçın KÖKEN'e ve varlığıyla bana güç veren canım oğlum Enis'e çok teşekkür ederim.

Gülnaz YILDIRIM KÖKEN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	19
1.1 Literatür Özeti	19
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Hipotez	10
2 GENEL BİLGİLER	12
2.1 Leishmania.....	12
2.1.1 Leishmania Yaşam Döngüsü.....	14
2.1.2 Leishmania Epidemiyolojisi	16
2.1.3 Leishmaniasis Klinik Şekilleri.....	20
2.1.4 Leishmaniasis Tedavisi	25
2.1.5 Leishmania Konak Bağışıklık Tepkileriyle Etkileşimleri	28
2.2 Kök Hücreler	30
2.2.1 Farklılaşma Potansiyeline Göre Kök Hücre Sınıflandırması	31
2.2.2 Kökenine Göre Kök Hücre Sınıflandırması	33
2.3 Mezenkimal Kök Hücreler	37
2.3.1 WJ Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	38
2.3.2 WJ-Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları	41
2.4 Ekstrasellüler Vesiküller	45
2.4.1 Ekstrasellüler vezikül türleri	45
2.4.2 Eksozomların Biyogenezi	47
2.4.3 Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlar	49
2.4.4 Eksozomların karakterizasyon analizleri	52
2.4.5 Eksozomların fonksiyonları	53
2.5 Salisilik asit.....	60
2.6 Aleo-emodin.....	63
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	67

3.1	Materyal.....	67
3.1.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler.....	67
3.1.2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Besiyeri/Çözeltiler	68
3.2	Metod	70
3.2.1	<i>In vitro</i> Hücre Kültürü.....	70
3.2.2	<i>L. Major</i> Kültürünün Yapılması	72
3.2.3	Göbek Kordonundan Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi ve Karakterizasyonu	72
3.2.4	Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerden Ekstrasellüler Vesiküllerin Üretilmesi ve Karakterizasyonunun Yapılması.....	81
3.2.5	Deneylerde Kullanılacak Formülasyonların Hazırlanması.....	89
3.2.6	Eksozom, Salisilik Asit ve Aleo-Emodin Formülasyonlarının Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Toksik Etkisinin <i>in vitro</i> Olarak Belirlenmesi.....	90
3.2.7	Formülasyonların <i>L. Major</i> Parazitlerinin Metabolik Aktiviteleri Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	91
3.2.8	Formülasyonların Makrofaj Hücrelerinde Nitrik Oksit Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	91
3.2.9	Formülasyonların <i>L. Major</i> Parazit Sayıları Üzerine Zamana Bağlı Etkisinin Belirlenmesi.....	93
3.2.10	Eksozom, Salisilik Asit ve Aleo-Emodin Formülasyonlarının Anti-Leishmanial Etkinliğinin Belirlenmesi	93
3.2.11	Eksozom, Salisilik Asit ve Aleo-Emodin Formülasyonlarının <i>in vitro</i> Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	94
4	DENEYSEL SONUÇLAR	95
4.1	Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Görüntüleri	95
4.2	Göbek Kordonundan İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	97
4.2.1	Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometrik Analizleri	97
4.2.2	Gen ekspresyonu analizleri.....	98
4.2.3	Göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin telomeraz enzim aktiviteleri	98
4.3	Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların karakterizasyonu ve miktar tayinlerinin yapılması.....	100
4.3.1	Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların flow sitometrik karakterizasyonu	100

4.3.2	Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların boyut analizi.....	101
4.3.3	Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların SEM ile karakterizasyonu	103
4.4	Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların farklı hücre hatları üzerindeki toksik etkisi.....	104
4.5	Salisilik asit konsantrasyonlarının farklı hücre hatları üzerindeki toksik etkisi.....	105
4.6	Aleo-emodin konsantrasyonlarının farklı hücre hatları üzerindeki toksik etkisi.....	106
4.7	Formülasyonların <i>L. major</i> parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	108
4.7.1	Eksozom konsantrasyonlarının <i>L. major</i> parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	108
4.7.2	Salisilik asit konsantrasyonlarının <i>L. major</i> parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	109
4.7.3	Aleo-emodin konsantrasyonlarının <i>L. major</i> parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	110
4.8	Formülasyonların Makrofaj ve Enfekte Makrofajlar Üzerinde Nitrik Oksit Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	111
4.9	Formülasyonların <i>L. Major</i> Parazit Sayısı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi ...	114
4.9.1	Eksozom Konsantrasyonlarının <i>L. Major</i> Parazit Sayısı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi.....	114
4.9.2	Salisilik Asit Konsantrasyonlarının <i>L. Major</i> Parazit Sayısı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi.....	115
4.9.3	Aleo-Emodin Konsantrasyonlarının <i>L. Major</i> Parazit Sayısı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi.....	116
4.10	Eksozom ve Kombin Dozların <i>L. Major</i> Parazit Sayısı Üzerindeki Zamana Bağlı Etkisinin Belirlenmesi.....	117
4.10.1	Eksozom ve Salisilik Asit Kombin Dozlarının <i>L. Major</i> Parazit Sayısı Üzerine Zamana Bağlı Etkisi.....	117
4.10.2	Eksozom ve Aleo-Emodin Kombin Dozlarının <i>L. Major</i> Parazit Sayısı Üzerine Zamana Bağlı Etkisi.....	118
4.11	Eksozom ve Kombin Dozların Enfekte Makrofajlarda Nitrik Oksit Üretimine Etkisi.....	120
4.11.1	Eksozom ve Salisilik Asit Kombin Dozlarının Enfekte Makrofajlar Üzerinde Nitrik Oksit Üretimine Etkisi	120
4.11.2	Eksozom ve Aleo-Emodin Kombin Dozlarının Enfekte Makrofajlar Üzerinde Nitrik Oksit Üretimine Etkisi	121
4.12	Eksozom ve Kombin Dozların Anti-amastigot Etkisinin Belirlenmesi.....	122

4.12.1 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının anti-amastigot etkisi..	122
4.12.2 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının anti-promastigot etkisi	123
4.13 Eksozom ve Kombin Dozların Enfeksiyon İndeksi Üzerine Etkisi	125
4.13.1 Eksozom ve salisilik asit kombin dozların enfeksiyon indeksi üzerine etkisi	125
4.13.2 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozların enfeksiyon indeksi üzerine etkisi	126
4.14 Formülasyonların <i>in vitro</i> Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi.....	128
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	130
KAYNAKÇA	145
A ETİK KURULU KARAR FORMLARI	176
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	178

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
Vero	Fare böbrek hücre hattı
L929	Fare fibroblast hücre hattı
J774	Fare tümör monosit hücre hattı
ml	Mililitre
mg	Miligram
M	Molar
μ g	Mikrogram
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
cm	Santimetre

KISALTMA LİSTESİ

AE	Aleo-emodin
AKI	Akut böbrek hasarı
Alix	ALG2 etkileşimli protein X
ASC	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (Adipose Stem Cell)
circRNA	Dairesel RNA
DLS	Dinamik ışık saçılması
DMD	Duchenne Muskular Distrofi
DMSO	Dimetilsülfoksit
EV	Ekstrasellüler Veziküller
FDA	Food and Drug Administration
GMP	Good Manufacturing Practise (İyi Üretim Uygulamaları)
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
IR	İskemi reperfüzyon
ISCT	International Society of Cellular Therapy
ISEV	Uluslararası Ekstrasellüler Veziküller Derneği
KLF4	Onkoprotein c-MYC ve Kruppel benzeri faktör 4
MHC	Major histo uyumluluk kompleksi
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
mRNA	Haberci RNA
MVB	Multiveziküler cisimcikler
ncRNA	Kodlayıcı olmayan RNA
NTA	Nanoparçacık izlem analizi
NTA	Nanoparticle Tracking Assay
OCT3/4	Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 3/4
ROS	Reaktif oksijen türleri
RVG	Kuzu viral glikoprotein peptidi
SA	Salisilik asit

SOX2	SRY ile ilgili yüksek hareketlilik grup protein-2
TNF- α	Tümör nekroz alfa
TSG101	Tümör Duyarlılık Geni
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	World Helth Organisation
WJ	Wharton Jeli

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Ergin (a) dişi ve (b) erkek kum sineği	13
Şekil 2.2 Leishmania parazitinin iki formunun morfolojisini gösteren diyagramı	14
Şekil 2.3 Leishmania yaşam döngüsü:iki ve üç boyutlu örnek görüntüleme	15
Şekil 2.4 (a) Viseral leishmaniasis'in dünyadaki durumu. (b) Dünyada kutanöz leishmaniasisin durumu	18
Şekil 2.5 Tür tanımlamasına dayalı KL'nin Türkiye'deki mevcut klinik ve coğrafi durumu.....	20
Şekil 2.6 KL'nin klinik sunumları	21
Şekil 2.7 a) Kronik kutanöz leishmaniasis; 4 yıldır sağ dirsekte tümöral lezyon. b) Leishmaniasis recidivans; atrofik iyileşmiş merkez ve periferde yeni başlayan papüller. c) Tümör kutanöz leishmaniasis; ciltte dev ülser	22
Şekil 2.8 Visseral Leishmaniasis tanılı hasta	23
Şekil 2.9 (A) Nazal perforasyon ile komplike mukokutanöz leishmaniasis (MKL), (B) Diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL), (C) sağ yanakta dev KL plak ve (D) MKL ülseri olan Yemenli kız. Bölgesel Leishmaniasis Kontrol Merkezi klinikleri, Yemen	24
Şekil 2.10 a) Sudanlı bir hastada tipik papüler döküntü. B) Bangladeşli bir hastada maküler döküntü	25
Şekil 2.11 Leishmaniasise karşı farklı tedavi yaklaşımları	29
Şekil 2.12 Hücresel terapide kullanılan farklı kök hücre kaynakları (Biorender.com'da çizildi)	31
Şekil 2.13 Kök hücre yenilenmesi ve farklılaşması.....	33
Şekil 2.14 Üç boyutlu bir diyagram ile insan göbek kordonunun yapısı	39
Şekil 2.15 WJ kökenli mezenkimal kök hücrelerin yenileyici özellikleri	42
Şekil 2.16 Ekstrasellüler vesikül türleri	46
Şekil 2.17 Eksozom Biyogenezi (Biorender.com'da çizildi)	48
Şekil 2.18 Ekstrasellüler veziküllerin yaralı doku üzerindeki etkileri	51
Şekil 2.19 Yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerden izole edilen eksozomların deri üzerindeki etkisi	56
Şekil 2.20 Aleo-emodin kimyasal yapısı	65
Şekil 3.1 Göbek kordonundan mezenkimal kök hücre izolasyon, üretim ve kriyoprezervasyon süreçlerinin şematik özeti (Biorender.com'da çizildi)	74
Şekil 3.2 Eksozom üretimi ve saflaştırma süreçlerinin şematik özeti (Biorender.com'da çizildi)	82

Şekil 3.3 Eksozom izolasyonunda kullanılan a) Ultrasantrifüj b) Ultrasantrifüj Rotoru c) Ultrasantrifüj Tüpü	83
Şekil 3.4 Lazer saçınım boyut analiz cihazının çalışma prensibi	87
Şekil 3.5 a) Zeta potansiyel ölçüm küveti b) Parçacık boyutu ölçüm küveti.....	88
Şekil 3.6 Nanosight NS300 çalışma prensibi	89
Şekil 3.7 Canlı hücrelerde formazan kristallerinin oluşum mekanizması	90
Şekil 4.1 Wharton Jeli kökenli mezenkimal kök hücrelerin morfolojik görüntüsü A) P0/5.gün B) P0/8.gün C) P0/11.gün D) P1/2.gün	96
Şekil 4.2 Wharton Jeli kökenli mezenkimal kök hücrelerin morfolojik görüntüsüA) P1/3.gün B) P2/4.gün C) P3/3.gün D) P3/Confluent.....	96
Şekil 4.3 Göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri.....	97
Şekil 4.4 Göbek kordonundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin pluripotensi genlerinin ekspresyon seviyeleri	98
Şekil 4.5 Göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin telomeraz enzim aktivitesinin hesaplanması için kullanılan parametreler ve RTA seviyesinin hesaplanması	99
Şekil 4.6 Göbek kordonu kökenli mezenkimal kök hücrelerin serumsuz DMEM F-12 besiyeri içerisindeki mikroskopik görüntüsü.....	100
Şekil 4.7 WJ-MKH kökenli eksozomların flow sitometri yöntemi ile karakterizasyon sonuçları	101
Şekil 4.8 WJ-MKH kökenli eksozomların Exo-Flow Exosome Purification Kiti ile flow sitometrik karakterizasyonu.....	101
Şekil 4.9 WJ-MKH'lerden elde edilen eksozomların Zeta Sizer ile boyut analizi sonucu	102
Şekil 4.10 WJ-MKH'lerden elde edilen eksozomların Nanosight NS300 ile boyut analizi sonucu	103
Şekil 4.11 Eksozomların SEM morfolojik analizleri.....	104
Şekil 4.12 Ekstrasellüler vesikül formülasyonlarının Vero ve L929 hücre hatları üzerindeki toksik etkileri.....	105
Şekil 4.13 Farklı salisilik asit konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi ($p<0,001$).....	106
Şekil 4.14 Farklı salisilik asit konsantrasyonlarının J774 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi	106
Şekil 4.15 Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi	107
Şekil 4.16 Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının J774 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi	108
Şekil 4.17 Eksozom formülasyonlarının <i>L. major</i> üzerindeki metabolik etkisi....	109

Şekil 4.18 Salisilik asit formülasyonlarının <i>L. major</i> üzerindeki metabolik etkisi	110
Şekil 4.19 Aleo-emodin formülasyonlarının <i>L. major</i> üzerindeki metabolik etkisi	110
Şekil 4.20 Salisilik asit konsantrasyonlarının J774 hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkisi.....	111
Şekil 4.21 Aleo-emodin konsantrasyonlarının J774 hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkisi.....	112
Şekil 4.22 Salisilik asit konsantrasyonlarının <i>L. major</i> ile enfekte edilmiş J774 hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkisi	112
Şekil 4.23 Aleo-emodin konsantrasyonlarının <i>L. major</i> ile enfekte edilmiş J774 hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkisi	113
Şekil 4.24 Eksozom formülasyonlarının <i>L. major</i> parazit sayısı üzerine zamana bağlı etkisi	115
Şekil 4.25 Salisilik asit formülasyonlarının <i>L. major</i> parazit sayısı üzerine zamana bağlı etkisi	116
Şekil 4.26 Aleo-emodin formülasyonlarının <i>L. major</i> parazit sayısı üzerine zamana bağlı etkisi	117
Şekil 4.27 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının <i>L. major</i> parazit sayısına zamana bağlı etkisi	118
Şekil 4.28 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının <i>L. major</i> parazit sayısında zamana bağlı etkisi	119
Şekil 4.29 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının enfekte makrofajların nitrik oksit üretimi üzerine etkisi.....	120
Şekil 4.30 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının enfekte makrofajların nitrik oksit üretimi üzerine etkisi	121
Şekil 4.31 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının <i>L. major</i> üzerine anti-promastigot etkisi.....	123
Şekil 4.32 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının <i>L. major</i> üzerine anti-promastigot etkisi.....	124
Şekil 4.33 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının enfeksiyon indeksi üzerine etkisi	126
Şekil 4.34 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının enfeksiyon indeksi üzerine etkisi	127
Şekil 4.35 Formülasyonlarının L929 hücre hattında yara iyileşmesi üzerine etkisi	128
Şekil 4.36 Formülasyonların L929 hücre hattında <i>in vitro</i> yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi	129

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Leishmania taksonomisi	13
Tablo 2.2 Kutanöz Leishmaniasis tedavisi için kullanılan ilaçların avantaj ve dezavantajları	26
Tablo 2.3 Aleo Veranın farmakolojik etkileri	63
Tablo 3.1 Real Time PCR protokolü	77
Tablo 3.2 Lizatların PCR tüplerinin hazırlanışı	78
Tablo 3.3 PCR reaksiyon süreçleri.....	78
Tablo 3.4 BCA kit prosedürüne göre working solüsyonunun hazırlanması	86
Tablo 3.5 Hücre sitotoksosite analizleri yapılan maddelerin konsantrasyonları...	91
Tablo 3.6 Eksozom kombin dozlarının hazırlanması.....	92

Leishmaniasis Tedavisinde Ekstrasellüler Veziküller İçeren Formülasyonların Geliştirilmesi ve Etkinliğinin İncelenmesi

Gülnaz YILDIRIM KÖKEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı Biyomühendislik Programı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Eş-Danışman: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Leishmaniasis tropik, subtropik bölgelerde ve Güney Avrupa'da oldukça yaygın olan, insanlarda görülen parazitik bir hastalıktır. Leishmaniasis kemoterapisi için kullanılan ilaçlar oldukça pahalıdır ve hastalarda toksik yan etkilere neden olmaktadır. Son dönemlerde, ekstrasellüler vezikül (EV) biyolojisine olan ilginin artmasıyla birlikte yapılan çalışmalar sonucunda, mikroskobik olarak oldukça küçük olan bu veziküllerin önemli fizyolojik fonksiyonları olduğu ortaya çıkmıştır. Mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomların pek çok hastalığın tedavisinde başarıyla kullanıldığı gösterilse de leishmaniasise karşı *in vitro* antiparazitik etkinlikleri ve leishmaniasise özgü yaraların iyileşmesindeki rolleri bugüne kadar araştırılmamıştır.

Bu çalışmada kutanöz leishmaniasis tedavisinde kullanılmak üzere göbek kordonundan mezenkimal kök hücrelerin (MKH) izolasyonu, üretimi ve karakterizasyonunu yapılması, MKH'lerden elde edilen ekstrasellüler veziküllerin (EV) izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılması ile ekstrasellüler

veziküllerin yara iyileştirmesindeki etkinliği daha önce gösterilen salisilik asit ve aloë-emodin isimli bileşenlerle kombinasyon halinde in vitro sitotoksik, antileishmanial ve yara iyileştirici aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, antileishmanial ilaçların dezavantajlarını içermeyen hem antiparaziter etkinlik hem de yara iyileştirici özellik gösterebilen yeni nesil ilaç adayı formülasyonların geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışma hem salisilik asit ve aleo-emodin hem de göbek kordonundan izole edilmiş MKH'lerden türetilen eksozomların Leishmania parazitlerinin her iki formu üzerinde de antileishmanial etkinlik gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, kombinasyon halinde kullanıldıklarında gerek antileishmanial etkinliklerinin gerekse de yara iyileştirme kabiliyetlerinin anlamlı ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Eksozomların yüksek seviyedeki yara onarım performansları göz önüne alındığında, bu kombinasyonun sadece yaralardaki parazitleri inhibe etmekle kalmayacağı, aynı zamanda defektli dokuların rejenerasyonunu da artıracığı düşünülmektedir. Yara bölgesindeki parazitleri inhibe etme ve açık yaraları iyileştirme konusundaki potansiyelleri nedeniyle, bu kombinasyonların gelecekte Kutanöz Leishmaniasis tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirileceğini öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kutanöz leishmaniasis, eksozom, Wharton jeli kökenli mezenkimal kök hücre, salisilik asit, aleo-emodin

Development of Formulations Containing Extracellular Vesicles and Evaluation of Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis

Gölnaz YILDIRIM KÖKEN

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Emrah Şefik ABAMOR

Co-supervisor: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Leishmaniasis is a parasitic disease in humans that is very common in tropical, subtropical regions and Southern Europe. The drugs used for leishmaniasis chemotherapy are quite expensive and cause toxic side effects in patients. Recently, with the increasing interest in extracellular vesicle (EV) biology, studies have revealed that these microscopically small vesicles have important physiological functions. Although it has been shown that exosomes isolated from mesenchymal stem cells have been successfully used in the treatment of many diseases, their in vitro antiparasitic activities against leishmaniasis and their role in the healing of leishmaniasis-specific wounds have not been investigated until now.

In this study, isolation, production and characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from the umbilical cord for use in the treatment of cutaneous leishmaniasis, isolation, purification and characterization of extracellular vesicles (EVs) obtained from MSCs, and salicylic acid and In this study, it was aimed to examine in vitro cytotoxic, antileishmanial and wound healing activities in combination with

components named aloe-emodin. In addition, it is aimed to develop new generation drug candidate formulations that do not contain the disadvantages of antileishmanial drugs, which can show both antiparasitic activity and wound healing properties.

This study reveals that both salicylic acid and aloe-emodin and exosomes derived from MSCs isolated from the umbilical cord exert antileishmanial activity on both forms of Leishmania parasites. However, it has been determined that both antileishmanial activities and wound healing abilities increase significantly when used in combination. Given the high level of wound repair performance of exosomes, it is thought that this combination will not only inhibit parasites in wounds, but also increase the regeneration of defective tissues. Because of their potential to inhibit parasites at the wound site and heal open wounds, we anticipate that these combinations will be considered a promising approach in the treatment of Cutaneous Leishmaniasis in the future.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, exosome, Wharton jelly derived mesenchymal stem cell, salicylic acid, aloe-emodin

1.1 Literatür Özeti

Leishmaniasis, başta Phlebotomus ve Lutzomyia (Avrupa, Kuzey Afrika, Orta Doğu, Asya ve Güney Amerika'nın bir kısmı) olmak üzere bir kum sineğinin ısırması yoluyla insanlara bulaşan hücre içi bir parazitin neden olduğu tropikal ve subtropikal bir hastalıktır. İstisnai olarak, bir laboratuvar kazası sonucu enfeksiyonun olduğu rapor edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, leishmaniasis en önemli yedi tropikal hastalıktan biridir ve potansiyel olarak ölümcül sonuçları olabilen, geniş klinik belirtiler gösteren ciddi bir dünya sağlık sorununu temsil etmektedir [1]. Okyanusya hariç tüm kıtalarda bulunur ve Kuzeydoğu Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu, Güneydoğu Meksika ve Orta ve Güney Amerika'daki sınırlı coğrafi bölgelerde endemiktir. Klinik özellikler, enfekte olunan Leishmania türlerine ve konağın bağışıklık tepkisine bağlı olarak farklı şiddetlerde çok çeşitli belirtiler içermektedir. Leishmaniasis, dünya çapında geniş yayılım gösteren ve 89 ülkede bulunan bir hastalıktır [2]. Asya, Afrika, Amerika ve Akdeniz bölgesinde endemiktir. Amerika kıtasında, esas olarak Phlebotomus ve Lutzomyia cinslerinden kum sinekleri tarafından bulaşan bir orman zoonozudur (ancak yarı çöl veya soğuk bölgelerde). Şili, Uruguay ve El Salvador hariç, Amerika Birleşik Devletleri'nin güneyinden Arjantin'in kuzey eyaletlerine kadar birçok ülkede kutanöz leishmaniasis (KL) için %0.17 seroprevalansı bulunur [3]. Dünyada 12 ila 15 milyon insan enfekte ve 350 milyon kişi hastalığa yakalanma riski altındadır. Her yıl tahminen 1,5 ila 2 milyon yeni vaka ortaya çıkmaktadır ve yılda bu vakaların 70.000'i ölümle sonuçlanmaktadır. 2012'de DSÖ, dünya çapında 102 ülke veya bölgede leishmaniasis'in yükü ve dağılımı hakkında rapor hazırlamaya yönelik çalışmalar yapmıştır ve 2010 yılına kadar olan veriler, küresel VL vakalarının Banglades, Brezilya, Etiyopya, Hindistan, Güney Sudan ve Sudan'da mevdana

{

}

(

KL ilk olarak Eski Dünya'da 1876'da Lewis ve Cunningham tarafından tanımlanmıştır. Bu hastalığın temel etkeni *L. tropica* 'dır. Güneybatı Meksika'da ve Guatemala sınırında, KL temel etkeni *L. mexicana*'dır. Vücudun vektör ısırıklarına maruz kalan bölgelerinde oluşur, en çok tutulan bölgeler kulaklardır. Burun, üst dudak, yanaklar, bacaklar, eller, kollar ve ayak bileklerinde de KL'ye daha sık rastlanmaktadır. Kuluçka dönemi 1 ila 4 hafta kadar sürmektedir ancak birkaç yıla kadar sürebilir. Isırılan bölgede sıcaklık ve şişmenin artışı ile karakterizedir. Kaşıntı mevcut olmasına rağmen, ısırık bölgesinde eritematöz asemptomatik bir papül görülmektedir. Boyut 1 ila 10 mm arasında değişir. 2 gün sonra vezikül, daha sonra püstül haline dönüşür. Kendiliğinden veya darbeye bağlı bir travma ile hasar gördüğünde, keskin ve sivri uçlu, nodüler veya kalın sınırları olan yuvarlak bir ülser oluşmaktadır. Bu tür ülserler 3-5 aydan 15-20 yıla kadar deri üzerinde kalabilir. Ülserin alt kısmında, sürtündüğünde kanayan granülasyon dokusu görülmektedir. Yara dokusu beyazımsı bir psödomembran ile kaplanmıştır. Bazı durumlarda, bol miktarda salgı yapışık bir kabuk oluşturur. Sekonder olarak enfekte değilse lezyon bölgesinde ağrı olmayabilir. Ülserler tek veya çoklu olabilir; ülserli alanlarla uzun süreli temas yoluyla bir önceki sivrisinek ısırığından uzak bölgelerde (ön kollarda olduğu gibi) enfeksiyon ile otoinokülasyon gözlemlenmiştir [4].

Multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak bilinen MKH'ler rejeneratif tıbbın, yara bölgesine göç etme kabiliyetlerinin yanı sıra çok-dereceli farklılaşma potansiyelleri ve in vitro koşullar altında yüksek seviyede çoğalma yetenekleri ile büyük ilgi odağı olmuştur. Farklı organların (kalp, böbrek, akciğer ve karaciğer) akut doku yaralanmasındaki potansiyel terapötik uygulamaları için, MKH'ler klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yakın zamanda yapılan çalışmalar, MKH'lerin yaralı doku hücrelerinde yararlı etkisinin, farklılaşmalarına değil, koruyucu bir mekanizmanın aktive edilmesine ve endojen rejenerasyonunun uyarılmasına bağlı olduğunu göstermiştir. İleri sürülen bu fikir apoptoz ve fibrozu inhibe ettiği, anjiyogenezi arttırdığı, mitozu uyardığı ve / veya doku-iç progenitör hücrelerinin farklılaşmasını ve immün tepkisini modüle ettiği bilinen biyoaktif çözünür faktörlerin üretilmesiyle desteklenmektedir. MKH'ler tarafından salgılanan biyoaktif moleküller, hedef hücreleri doğrudan aktive eden ve/veya komşu hücrelerin, fonksiyonel olarak aktif ajanları salgılamasına neden olan parakrin veya endokrin düzenleyicileri olarak görev yapmaktadır. Mezenkimal kök hücreler,

belirli çoklu farklılaştırıcı ve fonksiyonel özelliklerin yanı sıra olgunlaşmış mikroRNA'ların seçilmiş modelleriyle mRNA içeren önemli miktarda mikrovezikül salgırlarlar. Bu nükleik asitler, mikroveziküller yoluyla alıcı hücrelere aktararak fonksiyonel ve fenotipik değışiklikler meydana getirilebilir. Bu gözlem, kök hücrelerin, genetik bilgi sunarak ve hedef hücrelerin gen ekspresyonunu değıştirerek mRNA ve microRNA'nın mikrovezikül aracılı transferi yoluyla biyolojik etkilerini değıştirebilme olasılığını ortaya koymaktadır. Embriyonik kök hücre mikroveziküllerinin önemli miktarda mikroRNA içerdğı ve bu mikroRNA'nın in vitro olarak fare embriyonik fibroblastlarına aktarılabilceğı gösterilmiştir. Ek olarak, insan mezenkimal kök hücrelerinden ve insan karaciğer kök hücrelerinden (HLSC'ler) salınan mikroveziküllerin, RNA'nın hücre içi trafiğinde yer alan ribonükleoproteinleri ve seçilmiş yetişkin mikroRNA modellerini içeren, mezenkimal kökenli insan yetişinkök hücreleri tarafından üretilen MV'lerde dinamik bir düzenleme ve bölümlendirmeyi önerdiği gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücre türevli mikroveziküllerin benzer bir koruyucu etkisi, bir renal iskemi/reperfüzyon hasarı modelinde gözlemlendi. Bu modelde, MV'lerin uygulanması sadece apoptozu inhibe ederek ve proliferasyonu uyararak akut hasarı sınırlamakla kalmayıp, aynı zamanda kronik böbrek hastalığının gelişimini de önlemektedir. Bir başka çalışmada, HLSC türevli MV'lerin insan ve sıçan hepatositlerinin in vitro proliferasyonuna ve apoptoz direncine neden olduğunu göstermiştir. In vivo çalışmada ise, % 70 hepatektomi modelinde mikroveziküllerin uygulanması ile birlikte morfolojik ve işlevsel toparlanmanın oluştuğı görülmüştür.

Ekstrasellüler veziküller (EV) (eksozomlar, prostasomlar, mikroveziküller, ektozomlar ve onkozomlar), bağışıklık düzenlemesinden doku fizyolojisi ve rejenerasyonu dahil olmak üzere nöronal iletişime kadar temel hücresel süreçlerde yer alan proteinleri, lipidleri ve nükleik asitleri taşıyarak alıcı hücrelere iletmektedir. Tümör büyümesinden patojen bulaşmasına kadar olan patofizyolojik süreçler EV'lerden etkilenmektedir. EV'ler, biyogenezlerinde, yapılarında ve hedef hücrelerle etkileşimlerinde yer alan ortak bir bileşen kompleksi taşımaktadır. Farklı hücre tipleri tarafından salınan EV'lerde benzersiz protein alt kümeleri bulunmaktadır [5]. 1980'lerin başında keşfedilen eksozom terimi, retikülositler tarafından salgılanan endozomal kökenli küçük (30-100 nm) vezikülleri belirtmek için kullanılmıştır. Eksozom salgılanması, küçük veziküllerin tümörün yok

edilmesine yol açan bağışıklık tepkilerini uyardığı bağışıklık hücrelerinde daha ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. Hücreler yalnızca eksozomları değil, aynı zamanda mikroveziküller (MV'ler) olarak adlandırılan plazma zarının tomurcuklanmasıyla üretilen vezikülleri de serbest bırakabildiğinden, farklı EV türlerinin ve bunların ilgili işlevlerinin net bir şekilde anlaşılması karmaşık bir süreçtir. İzolasyon yöntemleri, her vezikül alt tipinin yüksek oranda zenginleştirilmiş örneklerini elde edebilmek için tam olarak optimize edilememiştir. Farklı vezikül türleri için saflaştırma ve karakterizasyon protokollerini standardize etme çabaları halen devam etmektedir. Eksozomlar, ilk olarak 1980'lerde tanımlanan yaklaşık 30-150 nm boyutunda EV'nin bir alt kümesidir. Oligodendrositler, astrositler, nöronlar, mikrogliya gibi merkezi sinir sistemi (CNS) hücreleri de dahil olmak üzere vücutta bilinen hemen hemen her hücre tipi tarafından salınırlar. Eksozomlar ayrıca beyin omurilik sıvısı, kan, anne sütü ve idrar da dahil olmak üzere çoğu vücut sıvısında bulunur. Eksozomlar, tetraspanin proteini CD9'un ekspresyonu ile diğer EV'lerden ayırt edilir. CD81 ve CD63 de yaygındır ancak eksozomlarda her yerde ifade edilmektedir. Eksozomlar genellikle, seramid ve sfingomyelin gibi lipid bileşenlerinin yüksek konsantrasyonları ile karakterize edilir [6].

Wharton Jeli (WJ), göbek kordonu içerisinde myofibroblast benzeri stromal hücreler içeren jelatinli bir dokudur. Kök hücre fenotipi gösterdiği öne sürülen benzersiz bir hücre popülasyonu olan bu hücreler mezenkimal kök hücrelerdir (MKH). Kolay izolasyon, etik sorunların olmaması, yüksek proliferasyon, çok soylu farklılaşma potansiyeli ve göbek kordonu ile ölçülen mezenkimal kök hücrelerin immünomodülatör özellikleri, onları kök hücre araştırmalarında değerli bir araç haline getirir. Son zamanlarda, WJ'nin göbek kordonunun çeşitli bölümleri arasında en iyi mezenkimal kök hücre kaynağı olduğu kanıtlanmıştır. Çeşitli çalışmalar MKH'lerin farklı deneysel modellerde akut ve kronik böbrek hasarını parakrin mekanizmalarla tersine çevirme kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu parakrin eylem mRNA, mikroRNA ve proteinlerin yatay transferi ile sonuçlanan, mezenkimal kök hücrelerden salınan vesiküller sebebiyle gerçekleştiği düşünülebilir. Endozomal bölmeden eksozom olarak salgılanan veya hücre yüzeyinden oluşan mikroveziküller artık hücre içi mikro-ortamın ayrılmaz bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. Bilgi aktarımı için araç olarak hareket ederek, hücreden hücreye iletişimde önemli bir rol oynar [7].

Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller), Liliaceal ailesine ait çok yıllık bir sukulenttir. Sıcak ve kuru iklimlerde yetişen kaktüs benzeri bir bitkidir. Doğada, ultraviyole (UV) radyasyonu veya böcekler tarafından fiziksel olarak zarar görebilir. Belki de zorlu bir ortamda hayatta kalması, insanları aloe veranın yara iyileştirici ve antibiyotik etkileri olduğuna inanmaya teşvik etmektedir. Bu nedenle, aloe vera'nın immünomodulator, antiinflamatuvar, UV koruyucu, antiprotozoal ve yara ve yanık iyileştirici özelliklere sahip olduğu rapor edilmiş olması tesadüfi değildir [8]. Aloe veranın bütün jel özünün, antiinflamatuvar, antifungal, hipoglisemik ve mide koruyucu özelliklere sahip olmasının yanı sıra, özellikle yara, yanık ve donma ısırgığı iyileşmesini desteklemek için çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [9]. Yara iyileşmesinin birbiriyle örtüşen üç olaydan oluştuğu kabul edilir: [9] inflamasyon, [10] yeni doku oluşumu ve [11] matriks yeniden şekillenmesi. [10] Aloe vera jeli ile hayvan modelleri üzerinde birçok klinik deney yapılmıştır. Büyüme faktörleri, hücre göçü ile ilgili faktörler, matris oluşturan faktörler ve matris bozunma faktörleri gibi yara iyileşmesi ile ilgili protein faktörleri araştırılmıştır. Aloe vera jel özünün, fibroblast büyümesini uyardığı, yara dokusunda yara gerilme mukavemetini ve kollajen miktarını arttırdığı yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. [11-13] Başka bir çalışmada ise, aloe vera jelinin topikal uygulaması, aldehit içeriğini artırarak ve asit çözünürlüğünü azaltarak granülasyon dokusu içeriğini ve doku çapraz bağlanmasını artırmanın yanı sıra fibroblast aktivitesini ve kollajen proliferasyonunu uyardığı belirlenmiştir. [14-15] Aloe vera jeli ayrıca granülasyon dokusunda hyaluronik asit ve dermatan sülfat düzeylerini de arttırmıştır [16]. Ayrıca, aloe vera jel tedavisinden sonra kan akışında bir artış gözlemlendiği de belirtilmiştir [17]. Aloe vera jel özü ile yapılan bir hayvan çalışmasında, yanıkların daha hızlı iyileşmesinin sağladığı ve kobayın yanık dokusunun damarlanmasının yeniden oluştuğu tespit edilmiştir. [18,19].

Salisilik asit, bir monohidroksibenzoik asit, bir tür fenolik asit ve bir beta hidroksi asittir. Salisin metabolizmasından elde edilir. Aspirinin aktif bileşenine (asetilsalisilik asit) kimyasal olarak benzer ancak aynı olmayan bir bileşik olmasının yanı sıra, akne tedavisinde kullanımı ile bilinmektedir. Salisilik asidin tuzları ve esterleri salisilatlardır. Kimyasal olarak salisilik asit, bir hidroksil grubu veya fonksiyonel türevleri ile aromatik bir halkaya sahip çeşitli bitki fenolikleri grubuna aittir. Serbest salisilik asit, 157-159°C'de eriyen kristal bir tozudur. Suda orta

derecede çözünür, ancak polar organik çözücüler içinde oldukça iyi çözünmektedir. Salisilik asit, bitkilerde doğal olarak bulunan bir sinyal molekülüdür ve çeşitli patojenlerin neden olduğu enfeksiyona karşı savunma görevi görmektedir. Salisilik asit içeren bitki ham özleri, insanlar için bir çeşit tıbbi ajan olarak kullanılmıştır. Literatürde salisilik asit ve türevleri ile ilgili çeşitli patentler bulunmaktadır. Patentlerin çoğunda romatizmal ateş, grip veya diğer viral enfeksiyonlarla bağlantılı semptomlar, soğuk algınlığı, bel ve boyun ağrısı, baş ağrısı, diş ağrısı, burkulma ve incinmeler, miyozit, nevralji, sinovit, artrit, bursit, yanıklar, cerrahi sonrası yaralanmalar gibi birçok prosedürde etkili olduğunu göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda da salisilik bileşiklerin kozmetik veya dermatolojik aktif ajanların aktivitesini güçlendirmeyi de mümkün kıldığı belirtilmektedir [20].

1.2 Tezin Amacı

Dünya'nın ve Türkiye'nin en önemli halk sağlığı problemlerinden birisi olan Leishmaniasis, Leishmania türündeki zorunlu hücre içi parazitlerin neden olduğu tropikal bir hastalıktır. Dünyada 350 milyon kişi Leishmaniasis'e yakalanma riski altındadır. Hastalık Türkiye'nin de içinde olduğu 98 ülkede endemik olup, enfekte kişilerin sayısı ise 12 milyondur. Hastalığın önemli bir versiyonu olan Kütanöz Leishmaniasis deride lezyon oluşturma yeteneğine sahiptir. Leishmaniasis tedavi edilmediği durumlarda hastalarda ölümle sonuçlanabilir. Leishmaniasis'in tedavisinde kullanılan ilaçların toksisite, direnç gelişimi ve yüksek maliyet gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Aynı zamanda hastalık tedavi edilse bile, deride geniş bir skar oluşumu görülmektedir ki, bu durum hastalarda ciddi psikolojik travmalara neden olmaktadır. Günümüze kadar Leishmaniasis tedavisi sonrası oluşan skar oluşumunun iyileştirilebilmesi için çeşitli çalışmalar yürütülse de bu çalışmalardan yeterli bir başarı elde edilememiştir. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) kendi kendini yenileyebilen, birçok hücreye farklılaşma potansiyeline sahip yetişkin kök hücrelerden oluşan bir popülasyondur. Temelinde MKH yer alan terapilerin hayvan hastalık modellerinde ve insan klinik denemelerinde olumlu sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir. Osteogenezis, kemik kırıkları, travmatik beyin hasarları, inme ve miyokardial infarktüs gibi hastalıklarda olumlu terapötik etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Diğer yandan, MKH'lerin yara tedavisinde büyük potansiyele sahip olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir.

MKH'lerin kütanöz yara iyileşmesini desteklediği ve dokuyu yeniden onardığı da bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çok sayıda temel ve klinik çalışma, MKH'lerin kütanöz rejenerasyon için umut verici bir strateji olduğunu, kolayca izole edildiklerini düşük immünojeniteye sahip olduklarını ve doku rejenerasyonu için elverişli bir ortam yarattıklarını göstermiştir. Önceki çalışmalarda ayrıca, MKH'lerin hasarlı dokulara ev sahipliği yapabildiğini ve hasarlı hücreleri onarmak ve değiştirmek için farklılaşabileceğini ve böylece doku onarımını kolaylaştırdığını göstermiştir. Ek olarak, MKH'lerin enflamatuvar yanıtını modüle ederek vaskülarize bir granülasyon matrisinin oluşumunu teşvik ettiği, cilt hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü artırarak ve apoptozu inhibe ederek kütanöz rejenerasyonu hızlandırdığı bildirilmiştir.

Bununla birlikte son yıllarda MKH'lerin tedavi etkilerini artırma yolunda yapılan çalışmalar, MKH'lerden izole edilen eksozomlar üzerine yoğunlaşmıştır. Eksozomlar dolaşım sisteminde bol miktarda bulunur ve proteinler, mRNA'lar, mikroRNA'lar ve benzeri faktörleri ileterek hedef hücreleri etkileyebilir. Eksozomlar, hücre dışı bir ortama maruz kalan transmembran proteinlerin dış alanları ile bir lipid çift tabakasına yerleştirilmiş sitoplazmaya eşdeğerdir. Bununla birlikte eksozomlar, in vivo fare modelinde yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılmıştır. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen eksozomların paraziter hastalıkların tedavisinde kullanılmasına yönelik çalışmalar bulunmasına rağmen, kök hücrelerden izole edilen eksozomların paraziter hastalıklar üzerindeki etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Salisilik asit (SA), 2.000 yıldan fazla bir süredir çeşitli cilt rahatsızlıklarını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Salisilik asidin stratum corneum'u pul pul dökebilmesi, onu soyulma için iyi bir ajan yapar. Özellikle salisilik asidin komedolitik özelliği, onu akneli hastalar için yararlı bir soyma ajanı haline getirir. Bir zamanlar keratolitik bir ajan olarak kabul edildiğinde, salisilik asidin hücreler arası keratin filamentlerini kırmak veya parçalamaktan ziyade hücresel bağlantıları bozma kabiliyeti nedeniyle desmolitik bir ajan olduğu kabul edilmektedir. Derideki epidermal hücrelerin kohezyonu, desmogleinler dahil birçok protein içeren desmozomlara bağlıdır. Organik bir asit olan SA'nın, desmogleinler dahil olmak üzere desmozomal proteinleri ürettiği bulunmuştur. Bu eylemin bir sonucu olarak, epidermal

hücrelerin kohezyonu kaybolur ve bu da pul pul dökülmeye neden olur. Salisilik asit bitkilerde doğal olarak bulunan bir sinyal molekülüdür ve çeşitli patojenlerin neden olduğu enfeksiyona karşı bitki savunmasıyla ilgili eylemlerde rol oynar. SA, saligenin ve glukozit salisin gibi fenolik maddeler içeren bitki ham özleri, insanlar için bir çeşit tıbbi ajan olarak kullanılmıştır.

Aloe vera bitkisi yüzyıllardır sağlık, güzellik, tıbbi ve cilt bakımı amaçlı özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Aloe vera kelimesi Arapça kökenli olup, “Alloeh” parlayan acı madde, “Vera” ise Latin kökenli olup gerçek anlamında kullanılmıştır. 2000 yıl önce, Yunan bilim adamları Aloe vera bitkisini “universal panacea” şeklinde her derde deva ilaç olarak adlandırmıştır. Mısırlılar ise Aloe bitkisini ölümsüzlük bitkisi olarak isimlendirmişlerdir. Bugün Aloe vera bitkisi dermatolojide değişik amaçlı olarak kullanılmaktadır. Aloe veranın botanik adı Aloe barbadensis miller olup, Asphodelaceae (Liliaceae) ailesine ait, ağaçsı, uzun ömürlü, etli, bezelye yeşili renkte bir bitkidir. Genel olarak Afrika, Avrupa ve Amerika’ nın kuru bölgelerinde yetişmektedir. Yapısında yer alan her bir lif 3 tabaka içerip iç kısmında şeffaf jel tabaka %99 oranında su, kalanında ise glukomannan, aminoasit, yağ, sterol ve vitaminler içerir. Orta tabaka olan lateks acı sarı özsu, antrakınon ve glikozidleri içermektedir. Dış kalın tabaka ise 15-20 hücre içeren kabuk olarak adlandırılan kısım olup, koruyucu fonsiyondadır ve karbonhidrat ile protein sentezi görevi bulunmaktadır. Aleoveranın içinde 77 farklı bileşen bulunmaktadır (vitamin, mineral, enzim, şeker, antrakınonlar, yağ asitleri ve hormonlar). Aleo-emodin ise antrakınonlar grubunda yer alarak analjezik, antibakteriyel ve antiviral özelliklere sahiptir. Bununla birlikte iyileştirme özelliği, ultraviyole ve gama-ışınına deri maruziyeti üzerine etkileri, anti-inflamatuvar etkisi, immun sistem üzerine etkileri, antiviral ve antitümör aktivite, nemlendirici ve anti-aging etkisi, antiseptik özelliği ve antiparazitik etkileri de bulunmaktadır. Aloe vera yaprak ekstrelerinin etkinliği in vitro olarak leishmaniasiste değerlendirmiş, kutanöz, mukokutanöz ve visseral leishmaniasis etkeni promastigotları üzerinde reaktif oksijen salınımını arttırarak ve konak makrofajlarını aktive ederek leishmanisidal etki gösterebildiklerini rapor edilmiştir. Bazı çalışmalar, aloe-emodinin antibakteriyel, antifungal, antiviral, diüretik, immünosupresif, hepatoprotektif, laksatif, antiinflamatuvar ve antikanser özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Aloe-emodinin, herpes simpleks virüsü,

influenza virüsü ve insan sitomegalovirüs gibi zarflı virüslerin çoğalmasını engellediği bildirilmektedir.

Tüm bu maddelerin yara iyileşmesindeki etkinlikleri tek tek çalışılmış olmasına rağmen eksozomlarla birlikte kombine halde kullanıldığı bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmanın temel amacı; Leishmaniasis tedavisinde kullanılmak üzere WJ kaynaklı EV üretilmesi, karakterizasyonu ve yara iyileşmesinde etkinliği daha önce kanıtlanmış salisilik asit ve aleo-emodin ilaç etken maddeleri ile kombine haldeki *in vitro* antileishmanial etkinliklerinin ve yara iyileşmesi üzerine etkilerinin belirlenmesidir. Çalışmalar kapsamında öncelikle bu üç bileşenin farklı hücre hatları üzerindeki non-toksik konsantrasyonları tespit edildikten sonra antiparaziter etkinlikleri incelenmiştir ve test edilen formülasyonlar içerisinde KL tedavisinde kullanılmak üzere en uygun formülasyon belirlenmeye çalışılmıştır.

Amaca ulaşmak için aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir;

- ❖ İyi üretim uygulamaları (Good Manufacturing Practise: GMP) kurallarına uygun olarak göbek kordonu WJ bölgesinden MKH izolasyonunun yapılması, elde edilen hücrelerin karakterizasyonunun yapılması
- ❖ WJ bölgesinden izole edilen MKH'lerden eksozomların üretilmesi, saflaştırılması, karakterizasyonlarının yapılması
- ❖ Salisilik ve aleo-emodin formülasyonlarının hazırlanması
- ❖ Eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin konsantrasyonlarının farklı hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisinin belirlenmesi
- ❖ Toksik olmayan konsantrasyonlar kullanılarak ikili kombin dozların hazırlanması
- ❖ Eksozom, salisilik asit ve aleo emodin ile eksozom-salisilik asit ve eksozom-aleo emodin ikili kombinasyonların *L.major* promastigot kültüründe *in vitro* anti leishmanial etkilerinin belirlenmesi
- ❖ Eksozom, salisilik asit ve aleo emodin ile eksozom-salisilik asit ve eksozom-aleo emodin ikili kombinasyonların *L.major* amastigot-makrofaj kültüründe *in vitro* antileishmanial etkilerinin belirlenmesi

- ❖ Eksozom, eksozom-salisilik asit ve eksozom-aleo emodin kombinasyonlarının L929 fibroblast hücre hattı üzerinde *in vitro* yara iyileşmesi üzerine etkisinin belirlenmesi

1.3 Hipotez

Bu çalışmada leishmaniasis tedavisinde kullanılmak üzere mezenkimal kök hücrelerden ekstrasellüler veziküllerin izolasyonu, karakterizasyonu ve yara iyileştirilmesindeki etkinliği daha önce gösterilen salisilik asit ve aloe-emodin isimli bileşenlerle kombinasyon halinde *in vitro* antileishmanial etkinliğin ve yara iyileştirici aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

- ❖ Mezenkimal kök hücrelerin rejenerasyon etkilerine sahip olmasından dolayı yara iyileştirici özelliklerinin bulunması
- ❖ Daha önce yapılmış olan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda WJ kökenli MKH'lerden elde edilen eksozomların yara iyileştirmesi üzerine etkisinin belirlenmiş olması
- ❖ Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda aleo-emodin *L. major* parazitleri üzerinde anti-leishmanial etkiye sahip olduğunun tespit edilmesi
- ❖ Aleo-emodin anti-paraziter etkiye sahip olduğunun bilinmesi
- ❖ Salisilik asitin uzun yıllar boyunca kozmetik alanında ve yara iyileşmesi çalışmalarında aktif olarak kullanılması ve etkinliğinin tespit edilmiş olması
- ❖ Salisilik asitin ilk defa leishmaniasis tedavisinde kullanılacak olması
- ❖ WJ kökenli MKH'lerden elde edilen eksozomların leishmaniasis tedavisi üzerinde kullanılmamış olması
- ❖ Eksozom ile birlikte ikili formülasyonların kullanılmasının daha etkili sonuçlar verebileceğinin düşünülmesi

Tez çalışması kapsamında olumlu sonuçlar alınması durumunda mevcut antileishmanial ilaçların dezavantajlarını içermeyen hem antiparaziter etkinlik hem de yara iyileştirici özellik gösterebilen yeni nesil ilaç adayı formülasyonların geliştirilmesi hedeflenmiştir.

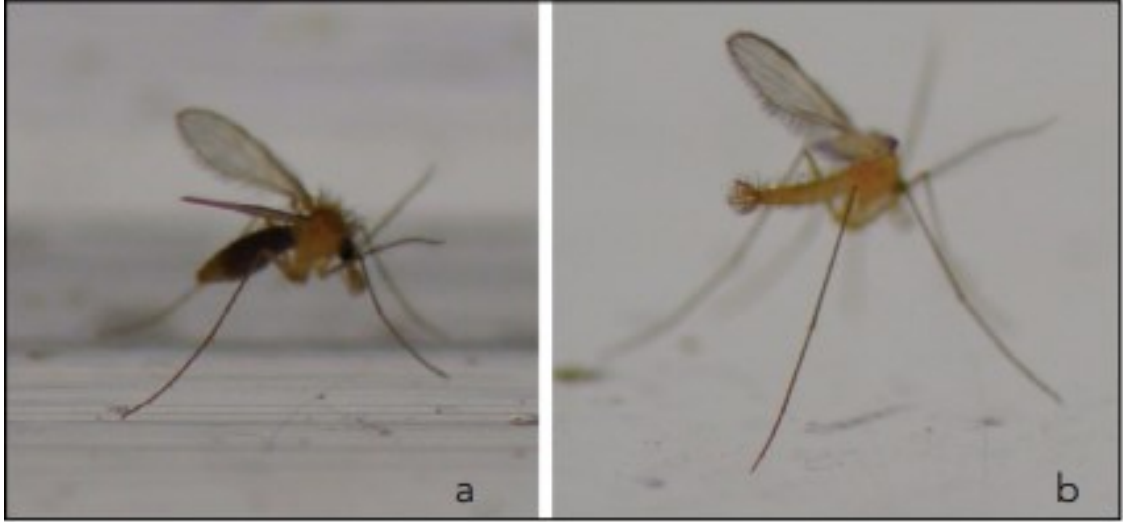
Kütanöz leishmaniasis tedavisinde kullanılmak üzere herhangi bir toksik yan etkisi olmayan, hem yara bölgesinde bulunan parazitleri öldürmeyi hem de skar oluşumu

olmadan yaraların kapanmasını hedefleyen yeni bir tedavi alternatifinin açığa çıkması sağlanacaktır.

2.1 Leishmania

Leishmaniasis, Leishmania cinsinin protozoon parazitleri ile enfeksiyonun neden olduğu bir hastalıktır. Dünya’da 350 milyondan fazla insanın risk altında olduğu 98 ülke veya bölgede endemik oldukları düşünüldüğünde hala dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Ayrıca, visceral leishmaniasis'in (VL) yılda 50.000'den fazla ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu oran parazitler hastalıkları arasında yalnızca sıtma nedeniyle aşılmıştır ve leishmaniasis küresel bir bulaşıcı hastalık analizinde dokuzuncu sıraya yerleşmiştir [21]. Elde edilmiş verilere rağmen leishmaniasis, tropikal hastalıklar arasında öncelik açısından büyük ölçüde göz ardı edilmektedir ve en çok ihmal edilen tropikal hastalıklar arasındadır [22]. Karmaşık epidemiyolojisi ve ekolojisi, vaka kontrolü için basit ve uygulaması kolay teknolojinin eksikliği, mevcut vaka verilerinin yetersizliği gibi sebeplerle bu hastalığın kritik seviyesi farkedilmemiştir [23]. Avrupa’da kene kaynaklı hastalıklar için tartışıldığı gibi, leishmaniaların değişen epidemiyolojisinde politik ve sosyoekonomik değişikliklerin küresel ısınmadan daha önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir [24]. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi tarafından hazırlanan listede en yüksek 10 vektör kaynaklı hastalık arasında leishmaniasis yer almaktadır [25].

Hastalık, tatarcık olarak da bilinen kum sinekleri tarafından insanlara bulaşır ve asemptomatik veya subklinik enfeksiyondan, deri (kutanöz) ve mukozal leishmaniasis (mukokutanöz) formlarına veya potansiyel olarak ölümcül visceral hastalığa kadar farklı klinik belirtiler göstermektedir [26-29]. Bu polimorfizm enfekte olan parazit suşunun virülansına, kum sineği tükürüğünün bağışıklık düzenleyici etkilerine ve ayrıca konağın genetik geçmişine ve bağışıklık tepkisine bağlı olduğu düşünülmüştür [30,31].



Şekil 2.1 Ergin (a) dişi ve (b) erkek kum sineği [32]

Leishmania parazitleri iki ana gruba ayrılabilir: Eski Dünya ve Yeni Dünya. Eski Dünya'nın en popüler parazitleri *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. aethiopica* ve *L. tropica*'dır. Yeni Dünya'nın en popüler parazitleri *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* ve *L. (Viannia) panamensis*'tir.

Leishmania parazitlerinin filogenisi Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Leishmania taksonomisi

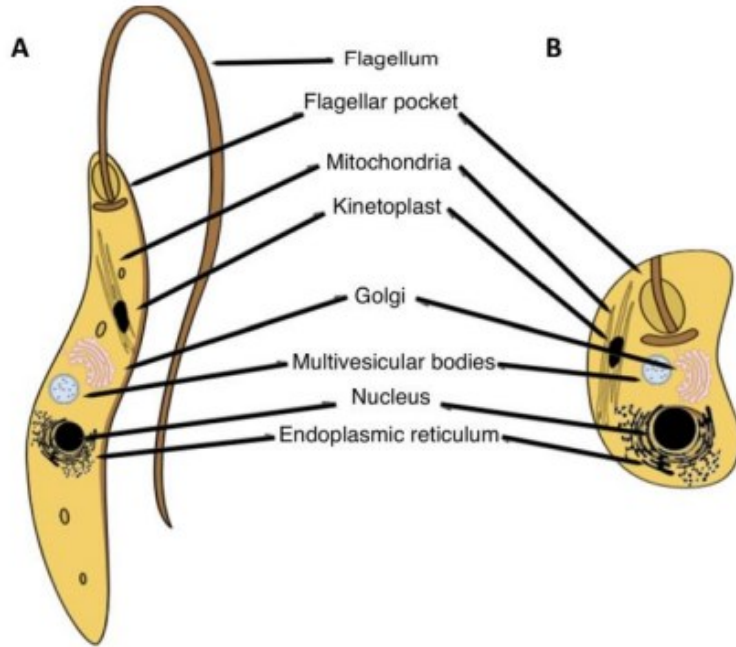
Alem	Protista
Sınıf	Kinetoplastea
Alt sınıf	Metakinetoplastina
Grup	Trypanosomatida
Familya	Trypanosomatidae
Alt Familya	Leishmaniinae
Cins	Leishmania

Bugüne kadar yaklaşık 53 *Leishmania* türü rapor edilmiştir; bunlardan 31 türün memelileri ve 20 türün insanları enfekte ettiği kabul edilmektedir. Yeni Dünya'da KL'e *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* ve *L. guyanensis* dahil

olmak üzere çeşitli türler neden olurken, Eski Dünya'da KL'e esas olarak *L. aethiopica*, *L. major* ve *L. tropica* türleri neden olmaktadır. [33].

2.1.1 Leishmania Yaşam Döngüsü

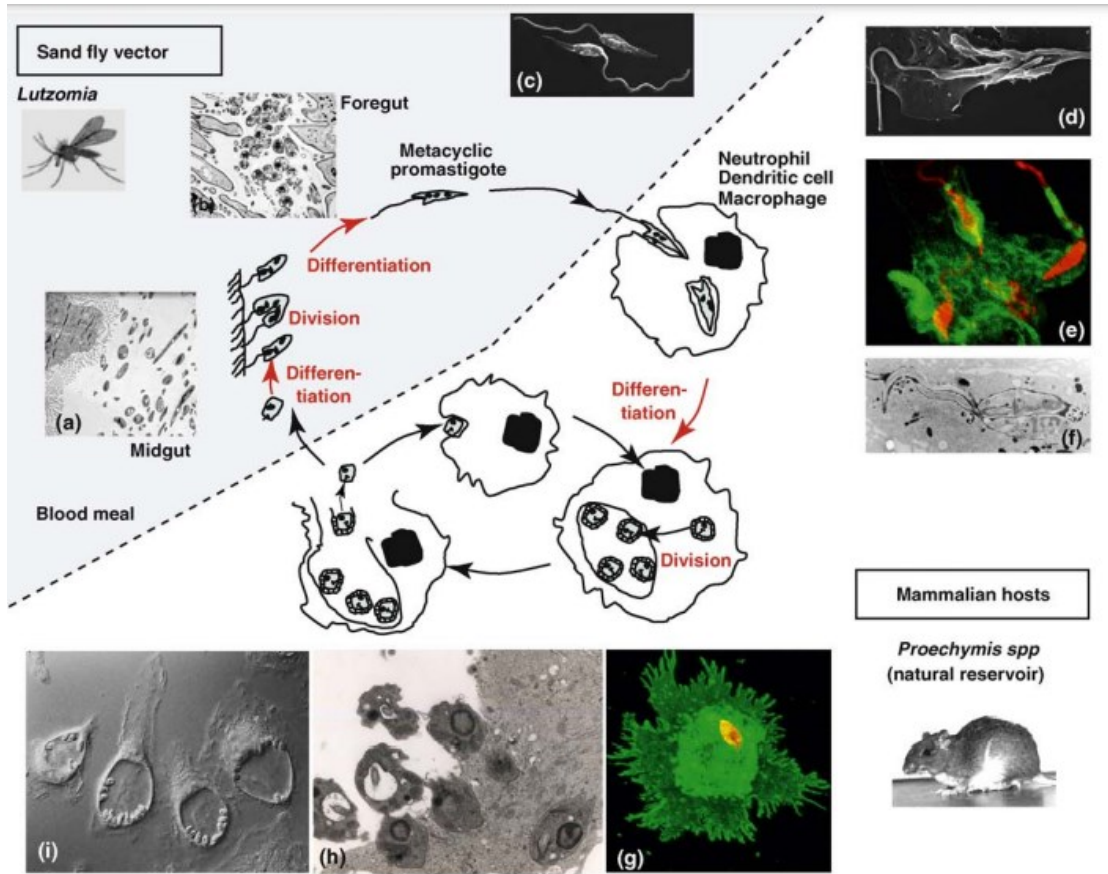
Leishmania'nın iki farklı yaşam döngüsü vardır: tatarcık böcek vektöründe bulunan promastigot formu ve memeli konakçının makrofajlarında bulunan amastigot formu. Yaşam döngüsü, amastigot ile enfekte olmuş konak makrofajlarının ısırılması sonucu dişi tatarcıklara bulaşmasını kapsamaktadır. Amastigotlar daha sonra tatar sineği bağırsağında hızla promastigotlara farklılaşırlar ve ön bağırsağa göç ederler ve ısırma sonucu memeli konakçıya iletilirler. Tatarcık sineğinin yaşam evresi kısadır, genellikle bir hafta içinde son bulmaktadır. [34]



Şekil 2.2 Leishmania parazitinin iki formunun morfolojisini gösteren diyagramı [34]

(A) Parazitin uzun promastigot formu bir çekirdek ve bir terminal kinetoplast içerir. Ayrıca parazitin itilmesi ve kum sineği bağırsağında mikrovillilere tutunma için kullanılan tek kamçıya sahiptirler. (B) Amastigotlar, herhangi bir görünür flagella olmaksızın yuvarlak küresel formdadır. Metasiklik promastigotların memeli konakçıya iletilmesi üzerine, promastigotlar doku makrofajları tarafından hızla fagosit edilir ve daha sonra fagolizozoma dönüşecek olan fagozom içinde bulunurlar. Farklılaşmayı takiben, amastigotlar asidik fagolizozom bölmesinde kalır

ve bölünmeye uğrar. Memeli konakçıdaki amastigot yaşam evresi, hastalıkla sonuçlanan birkaç ay veya yıl boyunca kalıcı olabilir. *Leishmania*'nın onlarca yıldır veya belki de memeli konakçının tüm yaşamı boyunca gizli kaldığı bile rapor edilmiştir. Böylece *Leishmania*, her ikisi de normal olarak yabancı patojenleri sindiren, parçalayan veya yok eden çok farklı iki konakçı ortamında farklılaşmak ve çoğalmak için evrimleşmiştir. *Leishmania* parazitleri hayatta kalabilmek için, tatarcık sindirim enzimlerinden kaçmak ve memeli kompleman sistemi gibi doğuştan gelen bağışıklık tepkisini ve nitrik oksit ve reaktif oksijen ara ürünlerini içeren intramakrofaj savunma mekanizmalarını barındırmak için direnç mekanizmaları geliştirmiştir [35, 36].



Şekil 2.3 *Leishmania* yaşam döngüsü:iki ve üç boyutlu örnek görüntüleme [37]

Leishmania, kum sineğinin sindirim sisteminde kamçılı promastigotlar olarak ve memeli konakçının hücrelerinde hücre içi amastigotlar olarak bulunan dimorfik parazitlerdir. Bir kum sineği parazit ile enfekte olmuş bir doku ile beslendiğinde, amastigotlar kan ile yutulur ve doğrudan orta bağırsağın karın kısmına geçer. 24 saat içinde amastigotlar promastigotlara dönüşür. Bu formlar hızla çoğalır, orta

bağırsağın ön kısmından (a) ön bağırsağa (b) göç eder ve bir sonraki ısırma ile enfekte edebilecek metasiklik promastigotlara (c) farklılaşır. Enfeksiyöz promastigotların memeli konakçının dermisine bulaşmasından sonra, parazitler, makrofajlar (d,e,f,h,i) ve dendritik hücreler (g) dahil monosit kökenli hücreler tarafından fagosite edilir. Granülositler de çok uygun hedef hücrelerdir. Fagositozdan birkaç dakika sonra promastigotlar fagozomal kompartımana (e,f) yerleşirler. Bu fagozomlar daha sonra endositik organellerle füzyon yoluyla yeniden şekillenir ve bir parazitofor vakuol (PV) (f,h,i) oluşturur. PV içinde promastigotlar, hücreleri kolonize eden hareketli olmayan amastigotlara dönüşür ve çoğalır [37]. Yaşam döngüsü, kum sinekleri cilt lezyonlarının yakınında beslendiğinde ve amastigotlar, daha sonra promastigot formlarına dönüşecekleri kum sineğinin orta bağırsağına girdiğinde tamamlanır [38, 42].

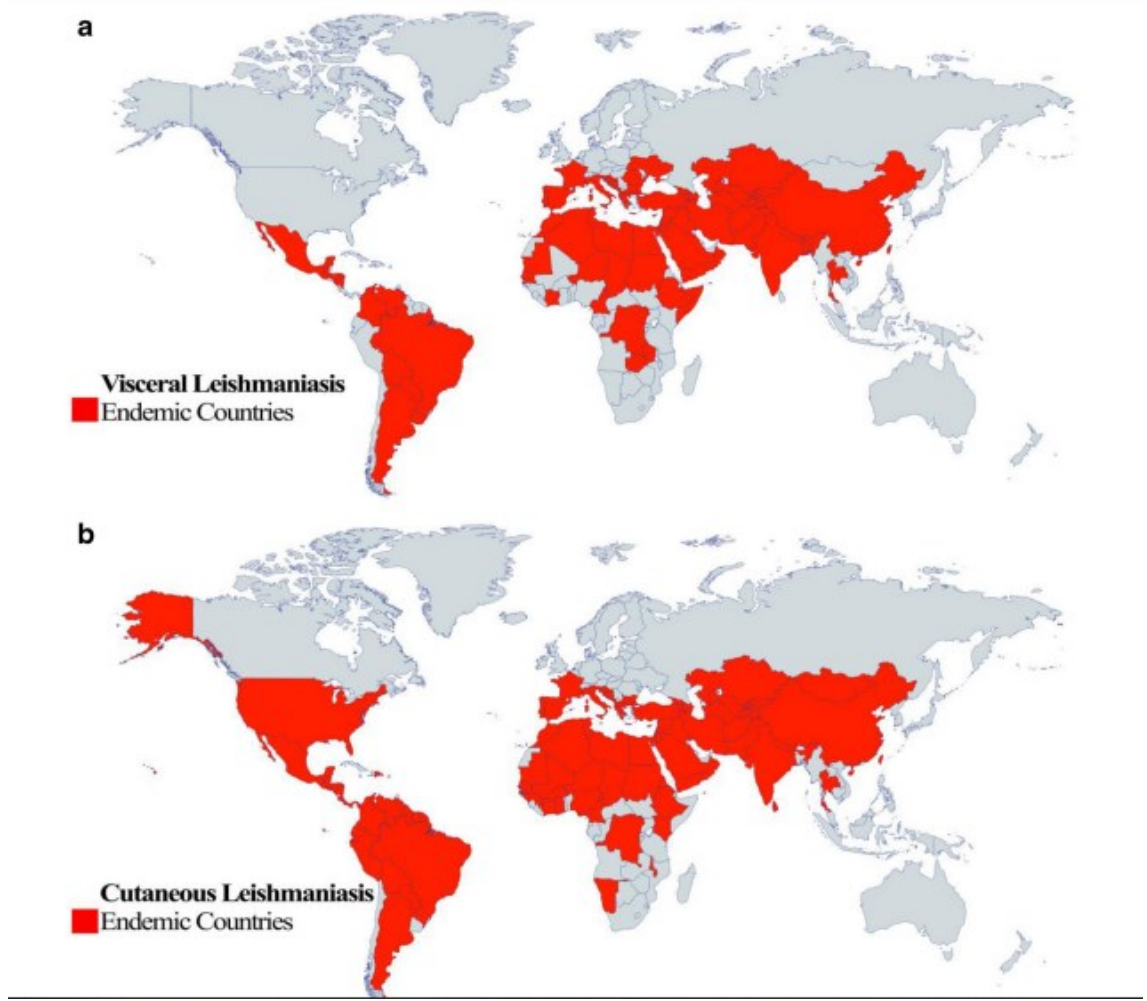
2.1.2 Leishmania Epidemiyolojisi

2.1.2.1 Dünya’da Leishmaniasis Epidemiyolojisi

Leishmaniasis, tatmin edici tedavilerin olmaması, tedavilerin yan etkileri, maliyetleri, çoğunlukla parenteral olan uygulama biçimleri, gelişmekte olan ülkelerde kullanımlarının sınırlandırılması ve ilaca dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur. Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, dünya çapında düşük gelirli insanları etkileyen, ihmal edilen bir tropikal hastalık olarak kabul edilmektedir. Dünya çapında tahminen 700.000 ila 1 milyon enfeksiyon, yılda 20.000 ila 30.000 ölüme neden olmaktadır [43].

Leishmania enfeksiyonları Avustralya ve Antarktika dışında her kıtada bulunan yaklaşık 90 ülkede insanlarda görülmektedir. Parazit, yağmur ormanlarından çöllere kadar çeşitli ekolojik koşullara uyum sağlayabilir. Hastalık, çoğu dünyanın gelişmekte olan bölgelerinde yer alan tropik ve ılıman bölgeler arasında yaygın bir dağılım göstermektedir. Zaman içinde meydana gelen değişiklikler nedeniyle vakaların tam sayısını tahmin etmek zordur; ancak, tahmini yıllık KL insidansı aralığı 600.000 ile 1 milyon arasındadır. Değişen çevresel koşullar ve göç ya da seyahat alışkanlıkları gibi insan faktörleri, bağışıklığı baskılanmış birey sayısının artması ya da insektisit kullanımının azalması, vektör ve leishmaniasis yelpazesinin genişlemesinde etkilidir. 2015 yılında, yeni KL tanılarının üçte ikisinden fazlası Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, Suriye Arap Cumhuriyeti ve İran İslam

Cumhuriyeti olmak üzere altı ülkeyle sınırlıydı. 2017 yılında DSÖ'ye bildirilen yeni vakaların %94'ünün ise yedi ülkede meydana geldiği belirtilmiştir. Bu ülkeler arasında Brezilya, Etiyopya, Hindistan, Kenya, Somali, Güney Sudan ve Sudan yer almaktadır. Lübnan, Ürdün ve Türkiye'de salgınlara yol açan Suriye Arap Cumhuriyeti'ndeki son KL salgını, İran, Irak ve Kolombiya'daki önceki salgınlar gibi çatışma ve leishmaniasis arasındaki ilişkiyi bir kez daha göstermektedir. Salgınlar, tatarcıkların yaşadığı ormanlık alanların insan tarafından istila edilmesi veya endemik bölgelerde duyarlı konakçıların maruz kalmasıyla da meydana gelebilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, güney-orta Teksas, KL için endemik bir bölgedir [44].



Şekil 2.4 (a) Viseral leishmaniasis'in dünyadaki durumu. (b) Dünyada kutanöz leishmaniasisin durumu [45]

2.1.2.2 Türkiye’de Leishmaniasis Epidemiyolojisi

Hem VL hem de KL, Türkiye'nin yanı sıra Akdeniz Havzası'nda yer alan birçok ülkede endemik olan hastalıklardır. Türkiye'de her yıl yaklaşık iki bin KL vakası resmi olarak rapor edilmektedir ve bunların %95'inden fazlası çoğunlukla Akdeniz ve Güneydoğu Bölgelerinde bulunan dokuz endemik ilde yer almaktadır. *Leishmania infantum* insan ve köpeklerde VL'nin ana etkeni iken, *L. tropica* Türkiye'nin tüm bölgelerinde KL'ye neden olan ana türdür. Bu parazitlerin yanı sıra VL hastalarında *L. tropica* ve *L. donovani*, KL hastalarında *L. infantum*, *L. major* ve *L. donovani* de bildirilmiştir [46].

Türkiye'nin özellikle güneydoğu bölgesinde Suriye Arap Cumhuriyeti, İran ve Irak gibi ülkeler ile sınırlarının bulunması sebebiyle leishmaniasis riski ile karşı karşıya kalmıştır. Suriye'de sırasıyla zoonotik KL, antroponotik KL ve VL'nin etken

parazitleri olarak *L.major*, *L.tropica* ve *L.infantum* bildirilmiştir. *L. major* ve *L. tropica*, İran ve Irak'ın birçok ilinde KL'nin başlıca nedensel ajanları olarak rapor edilmiştir [47, 48]. KL insidansının iç savaşlardan sonra Irak ve Suriye'de arttığı ve Suriyeli mültecilerin Lübnan, Irak, Ürdün ve Türkiye gibi komşu ülkelere göç etmesinin KL salgınları ve yerel alanların epidemiyolojisini değiştirdiği bildirilmiştir. İç savaşları nedeniyle yaklaşık 6,2 milyon Suriyeli ülke içinde yerinden edilmiş, 5,4 milyondan fazla Suriyeli ise hem KL hem de VL'nin endemik olduğu Türkiye, Lübnan ve Ürdün gibi komşu ülkelere göç etmiştir. Türkiye, açık kapı politikası ve sınırlarının genişliği nedeniyle 29 Mart 2018 itibarıyla toplam 3.567.130 ile en fazla Suriyeliye ev sahipliği yapan ülke olmuştur. Türkiye, 2016 yılının üçüncü çeyreğinde DSÖ tarafından yüksek oranda KL yükü olan bir ülke olarak rapor edilmiştir. KL, Türkiye'nin yanı sıra güney ve doğu komşu ülkelerinde de hala büyük bir halk sağlığı sorunudur [49]. KL'nin Türkiye'nin güneydoğu ve Akdeniz bölgelerinde endemik olduğu ve İç Anadolu ve Ege bölgelerinde de KL vakaları olduğu bildirilmiştir [50]. Türkiye Sağlık Bakanlığı tarafından rapor edilen verilere göre, 1990-2010 yılları arasında 46.003 yeni vaka rapor edildi ve bunların %96'sı Şanlıurfa, Adana, Osmaniye, Hatay, Diyarbakır, İçel ve Kahramanmaraş illerinde bildirildi. Son 20 yılda toplam KL vakalarının %45'i Şanlıurfa'da bildirilmiştir. KL Türkiye için yeni bir vaka olmasada, Suriye'den gelen mülteciler sebebiyle, Türkiye'nin zaten endemik olan güneydoğu bölgesinde KL vakalarının sayısı artmış ve endemik olmayan diğer illere de bu hastalık yayılmıştır [51].



Şekil 2.5 Tür tanımlamasına dayalı KL'nin Türkiye'deki mevcut klinik ve coğrafi durumu [50]

2.1.3 Leishmaniasis Klinik Şekilleri

Leishmania parazitlerinin 3 ana formu vardır: visceral leishmaniasis (VL- hastalığın en ciddi formu olan kala-azar olarak da bilinir), kutanöz leishmaniasis (KL-en yaygın) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL).

2.1.3.1 Kutanöz Leishmaniasis

KL, dünyanın büyük bir bölümünde, özellikle az gelişmiş ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. En az 88 ülke endemik bölgelerdir ve vakaların yaklaşık üçte biri Amerika, Akdeniz havzası ve Orta Doğu'dan Orta Asya'ya kadar Batı Asya dahil olmak üzere üç epidemiyolojik bölgenin her birinde meydana gelmektedir. Afganistan, Cezayir, Kolombiya, Brezilya, İran, Suriye, Etiyopya, Kuzey Sudan, Kosta Rika ve Peru, en yüksek insidansa sahip 10 ülkedir. Yılda yaklaşık 0,7–1,2 milyon yeni KL vakasının meydana geldiği tahmin edilmektedir. KL, Leishmania cinsinin farklı türlerinden kaynaklanır (eski dünyada *L. major*, *L. tropica* ve *L. aethiopica* ve yeni dünyada *L. amazonensis*, *L. mexicana* ve *L. braziliensis*) [52].

Coğrafi bölgeye bağlı olarak, KL genellikle Eski Dünya ve Yeni Dünya olmak üzere iki kategoriye ayrılır; bunların her ikisi de enfeksiyon bölgesinde, genellikle baş veya ekstremiteler gibi açıkta kalan bir vücut bölgesinde tipik olarak küçük bir papül olarak başlar. Bu papül, giderek ülserleşen bir nodüle dönüşmek üzere yavaş yavaş genişler. Nihai ülser, KL'nin karakteristiğidir ve spesifik türe bağlı olarak 3 ila 18

ayda kendi kendine iyileşir. KL vakalarının %10 kadarının progresyon gösterdiği, kronikleştiği ve daha şiddetli klinik özellikler gösterdiği tahmin edilmektedir. Eski Dünya KL'nin iki ana formu vardır, bunlar zoonotik (genellikle *L. major*'un neden olduğu erken ülseratif olarak da bilinir) ve antroponotik (*L. tropica*'nın neden olduğu geç ülseratif olarak da bilinir).



Şekil 2.6 KL'nin klinik sunumları [51]

Antroponotik KL, insandan insana vektör yoluyla bulaşır, daha çok kentsel alanlarda görülür ve daha kronik bir seyir ile karakterize edilir.⁵⁵ Eski Dünya KL'nin nadir, ancak önemli iki belirtisi, leishmaniasis recidivans (LR) veya kronik lupoid leishmaniasis'tir. LR, akut lezyonun iyileşmesi sırasında veya sonrasında yeni papüler lezyonların görünümünü ifade eder. Klinik olarak, genellikle KL'nin iyileşmiş lezyonlarının periferinde ince, pullu, eritematöz papüller olarak ortaya çıkar. LR lezyonları tek tek kalabilir veya birleşebilir ve yıllar boyunca yavaş yavaş büyüyebilir. KL hastalarının küçük bir bölümünde, KL'nin başlangıç lezyonları beklenen sürede düzelmez ve devam eder. Enfeksiyon 2 yıldan uzun sürerse kronik KL olarak kabul edilir. Kronik KL lezyonları birkaç yıl devam edebilir ve parazit yükü düşüktür. Genellikle ülserleşmezler ve tedaviye dirençlidirler.



Şekil 2.7 a) Kronik kutanöz leishmaniasis; 4 yıldır sağ dirsekte tümöral lezyon. b) Leishmaniasis recidivans; atrofik iyileşmiş merkez ve periferde yeni başlayan papüller. c) Tümör kutanöz leishmaniasis; ciltte dev ülser [44]

Kronik lupoid leishmaniasis, kutanöz tüberkülozun lupus vulgaris formuna klinik ve histopatolojik benzerlik gösterir ve tanısı zordur. Diffüz KL ve dissemine KL tipik olarak immünosupresyonla bağlantılıdır. Diffüz KL klinik olarak lepramatöz leprayı andırır ve yüz ve ekstremitelerde çok sayıda ülser olmayan papül ve papülonodül ile kendini gösterir. Genellikle azalmış bir hücresel bağışıklık tepkisi ile ilişkilidir. Dissemine KL, genellikle ülserasyon veya mukozal tutulumun eşlik ettiği klasik KL'ye benzer çok sayıda lezyon ile karakterizedir. Bu form Latin Amerika'da görülür ve *Leishmania antikor*larının varlığı ve azalmış interferon-gama üretimi ve tümör nekroz faktörü alfa ile ilişkilidir. Diffüz KL ve dissemine KL, farklı hücresel bağışıklık tepkilerinin nasıl farklı klinik belirtilere dönüştüğünü gösterir [44].

2.1.3.2 Visseral Leishmaniasis

Visseral leishmaniasis (VL-kala-azar olarak da bilinir), kutanöz enfeksiyonun ilk bölgesinden parazitlerin ve parazitle enfekte makrofajların metastazı nedeniyle retiküloendotelial sistem içindeki fagositlerin enfeksiyonundan kaynaklanır. Dünya çapında 600 milyondan fazla insan VL'ye yakalanma riski altındadır. Her yıl 50.000-90.000 arasında yeni vaka bildirilmektedir. 2019 yılında 5.710 ölüm kaydedilmiştir. Ayrıca HIV ile enfekte olmuş bireylerde aktif VL geliştirme riski 2.000 kat daha yüksektir. 2019'da DSÖ'ye bildirilen yeni vakaların %90'ından fazlası 10 ülkede meydana gelmiştir. Bu ülkeler arasında Brezilya, Etiyopya, Eritre, Hindistan, Irak, Kenya, Nepal, Somali, Güney Sudan ve Sudan yer almaktadır. Eski Dünya'da, VL'ye *L. donovani* (Hindistan, Pakistan, Çin ve Afrika bölgelerinde) ve *L. infantum* (Akdeniz bölgesinde) neden olur. Yeni Dünya'da, VL'ye Brezilya'da bulunan *L. infantum* (*L. infantum chagasi* olarak da bilinir) neden olur. Orta Doğu'da, klasik olarak bir KL ajanı olarak düşünülen *L. tropica*'nın visserotropik suşlarının neden olduğu visseral hastalık bildirilmiştir. VL'li hastaların karaciğer, dalak ve

kemik iliğinde bulunan makrofajlarda parazitlerin çoğalması ilerleyici hepatosplenomegali ve kemik iliği baskılanmasına yol açmaktadır. Tedavi edilmediği takdirde, hastalarda pansitopeni (Eritrosit, lökosit ve trombosit hücrelerinin sayısının azalması) ve immünosupresyon gelişmektedir. HIV ile enfekte olmuş bireylerde VL'nin şiddeti artar ve HIV hastalarında VL gelişimi AIDS'i tanımlayan bir hastalıktır. Bu muhtemelen her iki ajanın konağın bağışıklık sistemi üzerindeki düzensiz etkilerinden kaynaklanmaktadır [53].



Şekil 2.8 Visceral Leishmaniasis tanılı hasta [54]

En sık görülen sistemik bulgular anoreksi, halsizlik, öksürük, solukluk, gece terlemeleri, organomegali, lenfadenopati ve aralıklı veya sürekli olabilen ateştir. Tedavi edilmeyen VL vakalarının %95'inden fazlası, genellikle sepsis, çoklu sistem hastalığı veya şiddetli anemi nedeniyle 2 yıl içinde ölümcüldür. Kala-azar (Hint dilinde kara humma anlamına gelir) adının verilmesine yol açan iyi bilinen nadir bir bulgu olsa da, hormonal değişikliklerden kaynaklandığı düşünülen kutanöz hiperpigmentasyondur. VL'nin diğer kutanöz belirtileri, enfekte bölgelerdeki hastalığa özgü lezyonlar (papüller, nodüller veya ülserler) ve spesifik olmayan lezyonlar (purpura, saç rengi değişikliği ve kseroz) olarak ikiye ayrılabilir [44].

2.1.3.3 Mukokutanöz Leishmaniasis

Mukokutanöz leishmaniasis (MKL), lokal deri hastalığının mukokutanöz dokuya yayılması veya parazit metastazından kaynaklanabilen bir hastalıktır. Temel etken

ise *L. braziliensis*'dir. MKL, primer lezyonların çözülmesinden aylar veya yıllar sonra ortaya çıkabilir. Genellikle burun, ağız, oro- ve nazo-farinks ve göz kapaklarındaki dokuların kronik lokal tahribatından kaynaklanan ciddi oranda şekil değiştirebilen bir enfeksiyondur. Bununla birlikte solunum ve beslenme sistemini de etkileyebilir. MKL'nin temel mekanizması henüz tam anlaşılamamıştır ve muhtemelen konak ve parazit faktörlerinin karmaşık etkileşiminin bir sonucudur. MKL, genellikle ilaçlara karşı dirençlidir ve bu hastalığa yakalanan bireyler ikincil süper enfeksiyonlardan ve yetersiz beslenmeden ölürlür. MKL, Güney Amerika'daki ülkelerde bulunur; hastalığın büyük bir kısmı Brezilya, Peru ve Bolivya'da bulunur. Kolombiya, Ekvador, Paraguay ve Venezuela gibi ülkelerde daha düşük oranda bulunmaktadır. Ekvador'da vakaların çoğu Amazon ovalarında bulunurken, Pasifik kıyı bölgelerinde daha az insidans görülmektedir. [55, 57].



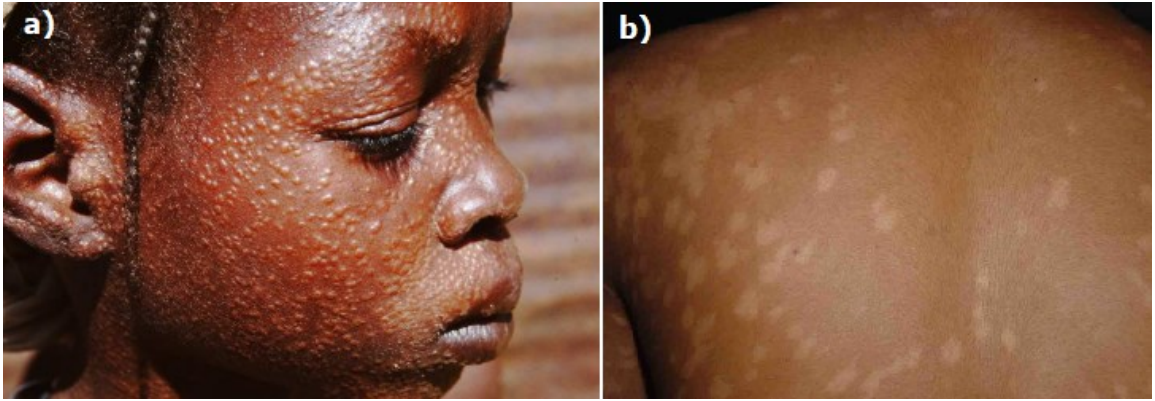
Şekil 2.9 (A) Nazal perforasyon ile komplike mukokutanöz leishmaniasis (MKL), (B) Diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL), (C) sağ yanakta dev KL plak ve (D) MKL ülseri olan Yemenli kız. Bölgesel Leishmaniasis Kontrol Merkezi klinikleri, Yemen [58]

2.1.3.4 Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis

VL hastalığına sahip bireylerin başarılı bir şekilde tedavi edilmesinden sonra, aylar ila yıllar boyunca asemptomatik kalan bir hasta alt grubunda, deri içinde yaygın maküler, makülo-papüler veya nodüler lezyonlara yol açan bir parazit proliferasyonu gelişir. Kala-azar sonrası dermal leishmaniasis (PKDL), esas olarak

Hindistan ve Sudan'da *L. donovani* ile enfekte olan hastalarda görülmektedir [59]. Sudan'da, hasta olan bireylerin %50'sinde PDKL ortaya çıkabilir. Ayrıca, VL'nin tedavi edilmesinden sonraki 2-3 yıl içinde %5-10'luk bir insidansa sahip olduğu belirtilmiştir. Bu oran, Hindistan'daki hastalara göre daha erken (6 aya kadar) bir süreci temsil etmektedir.

PKDL'nin patogenezi tam olarak anlaşılmamıştır, ancak kalıcı dermal parazitlere karşı oluşturulan agresif bir interferon-konakçı immün tepkisi ile ilişkili görünmektedir. PKDL lezyonlarının biyopsisi incelendiğinde, VL'yi oluşturan parazitlerle genotipik olarak özdeş olan amastigotların yoğun bir şekilde makrofajlarda bulunduğu tespit edilmiştir [55].



Şekil 2.10 a) Sudanlı bir hastada tipik papüler döküntü. B) Bangladeşli bir hastada maküler döküntü [60]

2.1.4 Leishmaniasis Tedavisi

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin yoksul nüfusunu etkileyen, dünyada ihmal edilen başlıca hastalıklardan biri olarak sınıflandırmıştır [61]. Küresel çapta dağılmış ve büyük sosyo-ekonomik etkiye sahip olan tropikal hastalıklar, gelişmekte olan ülkelere çoğunlukla yoksul insanları etkilemektedir. Bu nedenle, bu hastalıklar için yeni farmasötik bileşikler [62, 63] geliştirmeye yönelik ticari ilgi sınırlıdır, çünkü etkilenen yoksul nüfusun bu ilaçlara ve tedavi imkanlarına erişimini sağlamak için tedavilerinin karşılanabilir olması gerekmektedir. Son zamanlarda leishmaniasis tedavisi için birkaç alternatif ilaç ortaya çıkmıştır. Fakat bu ilaçların fizyolojik olarak toksik etkileri bulunmaktadır. KL tedavisinde kullanılan ilaçların avantaj ve dezavantajları Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Kutanöz Leishmaniasis tedavisi için kullanılan ilaçların avantaj ve dezavantajları

İLAÇLAR	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Pentavalent antimon	Kolay kullanılabilirlik ve düşük fiyat	Tedavinin uzunluğu, enjeksiyonun acı verici olması,toksisite
Amfoterisin B	Birincil direnç bilinmiyor	Intravenöz uygulamalarda yavaş enjeksiyon, ısıya karşı duyarlı, nefrotoksisite
Lipozomal amfoterisin B	Yüksek etkinlik, düşük toksisite	Isı stabilitesi (25°C'nin altında tutulmalı), pahalı, intravenöz uygulamalarda yavaş enjeksiyon
Miltefosin	Etkili ve güvenli	Yüksek fiyat, teratojenik, zayıf hasta uyumu
Paromomysin	Etkili, iyi tolere edilebilir, ucuz	Direnç oluşturabilir, etkinliği bölgeden bölgeye değişmektedir
Pentamidin	Kısa süreli etkinlik	Etkinliği <i>Leishmania</i> türlerine göre değişir

Leishmania tedavisi için üretilen ilaçların çoğu, yüksek toksisiteleri, uzun tedavi süreleri ve sıklıkla tedaviyi bırakmaya yol açan ciddi advers reaksiyonları nedeniyle ideal olarak kabul edilmemektedir. Ayrıca en sık kullanılan ilaçlar, tüm enfekte bireylerden parazitleri tamamen ortadan kaldırmamaktadır [64, 65]. Pentavalent antimonlar, hem VL hem de KL için değişken etkinliklerine rağmen leishmaniasis tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar arasındadır [66-69]. Dokularda birikmelerini nedeniyle antimonlar kusma, bulantı, iştahsızlık, miyalji, karın ağrısı, baş ağrısı, artralji ve letarji gibi ciddi yan etkilere neden olabilir ve nadiren ölümcül kardiyak aritmi gibi ciddi reaksiyona neden olabilmektedir [70-73]. Bu yan etkiler, hastaneye yatış ve hastaların yakından izlenmesini gerektirebilecek şiddetli kardiyotoksisite, pankreatit ve nefrotoksisiteden kaynaklanmaktadır Bu ilaçların toksisitesini azaltmak için yapılan çalışmalar etkili olmamıştır [74]. Yan etkiler ve uzun tedavi

periyodu, Bihar'da (Hindistan) olduğu gibi dirençli Leishmania suşlarının ortaya çıkmasına neden olarak tedavinin başarısız olmasına ve tedavinin bırakılmasına sebep olmaktadır [75]. Yüksek toksisitesine rağmen, amfoterisin B leishmaniasis tedavisi için kullanılan ilk ilaçlardan biridir [76, 77]. İntravenöz uygulaması sıklıkla miyokardit ve nefrotoksisite ile ilişkili olarak titreme ve ateşe neden olmaktadır. Amfoterisin B formülasyonları (lipid kompleksi, kolloidal form ve lipozomal form), yan etkileri azaltmak ve farmakokinetiği ve biyoyararlanımı iyileştirmek için geliştirilmiştir. Daha az toksik oldukları kanıtlandıysa da, alternatif amfoterisin B formülasyonlarının gelişmekte olan ülkelerde kullanım için sınırlamaları vardır: çok maliyetlidirler ve daha yüksek sıcaklıklarda (soğutma gerektiren) kararsızdırlar [78]. Pentamidin, şu anda leishmaniasis için kullanılan başka bir ilaçtır ve tedavi oldukça toksiktir. Diyabetes mellitus, şiddetli hipoglisemi, hipotansiyon, miyokardit ve renal toksisite gibi önemli yan etkileri vardır ve nihayetinde ölüme neden olabilir [79]. Pentamidin direnç vakalarının ortaya çıkması [80], yüksek toksisitesi ve düşük etkinliği [81] nedeniyle nadiren kullanılmaktadır. Pentamidin esas olarak kombine terapötik protokollerde kullanıldığında tavsiye edilmektedir. Paromomisin, leishmaniasis tedavisi için alternatif bir ilaçtır; bununla birlikte, parenteral formülasyonlar nefrotoksisite, ototoksisite ve daha nadiren hepatotoksisite dahil olmak üzere ciddi advers reaksiyonlara neden olabilir [82-84]. Alternatif bir antileishmanial ilaç olan Miltefosin [85,86], oral uygulama avantajına sahiptir. Bununla birlikte, bu ilacın en ciddi yan etkileri teratogenezin indüklenmesi ve tedavi başarısızlığı indeksinin ortaya çıkması olduğundan hamile kadınlar için kullanımı sınırlıdır [87]. Son 35 yılda, rifampisin, tamoksifen, doksi siklin, monomisin, trimetoprim ve nifurtimox gibi birçok bileşiğin leishmaniasise karşı düşük etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur [88-98].

Leishmaniasisin alternatif tedavisi için başka bir yaklaşım, lipozomlar ve nanopartiküller gibi kontrollü salım sistemlerinin kullanılmasıdır. Bu tip sistemler, ilaçlar bir kez adsorbe edildiğinde veya taşıyıcılarda kapsüllendiğinde daha fazla etkinlik ve güvenlik sağlayarak, geleneksel formülasyonların dozunu ve advers reaksiyonlarını azaltmaktadır [52-54]. Amfoterisin B'nin bir lipozomal formülasyonu olan Ambisome, leishmaniasis tedavisinde kullanılmış ve sodyum stiboglukonat kullanılarak elde edilenden daha iyi sonuçlar göstermiştir. KL'li hastalarda daha az yan etki ve tedavi başarısızlığı ürettiği tespit edilmiştir [99-101].

Leishmaniasis tedavisini iyileştirmeye yönelik diğer bir strateji hem parazitlerde hem de konakçı hücrelerde yeni hedeflerin tanımlanmasıdır. Moleküler ve biyokimyasal çalışmalarda ilaçlar için yeni potansiyel hedefler belirlenmiş ve bazıları doğrulanmıştır [102-104]. Konak-parazit etkileşimlerinin biyolojisini daha iyi anlamaya yönelik çalışmalar, Leishmania enfeksiyonuna karşı daha etkili ilaçların tasarlanmasını kolaylaştıracaktır [105].

2.1.5 Leishmania Konak Bağışıklık Tepkileriyle Etkileşimleri

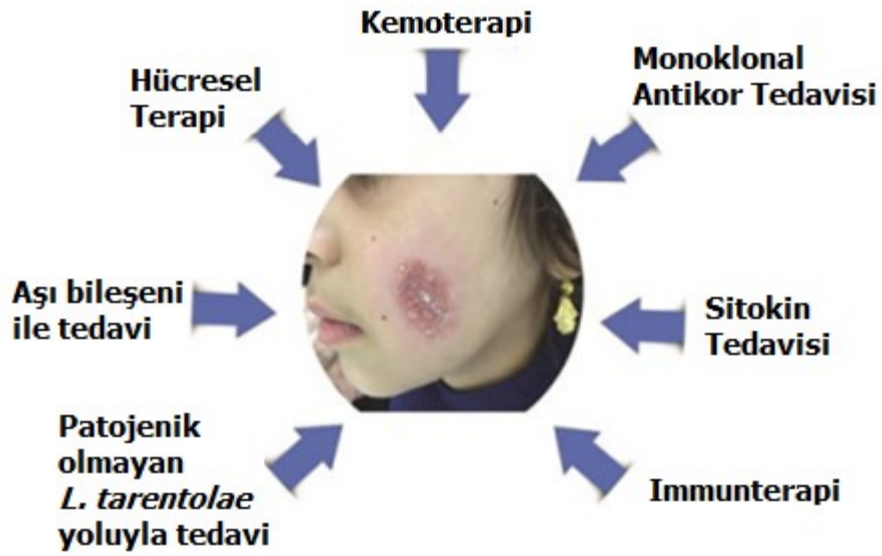
Leishmania, diğer birçok parazit gibi, konakçı bağışıklık sistemine karşı sistematik direnç oluşturmuştur. Tek hücreli organizmaların uzun süreli gelişimi, onlara hayatta kalabilmek için zorlu durumlara nasıl adapte olduklarını öğretmiştir. Makrofajlar, memeli konakçıdaki Leishmania parazitlerinin hedefidir, çünkü parazitler bağışıklık sisteminden kaçabilme yeteneklerine sahiptir.

Daha önce Leishmaniasis’de açıklanan bazı kaçış mekanizmaları aşağıda listelenmiştir:

- C5–C9 membran saldırısı kompleksi oluşumunu önleyerek kompleman sistemi olgunlaşmasını bloke etme.
- Fc ve fosfatidilserin reseptörleri gibi makrofaj giriş reseptörlerini kolaylaştırmak için lipofosfoglikan kullanma.
- Sitokin yolağını kapatmak için TLR2/TLR4 sinyal yolunu değiştirme.
- Makrofajlar içinde fagozomun lizozom füzyonunu önleme.
- V-ATPase pompasını durdurarak fagozom içindeki pH’ı kontrol etme.
- Parazite demir sağlamak için özel demir taşıyıcıları kullanmak.
- T-hücreli antiparaziter yanıtı için temel faktörler olarak B7 ve CD40 ekspresyonunun azaltılması.
- JAK/STAT yolunun inhibisyonu yoluyla makrofajlarda sitokin aktivasyon sinyalinin önlenmesi.
- Sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyon seviyelerinin değiştirilmesi.

Parazit, konakta hayatta kalmak için farklı bağışıklık mekanizmalarını kontrol edebilmenin avantajını kullanır. Bu nedenle bağışıklık sistemi faktörleri ile tedavi

enfeksiyonla mücadelede alternatif bir yaklaşımdır. Leishmania enfeksiyonunun doğası hakkında artan bilgi, daha güvenilir ve etkili tedavilerin keşfedilmesine yardımcı olur. Daha hızlı iyileşme için enfeksiyonu daha iyi tedavi etmek önemlidir. Bazı çalışmalar, tedavi protokolünde özel bir sitokin uygulamaya odaklanırken, diğerleri, istenmeyen bir yolu bloke etmeye veya enfeksiyonu hafifletmeye yardımcı olmak için belirli hücreleri kullanmaya çalışır. Bazı araştırmacılar, daha iyi sonuçlar elde etmek için kemo ve immünoterapiyi birleştirmeyi denemektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Leishmaniasise karşı farklı tedavi yaklaşımları [106]

2.2 Kök Hücreler

Kök hücre terimi, ilk olarak 1868 yılında Ernst Haeckel tarafından ortaya atılmıştır. Daha sonra Till ve McCulloch'un 1960'larda ışınlanmış fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada, kemik iliği öncül hücrelerinin enjeksiyonundan sonra makroskopik dalak kolonilerinin oluştuğunu belirlemeleri ile hematopoietik sistemde kök hücre varlığına dair kesin kanıtlar ortaya koyulmuştur. Bu çalışma ile kök hücrelerin altın standart niteliğindeki iki özelliği tespit edilmiştir: kök hücrelerin kendi kendilerini yenileme ve farklılaşma yetenekleri. Kök hücreler doku dengesinin korunmasından sorumludur [107].

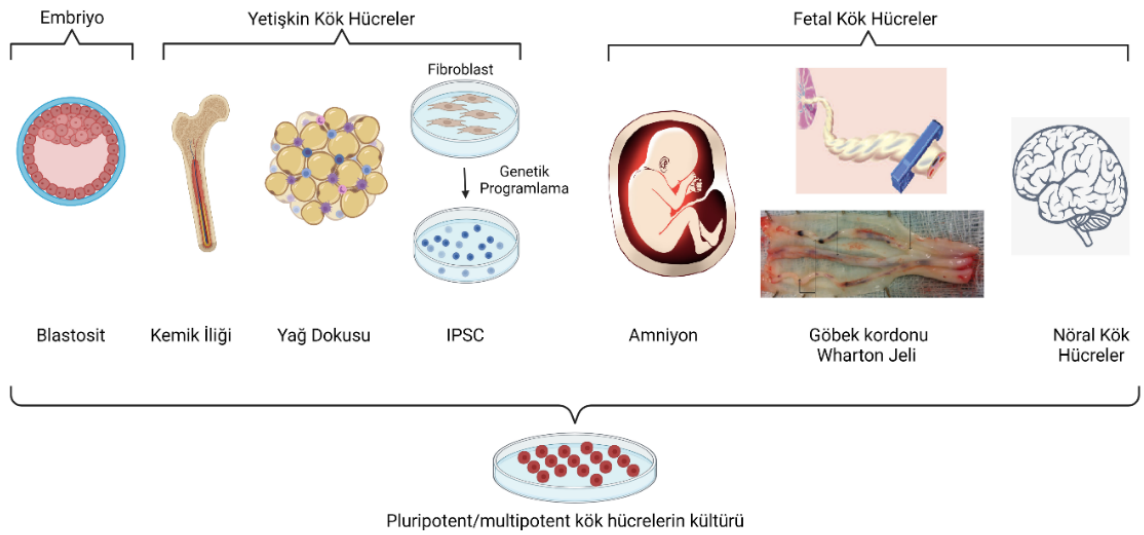
Kök hücreler, yaşamın embriyonik, fetal ve yetişkin evrelerinde bulunur. Doku ve organların yapı taşları olan farklılaşmış hücreleri oluşturan farklılaşmamış hücrelerdir. Yaşamın doğum sonrası ve erişkin evrelerinde, dokuya özgü kök hücreler farklılaşmış organlarda bulunur ve organın yaralanmasını takiben onarımda etkilidir. Kök hücrelerin başlıca özellikleri şunlardır:

- (a) Kendini yenileme (kapsamlı bir şekilde çoğalma yeteneği)
- (b) Klonalite (genellikle tek bir hücreden kaynaklanır)
- (c) Potens (farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneği)

Bu özellikler çeşitli kök hücreler arasında farklılık gösterebilir. Örneğin, blastosistten türetilen embriyonik kök hücreler, kendi kendini yenileme ve farklılaşma için daha büyük bir yeteneğe sahipken, yetişkin dokuda bulunan kök hücreler kapsamlı bir şekilde çoğalamayacakları ve yalnızca dokuya özgü hücrelere farklılaşabilecekleri için sınırlı kendi kendini yenileme özelliğine sahiptir.

İnsan vücudu, embriyonik kök hücrelerin endoderm, mezoderm ve ektoderm germ katmanlarına türetildiği zigot ve blastosistten gelişir. Germ katmanları spesifik organları oluşturur. Organ oluşumuna katkıda bulunan bazı progenitör hücreler, terminal olarak farklılaşmazlar ancak doku kök hücreleri olarak kalırlar ve kemik iliği, kemik, kan, kas, karaciğer, beyin, yağ dokusu, deri ve gastrointestinal sistemde bulunmaktadır. [108, 109] Doku kök hücreleri, doku veya organın terminal olarak farklılaşmış ve özelleşmiş hücrelerini oluşturdıklarından progenitör hücreler olarak adlandırılabilir. Bu hücreler doku içinde beklemede kalarak yaralanma ve onarım durumlarında çoğalmaktadır. [110-112] Doku kök hücrelerinin veya

progenitör hücrelerin dinamikleri dokudan dokuya değişir; kemik iliği, karaciğer, akciğer ve bağırsakta, kök hücreler normal dönüşüm veya yaralanma sırasında hücreleri desteklemek için düzenli olarak çoğalırlar. [113-116] Pankreas, kalp veya sinir sisteminde yaralanmayı takiben hasarlı hücrelerin yerini almak için çoğalırlar. [117-121] Kök hücre araştırmalarında bir takım etik sorunlar ortaya çıkmış olsa da, kök hücre izolasyonu ve gelişimindeki son gelişmeler, bilim insanlarının Parkinson, Alzheimer, kalp, kaslar, akciğer, karaciğer ve diğer organ hastalıkları gibi çeşitli hastalıklarda doku rejenerasyonu için spesifik hücre tiplerini tanımlamasına ve kültürünün yapılmasına yardımcı olmuştur. [122] Hücresel tedavide kullanılan farklı hücre kaynakları Şekil 2.12’de gösterilmiştir.



Şekil 2.12 Hücresel tedavide kullanılan farklı kök hücre kaynakları
(Biorender.com’da çizildi)

2.2.1 Farklılaşma Potansiyeline Göre Kök Hücre Sınıflandırması

Kök hücrelerin iki temel özelliğinden biri olan farklılaşma yeteneği, kökenlerine ve türevlerine bağlı olarak kök hücre grupları arasında farklılık gösterir. Tüm kök hücreler, farklılaşma potansiyellerine göre 5 gruba ayrılır: totipotent veya omnipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent.

En farklılaşmamış kök hücreler arasında totipotent veya omnipotent hücreler yer alır ve erken gelişim evrelerinde bulunurlar. Döllenmiş bir oosit ve ilk iki

bölünmenin hücreleri, hem embriyonik hem de ekstra embriyonik dokulara farklılaşarak embriyo ve plasentayı oluşturdıkları için totipotent hücrelerdir [123].

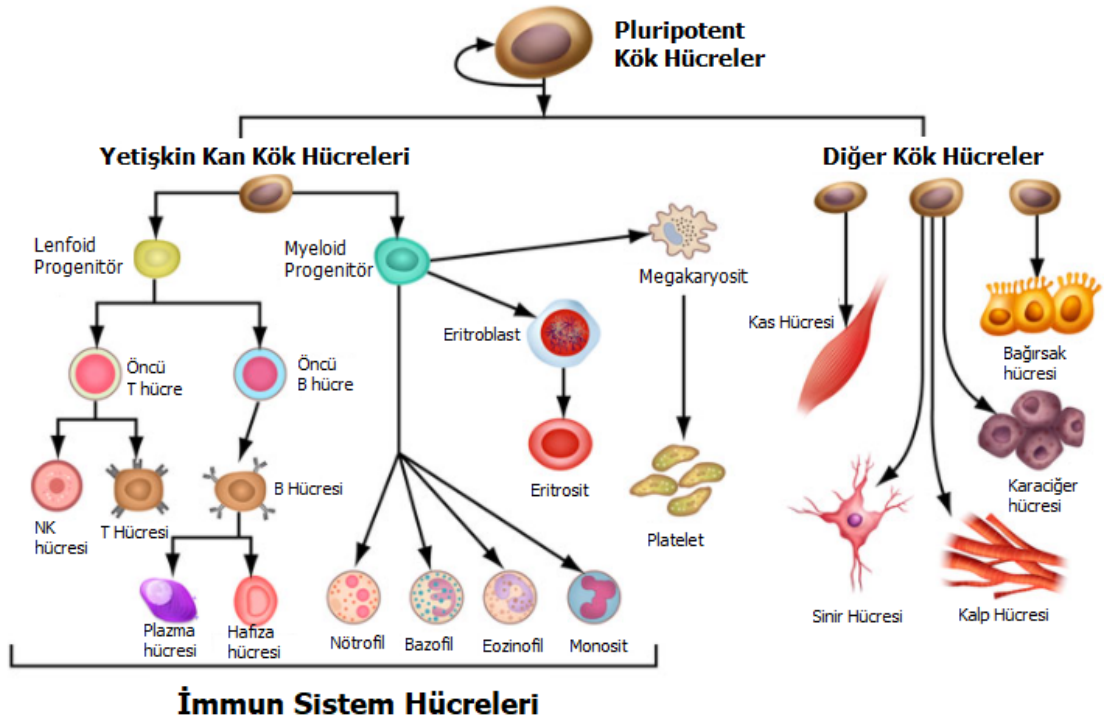
Pluripotent kök hücreler, tüm doku ve organların geliştiği 3 germ tabakasından-ektoderm, endoderm ve mezoderm- ortaya çıkan hücelere farklılaşabilir [124].

Embriyonik kök hücreler olarak adlandırılan pluripotent kök hücreler ilk olarak blastosistin iç hücre kütesinden elde edilmiştir. [125] Takahashi ve Yamanaka [126] yaptıkları bir çalışmada, somatik hücreleri yeniden programlayarak embriyonik kök hücrelerle benzer özellik taşıyan pluripotent hücreler ürettiler. Bu hücreler uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) olarak adlandırıldı.

Multipotent kök hücreler çoğu dokuda bulunur ve tek bir germ tabakasından hücelere farklılaşır. [127] Mezenkimal kök hücreler (MKH) en çok tanınan multipotent hücrelerdir. Kemik iliği, yağ dokusu, kemik, Wharton jeli (WJ), göbek kordon kanı ve periferik kan dahil olmak üzere çeşitli dokulardan elde edilebilirler. [128] MKH'ler hücre kültürü kaplarına yapışabilir ve spesifik yüzey hücre belirteçleri ile karakterize edilirler. Bu hücreler yağ dokusu, kemik, kıkırdak ve kas gibi mezoderminden türetilen dokulara farklılaşabilir [129-131]. Son zamanlarda, MKH'ler ektodermden türetilen nöronal dokuya farklılaştırıldı. Bu, transdiferansiyasyonun yani bir germ tabakasından (mezoderm) bir hücrenin nöronal dokuya (ektoderm) farklılaşmasının bir örneğidir [132].

Oligopotent kök hücreler, kendi kendini yenileyebilir ve belirli bir doku içinde 2 veya daha fazla soy oluşturabilir; örneğin, kornea dahil domuzun oküler yüzeyinin, ayrı ayrı kornea ve konjonktival hücre kolonileri oluşturan oligopotent kök hücreler içerdiği rapor edilmiştir [133]. Hem miyeloid hem de lenfoid soylara farklılaşabildikleri için hematopoietik kök hücreler, oligopotent kök hücrelerin tipik bir örneğidir [134].

Unipotent kök hücreler, kendi kendini yenileyebilir ve yalnızca belirli bir hücre tipine farklılaşabilir ve kas kök hücreleri gibi tek bir soy oluşturarak, diğer hücelere değil, olgun kas hücrelerini oluşturur [135-138]. Akciğerde, alveollerin tip II pnömositleri, tip I pnömositlere dönüşmektedir. Kök hücre yenilenmesi ve farklılaşması Şekil 2.13'de gösterilmiştir.



Şekil 2.13 Kök hücre yenilenmesi ve farklılaşması [139]

2.2.2 Kökenine Göre Kök Hücre Sınıflandırması

Kök hücreler, kökenlerine göre 4 geniş kategoriye ayrılmaktadır: Embiyonik kök hücre, fetal kök hücreler, yetişkin kök hücreler ve iPSC'ler [140,141]. Genel olarak, embriyonik kök hücreler ve iPSC'ler pluripotenttir, oysa yetişkin kök hücreler oligopotent veya unipotenttir. Embriyonik kök hücreler döllenmeden 5-6 gün sonra implantasyon öncesi embriyonun bir aşaması olan blastosistin iç hücre külesinden türetilmiştir. Bu hücreler, 3 birincil germ tabakasının dokusuna farklılaşma özelliğine sahiptir. Ancak, kültürde uzun süre farklılaşmamış bir durumda muhafaza edilebilir [142].

Blastosist, embriyoyu oluşturacak iç hücre külesi ve plasentayı oluşturacak olan trofoblast adı verilen dış hücre külesi olmak üzere 2 hücre katmanına sahiptir. İç hücre tabakasındaki hücreler, trofoblastlardan ayrılır ve embriyonik kök hücre hattını geliştirmek için özel koşullar altında bir kültür kabına aktarılır [143]. Embriyonik kök hücreler, Nanog ve Oct4 [144,145] gibi transkripsiyon faktörlerinin varlığı ile tanımlanır. Bu faktörler, kök hücreleri farklılaşmamış, kendini yenileyebilen bir durumda bekletebilir [145, 146]. Genetik anormallikleri bulunmayan farklılaşmamış embriyonik kök hücreler kültürlendiklerinde

embriyonik kök hücre hattı olarak çoğalabilir. Bu hücreler, daha sonraki kültürler ve deneyler için dondurulabilir ve çözülebilir [147].

Embriyonik kök hücrelerin farklılaşmamış olarak kalması için kültür koşulları çok önemlidir. Bunun için embriyonik fibroblast hücrelerinin besleyici tabakası veya farklılaşmayı önleyen sitokinler içeren besiyeri kullanılır. Besiyerinin ortamdan uzaklaştırılması veya besleyici tabakanın uzaklaştırılması 3 farklı germ tabakasının (endoderm, mezoderm ve ektoderm) oluşması ile sonuçlanmaktadır. [148-152] Yetişkin kök hücreler, amniyon epitel hücreleri gibi plasental dokudan elde edilen yetişkin doku kaynaklı kök hücrelerin yanı sıra MKH'leri de içeren hücrelerdir. Bu hücrelerin anti-inflamatuar etkiye sahip olduğu olduğu ve hayvan yara modellerinde iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir. Bu hücreler, *in vitro* olarak farklı germ hücre katmanlarından dokuya farklılaşmış olmalarına rağmen, sınırlı farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. [153,154] Allojenik uygulamalarda yaşanan etik problemler ve reddedilme sorunları otolog uygulamalarda yaşanmadığından yetişkin kök hücreler daha avantajlıdır [155].

Yetişkin kök hücreler, 3 germ tabakasının tüm dokularından elde edilebilir. Yapılan çalışmalarda, yetişkin kök hücre naklinin, kök hücre farklılaşması ve yeni özelleşmiş hücrelerin üretilmesi yoluyla kemik dokusu onarımı ve iskemik kalp dokusunun yeniden damarlandırılması gibi hasarlı organları *in vivo* restore ettiğini göstermiştir. [156-158] Ayrıca, kültürlenmiş yetişkin kök hücrelerin immünomodülatör ve anjiyojenik özelliklere sahip çeşitli moleküler araçlar salgılayarak onarımı desteklediği de belirtilmiştir. [159-160]

Yetişkinlerde bazı doku ve organların yaralanmasını takiben, yenileme ve onarım yeteneği dokuya özgü, terminal olarak farklılaşmış hücreler üreten dokuda yerleşik kök hücrelere kritik ölçüde bağlıdır [161]. Yapılan çalışmalar, bu hücrelerin uyarıcı faktörler ile uyarılmadıkları sürece çoğalmalarını, farklılaşmalarını veya göçlerini aktive edene kadar hareketsiz olarak beklediklerini göstermiştir [162,163]. Bu özellik, onarım sırasında dokuya özgü hücrelerin üretilmesi dışında başka işlevleri yerine getirmeyen bir hücre popülasyonunun korunması için kritik öneme sahiptir. Hücre dışı matrinden gelen çeşitli sinyallerden ve hücre sinyalleşmesine ve gen ekspresyonuna aracılık eden çözünür araçlardan oluşan niş ortamı, kök hücre çoğalmasını, göçünü, farklılaşmasını veya apoptozu düzenler. Kök hücrelerin

kendini yenileme ve çoğalma durumundan farklılaşmaya geçmesi için tetikleyicilerin neler olduğunu ve bu sinyallerin dokuya özgü olup olmadığı tam olarak açıklanamamıştır. Ayrıca, bir kök hücrenin geçirdiği hücre bölünmesi türleri, hücre türünün ürettiği hücreleri belirler. Bir kök hücre tarafından simetrik hücre bölünmesi, yaralanmanın ardından hasarlı hücreleri yeniden oluşturmak için yeni hücreler sağlayan özdeş yavru hücrelerle sonuçlanır. Kök hücre proliferasyonunda kontrolsüz bir artışın kök hücre hiperplazisine ve/veya karsinogeneze yol açabileceğini, kök hücrelerde bir azalmanın ise organ onarımını bozacağını belirtmek önemlidir; bu nedenle kök hücre homeostazında denge çok önemlidir. Asimetrik bölünme, bir kök hücre, özdeş bir yavru hücre ve ikinci bir farklılaştırılmış yavru hücre ürettiğinde meydana gelir. Bu süreç, bir kök hücre popülasyonunu korurken organların onarılmasına ve yenilenmesine izin vermektedir [164-166].

iPSC'ler, genetik olarak yeniden programlanmış yetişkin somatik hücrelerden elde edilir. [167] Fare iPSC'leri ilk kez 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka [168] tarafından fare fibroblastlarının oktaamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 3/4 (OCT3/4), SRY ile ilgili yüksek hareketlilik grup protein-2 (SOX2), onkoprotein c-MYC ve Kruppel benzeri faktör 4 (KLF4) transkripsiyon faktörlerini kodlayan 4 gen ile farklılaştırılması sonucu elde edilmiştir. 2007'de Yamanaka ve meslektaşları [169] Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc transkripsiyon faktörlerine sahip yetişkin insan dermal fibroblastlarından insan iPSC'lerinin oluşumunu bildirmiştir. Bu hücrelerin morfoloji, proliferasyon, yüzey antijenleri, gen ekspresyonu, pluripotent hücreye özgü genlerin epigenetik durumu ve telomeraz aktivitesi açısından insan embriyonik kök hücrelerine benzer olduğunu ve *in vitro* olarak 3 germ tabakasının hücre tiplerine farklılaşabildiklerini göstermişlerdir. [169] Bu hücreler hastalıkların modellenmesi, ilaç geliştirilmesi ve rejeneratif tıp için önemli araçlardır. Ancak pluripotent kök hücrelerin özelliklerini barındırsa da iPSC ve embriyonik kök hücrelerin klinik uygulamada önemli ölçüde farklılık gösterip göstermeyecekleri henüz bilinmemektedir [170].

Vücudun dengesini ve sürekli yenilenme kapasitesini anlamak için kök hücreler çok önemli bir araçtır. Patogenetik sorunların incelenmesinde önemli bir modeldir ve hastalıkların fizyolojisini anlamada yardımcı bir etmendir. Yeni farmakolojik ajanların geliştirilmesinde ve incelenmesinde imkan sunarken en büyük

potansiyelleri hasarlı dokuyu onarmak ve organları yenilemektir. Bu zamana kadar yapılan klinik öncesi ve klinik çalışmalarda çok sayıda araştırma protokolü çalışılmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda rejeneratif tıpta yeni terapotik yöntemlerin geliştirilmesi sonrasında umut verici sonuçlar yayınlanmış olsa da birtakım riskler ve engeller bulunmaktadır. Bu engellere rağmen, rejeneratif tıp konusunda devam eden araştırma ve geliştirmeler mevcuttur.

2.3 Mezenkimal Kök Hücreler

Multipotent stromal hücreler veya mezenkimal stromal hücreler olarak da adlandırılan mezenkimal kök hücreler (MKH), 1960'ların sonlarında Alexander Friedenstein tarafından keşfedilmiştir. Friedenstein ve meslektaşları yaptıkları ilk çalışmalar, mezodermden kaynaklanan MKH'lerin osteoblastlar, kondrositler ve adipositler gibi çeşitli mezenkimal doku soylarına farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. [171] MKH'ler kemik iliği, yağ, kas, kemik, dalak, karaciğer, böbrek, akciğer, timus ve pankreas gibi birçok dokudan elde edilebilir. Farklı doku kaynaklarında bulunmalarına rağmen, köken aldıkları dokuların özelliklerini yansıtsalar da benzer bir karakteristik fenotip özelliğe sahiptirler. MKH'ler en az üç hücre tipine, yani adipositler, kondrositler ve osteositlere farklılaşma kapasitesine sahip multipotent kök hücreler olarak tanımlansalar da, stromal destek hücrelerine farklılaşma potansiyeli ve stroma veya diğer hücreleri desteklemek için faktörler salgılayan progenitör stromal hücreler olarak görülmektedir. Terapötik amaçla kullanılmasının en büyük sebebi ise MKH'lerin mezodermal replasman hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip olmasıdır. Ayrıca, çok farklı dokulardan elde edilebilir olması, etik olarak kabul edilebilir yetişkin dokulardan izole edilmesi ve *ex vivo* koşullarda büyüme kolaylığına sahip olması rejeneratif tıp çalışmalarında MKH'lerin kullanılmasını teşvik eden unsurlardır [172]. Anatomik kökenlerine göre isimlendirilen ve üretilen toplam 15 çeşit MKH vardır: 1. Adipoz kaynaklı MKH'ler. 2. Amniyotik sıvı ve amniyotik zardan türetilen MKH'ler. 3. Kemik iliği MKH'leri 4. Dental pulpa MKH'leri. 5. Endometriyal MKH'ler. 6. Uzuv tomurcuklarından türetilen MKH'ler. 7. Menstrüal kan türetilen MKH'ler. 8. Kas ve periosteumdan türetilen MKH'ler. 9. Periferik kandan türetilen MKH'ler. 10. Plasenta ve fetal membrandan türetilen MKH'ler. 11. Tükürük bezi kaynaklı MKH'ler 12. Deri ve sünnet derisinden türetilen MKH'ler. 13. Sub-amniyotik insan göbek kordonu astar membranından türetilen MKH'ler. 14. Sinovyal sıvı MKH'leri. 15. Wharton jeli (WJ) kaynaklı MKH'ler. [173]

MKH'ler ilk olarak hücre izolasyonu için hala en yaygın doku kaynaklarından biri olmaya devam eden kemik iliğinden izole edildi. İnsizyonel, eksizyonel ve diyabetik kronik yaralar dahil olmak üzere çeşitli yara iyileşmesi modellerinde, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin uygulanması, hücre kontrolü veya salin uygulamasına göre yara

iyileşmesi için önemli terapötik fayda sağladığı belirtilmiştir [174]. MKH'lerin parakrin etkisi ilk olarak Haynesworth ve ark. [175]'nin 20 yıl önce yaptıkları, MKH'lerin çevresinde bulunan hücreler üzerinde önemli etkiler gösteren büyüme faktörü, kemokin ve stromal sentezlediğini gösterdikleri çalışmada açıklanmıştır. Bu çalışmayı takiben, salgılanan bu faktörlerin arteriyogenezi artırdığı [176], iskemik renal ve ekstremita doku hasarına karşı koruduğu [177], neovaskülarizasyonu desteklediği [178] ve anjiyogenezi artırdığı [179,180] hakkında çok sayıda farklı çalışma da yapılmıştır.

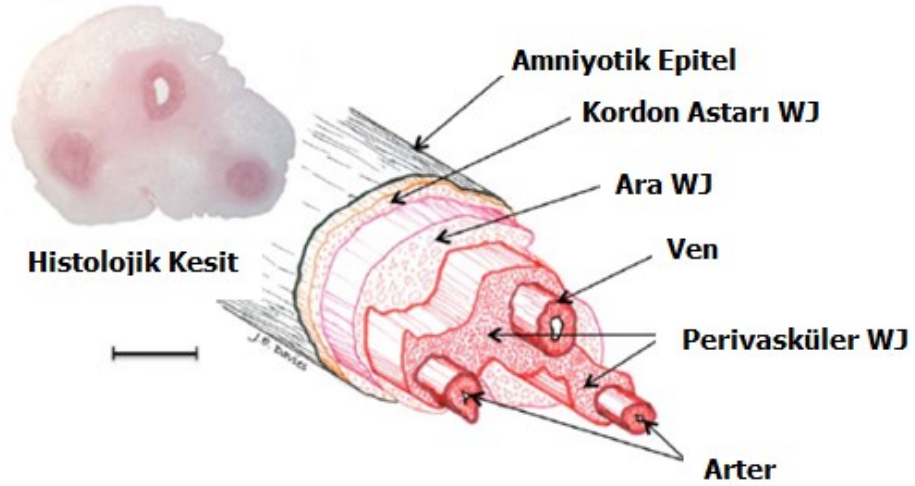
Parakrin sinyaller aracılığıyla pro-rejeneratif ve immünomodülatör özelliklerinin kullanılması ve hasarlı bölgelere yönelim sağlayabilmesi MKH'lerin iyileşmeyi artıran yetenekleri arasındadır. [181-183] En önemli özelliklerinden biri de MKH'lerin allojenik uygulanması sonucu alıcılarda immun sistemde reaksiyon oluşturmamasıdır. [184] MKH'ler 2006 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği tarafından belirlendiği gibi, CD105, CD73 ve CD90 yüzey belirteçlerinin pozitif ifadesi ve CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR'nin negatif ifadesi ile karakterize edilmektedir. [185] MKH'lerin genel karakteristik özellikleri bugün hala geniş çapta kabul görmektedir ve şunları içerir:

- ❖ Kendini yenileme yeteneği
- ❖ Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma yeteneklerine sahip çoklu potansiyel.
- ❖ CD14, CD34, CD45 ve insan lökosit antijen-DR (HLA-DR) ekspresyonundan yoksunken farklılaşma belirteçleri CD73, CD90 ve CD105 gibi karakteristik yüzey belirteçlerinin ifadesi.
- ❖ MKH'ler plastik hücre kültür kaplarına yapışabilme ve büyüme özelliklerine sahiptir ve *in vitro* koşullar altında ileri pasajlara kadar büyümektedir. [186]

2.3.1 WJ Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Göbek kordonu anne ve gelişmekte olan fetus arasında bağlantı görevi görür ve fetal beslenme kaynağı sağlayan bir yapıdır. İnsanlarda, 1-2 cm genişlikte, 40-60 cm uzunluğundadır. Bir toplardamar ve iki atardamarın sırasıyla plasenta ve fetus arasında oksijenli ve oksijensiz kanı taşıdığı bir mukoid bağ dokusunu çevreleyen tek bir amniyotik epitel tabakasından oluşur. Vasküler destek ve bazı kontraktıl işlevler olarak kabul edilen adventisyal rollerin, ilk kez Thomas Wharton tarafından

1656'da tanımlanan ve aynı zamanda fetüsün vücuttaki hareketi sırasında damarların bükülmesini de önleyen mukoid bağ dokusu tarafından yerine getirildiği düşünülmektedir [187]. Göbek kordonunun damar ve arterlerinin yalıtımını ve korunmasını sağlayan göbek kordonundaki jelatinli matris olan WJ'den MKH'lerin ilk izolasyonu 1991 yılında McElreavey ve meslektaşları tarafından yapılmıştır. [188, 189] WJ, bağ dokusu olarak sınıflandırılır. Bazıları WJ'yi sıvı veya iskelet bağ dokularının aksine basit bir bağ dokusu olarak görmektedir, ancak en yaygın olarak mukoid veya mukus bağ dokusu olarak sınıflandırılır. Bağ dokularının ortak özelliği, ayrıntılı olarak derecelendirdikleri hücre dışı matris ile çevrili hücreler içermeleridir. Hücreler ilk kez Hooke [190] tarafından 1665'te tanımlandığı için, Wharton'un kendisi "Jel" içindeki hücreler hakkında hiçbir şey bilmiyordu. WJ, bağ dokuları arasında benzersiz bir yapıya sahiptir, çünkü yalnızca dokunun fonksiyonel miyofibroblastlarını ve bunların öncüllerini oluşturan mezenkimal hücreleri içermektedir. WJ'de tanımlanan başka hiçbir hücre tipi yoktur ve kordonun kendisinin üç ana damarı dışında hiçbir damarsal veya sinirsel öge bulunmamaktadır.



Şekil 2.14 Üç boyutlu bir diyagram ile insan göbek kordonunun yapısı [187]

McElreavey ve ark. [191] insan göbek kordonundan ilk kez fibroblast benzeri hücreleri izole etmişlerdir. Ayrıca, Takechi ve ark. [192], miyo-filamentler içeren fibroblastlara benzeyen ve hem vimentin hem de desmin için pozitif boyanan hücreleri analiz etmişlerdir. WJ içerisinde hücre dağılımı perivasküler alanda en yoğun ve amniyotik epitel altında daha az olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, periferik

hücreler, perivasküler bölgelerdekilerden daha uzun ve daha çok sayıda sitoplazmik yapıya sahiptir.

WJ-MKH'lerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanımı için çekici hale getiren birçok avantajı vardır. Bu avantajlar;

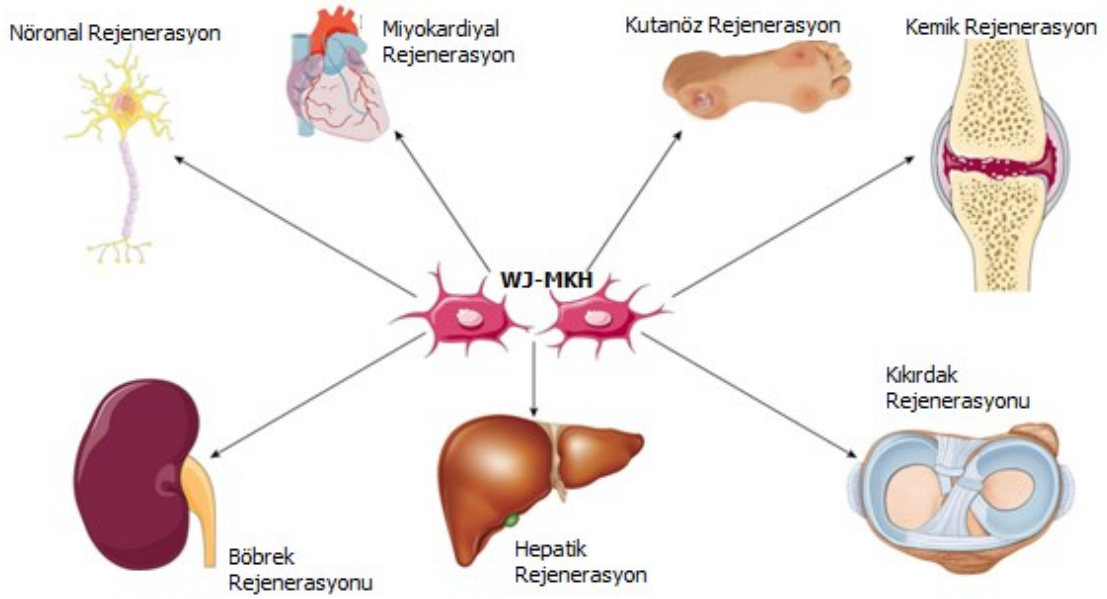
- ❖ MKH'lerin çoğuna kıyasla nispeten genç bir hücre tipidir,
- ❖ Embriyonik kök hücrelerden farklı olarak etik kaygıları yoktur,
- ❖ Kemik iliği MKH'lerin aksine ağrısız bir şekilde hasat edilebilir,
- ❖ Birkaç embriyonik kök hücre özelliği taşır,
- ❖ Yüksek hücre proliferasyonu,
- ❖ Geniş farklılaşma potansiyeline sahiptir,
- ❖ Hipoimmünojeniktir
- ❖ Tümörojenik değildir [193].

Göbek kordonunun bir santimetresi yaklaşık olarak $1-5 \times 10^4$ MKH içermektedir. [194] Son zamanlarda, kollajenaz, hiyalüronidaz veya diğer proteazlar kullanılarak yapılan enzimatik sindirime dayalı izolasyon, WJ'nin hücre dışı matrisinden MKH izolasyonu için uygulanan en yaygın tekniklerden biridir. [195] Enzimatik sindirim yöntemi ile izole edilen MKH'larda hücre sayısının *in vitro* koşullar altında iki katına çıkma sürelerinin oldukça uzun olmasına ve dolayısıyla hücre hasar oluşma riskinin artarak hücre canlılığının azalmasına sebep olmaktadır. Bu yöntem alternatif olarak, daha düşük maliyet ve daha yüksek hücre verimi gibi faydalar sağlayan eksplant kültür yöntemi tercih edilebilir. Eksplant kültür ile izole edilen WJ-MKH'lerin enzimatik yöntem ile izole edilen WJ-MKH'lere kıyasla daha fazla parakrin faktör salgıladığı belirtilmiştir. Ayrıca, WJ-MKH'ler embriyonik kök hücre karakteristik özelliklerine sahip olması dolayısıyla terapötik uygulamalarda eşsiz bir seçenektir. Embriyonik kök hücre benzeri antijen Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA-1, SSEA-4 ve Oct-4, Nanog, ve SOX-2 gibi pluripotensi genlerini ifade etmeleri WJ-MKH'lerin sahip olduğu avantajlar arasındadır [196]. Ayrıca, WJ-MKH'ler, immün baskılayıcı durumları nedeniyle allojenik terapötik tedaviler için oldukça uygundur. Major histo-uyumluluk kompleksi (MHC) Sınıf I için minimal bir ifade sunarlar. Aynı zamanda, CD40, CD80 ve CD86 kostimülatör moleküllerinin ekspresyonundan yoksundurlar ve prostaglandin E2, indoleamin-2,3-dioksijenaz ve HLA-G gibi yüksek düzeyde bağışıklık inhibitörlerine sahiptirler. [197]

2.3.2 WJ-Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları

Kök hücre biyolojisi ve doku rejenerasyonundaki etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, bu hücreleri rejeneratif tıp alanında kullanılmaya teşvik etmektedir. MKH'ler, hastalıkların tedavisinde hücre bazlı bir terapi olarak araştırılmakta olan en yaygın kullanılan hücre tiplerinden biridir. www.clinicaltrials.gov adresinde MKH ile yapılan 600'den fazla klinik araştırma listelenmiştir. Yaygın kullanımları, çok çeşitli deneysel hayvan hastalık modellerinde gösterdikleri etkilerinden ve allojenik uygulamalardaki güvenlik profillerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, belirli bir hastalık için hastalara uygulanan MKH'lerin kesin etki mekanizması, yoğun bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Yapılan araştırmalar doğrultusunda MKH'lerin eş zamanlı olarak rol oynadığı birkaç farklı faktör tespit edilmiştir. Bunlar arasında;

- ❖ Sitokinleri salarak inflamasyonu sınırlamak,
- ❖ Büyüme faktörlerini ifade ederek iyileşmeye yardımcı olmak,
- ❖ İmmünomodülatör proteinler salgılayarak konakçı immün yanıtlarını değiştirmek,
- ❖ Endojen onarım hücrelerinden gelen yanıtın artırılmasını sağlamak
- ❖ Kemik gibi bazı dokularda olgun fonksiyonel hücreler olarak hizmet etmek yer almaktadır. [198]



Şekil 2.15 WJ kökenli mezenkimal kök hücrelerin yenileyici özellikleri [199]

Karaciğer hastalıklarının tedavisinde göbek kordonundan izole edilen MKH'lerin *in vitro* ve *in vivo* etkinlikleri gösterilmiştir. WJ-MKH'ler hepatosit benzeri hücreler de dahil olmak üzere endodermal kökende farklılaşma potansiyeline sahiptir. Karaciğer gelişimini kanıtlayan hepatik belirteçlerin üretilmesine bağlı olarak bu hücrelerin karaciğer hastalığının tedavisinde önemli bir hücre kaynağını temsil ettiği bilinmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda, karaciğeri kısmi olarak alınan farelere farklılaşmamış göbek kordonu kaynaklı MKH'lerin transplantasyonundan 2,4 ve 6 hafta sonra albümin ve AFP gibi insan hepatik belirteçlerinin eksprese edildiği gösterilmiştir. Bir diğer çalışma, bu hücrelerin yaralı karaciğer fonksiyonlarını düzeltmede ve *in vivo* fibrozisi azaltmada destekleyici bir rolü olduğunu tespit etmiştir. [200]

Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçlar, WJ-MKH'lerin en umut verici özelliklerinden birinin kardiyovasküler doku mühendisliği olduğunu ve doku mühendisliğinde büyük potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. [201] Otolog olmayan valfler veya kanallar kullanılarak yapılan cerrahi tedavinin, implantın büyümesinde tıkaçıcı doku ve kalsifikasyon dahil olmak üzere belirgin dezavantajları vardır. [202,203] Kardiyovasküler fetal doku mühendisliği, kalp kası rejenerasyonu potansiyeli olan otolog, canlı dokunun *in vitro* üretimine odaklanmaktadır. Gelişmiş özellikleri hakkındaki bilgilere ve başarılı klinik öncesi ve klinik uygulamalara ilişkin ilk raporlara rağmen, WJ-MKH'lerin klinik

sınırlamalarını belirlemek ve gerçekçi klinik protokoller oluşturmak için daha fazla çalışma yapmak gerekmektedir. İskele tabanlı doku mühendisliğinde halihazırda uygulanabilen protokoller, çoğunlukla doğal, sentetik veya hibrit polimerler gibi yabancı malzemelere dayanmaktadır. Bu protokoller, büyüme ve yeniden şekillenme eksikliği ile sonuçlanmaktadır. Bu süreç tromboembolik komplikasyonlar ve enfeksiyonlar için risk taşımaktadır. Bu sistemlerle ilgili olası problemler, sistemik toksisite, büyüme sınırlaması, farklılaşma ve fonksiyon kısıtlamaları, birleşme engelleri gibi zorluklardır. Bu nedenle, rejeneratif ve immünomodülatör potansiyelini azaltmayan uyumlu biyomalzemelerin geliştirilmesi gerekmektedir. [201] Kök hücrelerin konakçı dokuda uzun süre hayatta kalması ve tedavi rejiminin oluşturulması, WJ-MKH'lerin geniş klinik uygulamalarını hala engelleyen kritik konular olduğundan, izolasyon, karakterizasyon, uzun süreli ekim için ilgili klinik kriterlerin oluşturulması ve insan MKH'lerinin bakımı, WJ-MKH'lerin rejeneratif tıpta başarılı kullanımı için gereklidir [204].

Kıkırdak dokusu diğer dokulara kıyasla *in vivo* koşullar altında daha zayıf rejenerasyon ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahip bir bağ dokusudur. Otoimmün süreçler ve travmatik yaralanmalar, kıkırdak hasarı ve dejenerasyonunun temel sebepleri arasındadır. Bu sebeple kondrosit benzeri farklılaşma geçirmiş kök hücrelerin doku mühendisliğinde çalışılması umut vericidir. Bu amaçla yapılmış WJ-MKH'lerin kullanıldığı kıkırdak onarımı ve rejenerasyonu ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bildirilmiştir. [205] WJ-MKH'lerin sahip olduğu kondrojenik potansiyelin analizi ile, bu hücrelerin multipotansiyel kapasiteye sahip oldukları ve kondrojenik kapasiteleri ile eklem hastalıklarının tedavisinde kullanılabilecekleri gösterilmiştir [206].

Periferik sinir sistemi yaralanmalarının ardından meydana gelen nöral bozuklukların tedavisi için farklı birçok terapötik yaklaşım mevcuttur. Doku mühendisliğinde yapılan son çalışmalar, aksonal bölgelerde yeniden büyümenin teşvik edilmesi için biyoyapay sinir kanalları geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır. [207,208] Sinir kanalı boşluğunu kapatmak için sinir uçları arasına yerleştirilir ve aksonların distal sinir segmentine yeniden büyümesine izin verilir. Fakat, sinir boşluğunun yapısı uzun olduğundan yapay sinir kanallarının kullanımı kısıtlı

olabilmektedir. Miyelin kılıfı oluşturan periferik glianın en önemli bileşenlerinden biri olan Schwann hücreleri, sinir liflerinin onarımı için uygun bir mikro ortam görevi görmektedir [209]. Bu hücrelerin diğer periferik sinirlerden izolasyonunun yapılması ve büyütülmesi sınırlı olduğundan, birçok araştırmacı çeşitli doku tiplerinden MKH'lere odaklanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, göbek kordonundan izole edilmiş MKH'lerin nöral dejenerasyonu destekleyen ve miyelin kılıfı inşa edebilen Schwann hücrelerine farklılaştığını göstermiştir. [210,211] WJ-MKH'den farklılaşan Schwann hücrelerinin NGF ve BDNF gibi nörotrofik faktörler ürettiği tespit edilmiştir. [212,213] Bu bulgular, göbek kordonu-Schwann hücrelerinin doğal Schwann hücrelerine uygun bir alternatif olduğunu ve sinir yaralanmaları için hücre bazlı tedaviye uygulanabileceğini göstermiştir.

2.4 Ekstrasellüler Vesiküller

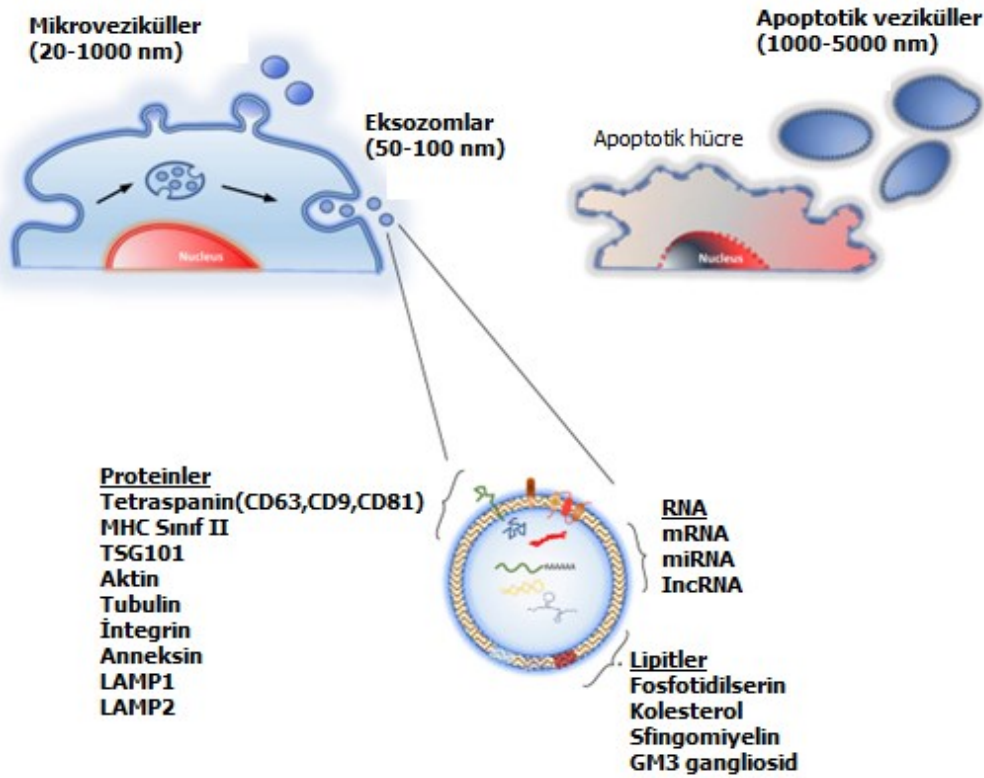
Hücreler arasındaki iletişimi düzenleyen mekanizmaların işlevlerini yerine getirmek için çevreleriyle bilgi alışverişinde bulunmaları gerekmektedir. Ekstrasellüler veziküllerin (EV) bu özellikleri biyomedikal alanında yapılan bilimsel çalışmalarda kullanılmasını teşvik etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda hücre-hücre etkileşimleri ya da hücrelerden salınan moleküllerin yakında ve uzakta bulunan hücreleri nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Daha önce hücrelerin atıklarını ortadan kaldırdığı bir salgılama mekanizması olarak kabul edilen [214], artık çok önemli bir hücre-hücre iletişim mekanizması olarak kabul edilmekte ve Uluslararası Ekstrasellüler Veziküller Derneği (İSEV) adlı bilimsel topluluğunun da açılmasıyla birçok disiplinden araştırmacının ilgisini çekmektedir. EV'ler genellikle hücre dışı boşluğa salınan lipoproteik vezikülleri, yani eksozom, ektozom, apoptotik ve nekrotik cisimleri ifade etmektedir. [215] Büyüklükleri, bileşimleri ve kökenleri farklılık göstermektedir ve genelde köken aldığı hücrenin durumuna bağlı olarak heterojen bir popülasyonu temsil etmektedir. EV alt gruplarının belli spesifik özellikleri yapılan çalışmalarda araştırılmış olsa da, spesifik belirteçler hala çalışılmaktadır. [216]

EV'ler hedef hücrelerle etkileşime girerek fenotipik değişikliklere sebep olmaktadır. Hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde hücreler arası iletişimin önde gelen faktörleri olarak görev almaktadır. [217,218] Ligand-reseptör reaksiyonlarını kullanarak hedef hücre üzerinde hücre içi yolları etkileyebilir. Proteaz tarafından kesilen EV membran proteinlerinin fragmanları hücre yüzeyi reseptörleri için ligand görevi görmektedir. [219-221]

2.4.1 Ekstrasellüler vezikül türleri

EV'ler ilk olarak 50 yıl önce hücre zarları aracılığıyla hücreden salınan atık bir molekül olarak keşfedilmiştir. Eksozomların ilk keşfi 37 yıl önce gerçekleştirilmiş [222] ve 1987 yılında Johnstone ve arkadaşlarının [223] yaptıkları çalışma ile ilk eksozom tanımı ortaya çıkmıştır. EV'ler, üç ana lipid vezikül sınıfına ayrılır: ektozomlar, apoptotik cisimler ve eksozomlar. Sıfılandırma genel olarak veziküllerin biyogeneze ve boyutlarındaki farklılıklara dayanmaktadır. Ektozomlar (veya mikroveziküller), hücre dışı boşluğa dökülen plazma zarının

çıkıntılarında oluşmaktadır ve çapları 50 ila 500 nm arasında değişir. Apoptotik cisimler apoptozun bir ürünüdür ve ölmekte olan hücreden gelen biyomateryali içermektedir. Boyutları 50 ila 5000 nm arasında değişir. EV'lerin son ve potansiyel olarak en heyecan verici kategorisi eksozomlardır. Bunlar, 50 ila 150 nm arasında değişen bir çapa sahip en küçük EV'lerdir ve multivezikül cisimcikler (MVB'ler) adı verilen daha büyük hücre içi veziküllerden doğarlar. MVB'ler, endozomal membranın iç tomurcuklanmasıyla oluşan intraluminal veziküllerdir. MVB'ler, plazma zarı ile kaynaştıkları hücrenin kenarına doğru göç ederler.



Şekil 2.16 Ekstrasellüler vesikül türleri

Eksozomlar, çoğu ökaryotik hücrenin endozomal bölmesinden salınan hücre dışı moleküllerdir. Hem prokaryotlar hem de ökaryotlar dahil olmak üzere hücrelerden salınan, replikasyon kapasitesi olmayan lipid bilayer sferoid yapılar olarak tanımlanan bir tür hücre dışı vezikül tipidir. Basit tek hücreli organizmalardan karmaşık çok hücreli organizmalara kadar her canlı tarafından üretilir. Bu yapılar, hücreler arası iletişim mekanizmalarında yer alırlar ve evrim ile korunmaktadır. İşlevleri sadece aynı organizmanın hücreleri arasında değil, aynı veya farklı türden farklı organizmalardan, hatta prokaryotları ve ökaryotları içeren hücreler arasında da gözlemlenmiştir [224]. Örnek olarak, kalın bağırsak epitel hücreleri ve

mikrobiyota arasında iletişimi sağladıkları ve bağırsak dengesinin korunmasına katkıda bulundukları gösterilmiştir [225].

Eksozomlar, hücre otokrin ve parakrin bilgilerinin önemli taşıyıcılarıdır. Eksozomlar hedef hücrelerle kaynaşarak içlerinde taşıdıkları proteinler, lipidler veya RNA gibi kapsüllenmiş maddeleri hücreler arası bilgi alışverişine aracılık etmek ve hedef hücrelerin fizyolojik ve patolojik işlevlerini düzenlemek için hedef hücrelere taşımaktadır. [226]

Eksozomlar, 30-150 nm çapındadır ve boyutları virüslerle benzer bir boyut dağılımını paylaşmaktadır. Kan, idrar, tükürük, amniyotik sıvı, eklem sıvısı ve plevral sıvı gibi belirli biyolojik sıvılardan salgılanmaktadır. Ayrıca dendritik hücreler, lenfositler, fibroblastlar, tümör hücre hatları, kök hücreler ve nöron hücreleri dahil çoğu hücre tarafından üretilmektedir. Yapılan çalışmalar ile, eksozomların immünolojide, tümör biyolojisinde ve nörobiyolojide biyobelirteçler, terapötik araçlar ve biyolojik taşıyıcılar olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. Eksozomlar doku rejenerasyonunda da hücresiz tedavi olarak klinik potansiyel sergilemektedir [227].

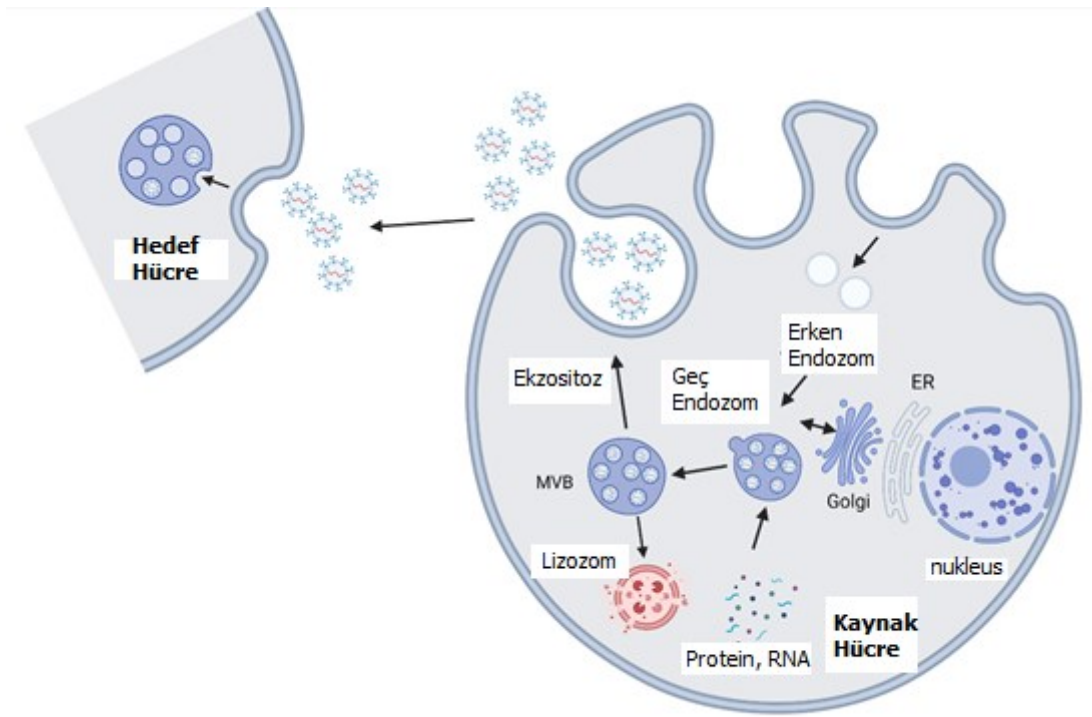
Eksozomlar ekzositoz yoluyla hücre dışı boşluğa salınır. Bu süreç, tümör proteini p53 tarafından ve hücre iskeleti aktivasyon yolunun kontrolü altında düzenlenir. Eksozomlar, büyük miktarlarda anneksinler, CD63, CD81 ve CD9 gibi tetraspaninler ve Hsp60, Hsp70 ve Hsp90 dahil olmak üzere ısı şok proteinleri içerir. Ayrıca programlanmış hücre ölümü 6 etkileşimli protein (Alix/PDCD6IP), tümör duyarlılık geni 101 (Tsg101) ve klatrin de ifade ederler. Eksozomlar, içeriklerini koruyan ve dokularda uzun mesafeler boyunca hareket etmelerini sağlayan sert bir çift katmanlı zar içinde kapsüllenir. İki katmanlı zar, az miktarda fosfatidilserin içerirken, büyük miktarlarda kolesterol, seramid ve sfingolipid içerir. [228]

2.4.2 Eksozomların Biyogenezi

Eksozomların biyogenezi, multiveziküler endozomların ekzositozundan kaynaklanır. Eksozom biyogenezi üç aşamaya ayrılmaktadır:

- ❖ Plazma zarının istila edilmesiyle endositik veziküllerin oluşumu
- ❖ Endozomal membranların içe doğru tomurcuklanmasıyla MVB oluşumu
- ❖ MVB'nin plazma zarı ile füzyonu ve eksozomların salınması.

Çoğu durumda, MVB'nin içeriği hidrolazlar tarafından bozunmaktadır. Ancak, bazı MVB plazma zarı ile birleşebilir ve bu mekanizma ile içeriklerini hücre dışı ortama salabilirler. [225] Eksozom salımının, hücrel miRNA salımını düzenleyen spesifik sinyal yolları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edildiği gösterilmiştir. Eksozomların, hücreler arasında RNA alışverişi yapabildikleri ve bu hücrelerin iletişim kurma karmaşıklığını büyük ölçüde artırdıkları bilinmektedir. Klinik bir ortamda eksozomların potansiyel kullanımı, anti-inflamatuvar, anti-fibrotik, anti-immünojenik proliferatif veya anjiyogenik etkileri uyarmak için antijen sunan veziküller olarak fonksiyon görmelerinden kaynaklanır. [228]



Şekil 2.17 Eksozom Biyogenezi (Biorender.com’da çizildi)

EV kargoları, vezikül tiplerine, bunların türetildiği hücrelere ve fizyolojik koşullara bağlıdır. EV'nin ana bileşenleri proteinler, lipidler ve nükleik asitlerdir. EV, kökenlendiği hücreden bağımsız olarak spesifik hücrel protein grupları içerebilir. EV içerisinde bulunan proteinler, endozomun kendisinden, plazma zarından kökenlenen ve sitozolde bulunan proteinlerdir. Çekirdek, mitokondri, endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksinden gelen proteinler genellikle EV içinde yer almaz. Bu farklılık, bu tür veziküller üretilirken proteinlerin spesifik bir diferansiyel seçiminin olduğunu göstermektedir. [229] EV içeriğindeki lipidler de proteinler gibi

türetildikleri hücrenin tipine göre değişmektedir. Lipid çift tabakaları esas olarak plazma zarından gelen bileşenleri içerir, ancak fosfatidilserin, doymamış fosfatidiletanolamin, doymamış fosfatidilkolin, sfingomiyelin, GM3 gangliozit ve kolesterol gibi moleküller bazı veziküllerde daha bol bulunmaktadır. [230] EV içeriğinde nükleik asitlerin yer aldığının keşfinden sonra yapılan birçok çalışmada, EV içeriklerinde haberci RNA (mRNA), miRNA ve kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA) gibi farklı RNA türlerinin de bulunduğu kanıtlamıştır. [231] Protein ve lipid moleküllerinin EV moleküllerinde farklı olmasına benzer olarak, hücreler ve onlardan üretilen EV arasındaki nükleik asitlerin karşılaştırmalı analizleri, farklı içerikler gösterebilmektedir.

Sitokinler, büyüme ve transkripsiyon faktörleri, çözünür reseptörler, DNA, mikroRNA'lar, mRNA'lar, ncRNA'lar ve dairesel RNA'lar (circRNA'lar) gibi moleküllerde EV'lerin taşıdıkları moleküller arasındadır. EV'lerin taşıdıkları moleküllerin özelliklerini ve içeriklerini değiştiren durumlar arasında;

- ❖ Proteomik ve transkriptom analizleri sonucunda kültür ortamı koşulları
- ❖ Donörün yaşı
- ❖ Hücrelerin pasaj sayısı
- ❖ Veziküllerin izolasyon yöntemi
- ❖ Radyasyona maruz kalma gibi etkenler yer almaktadır.

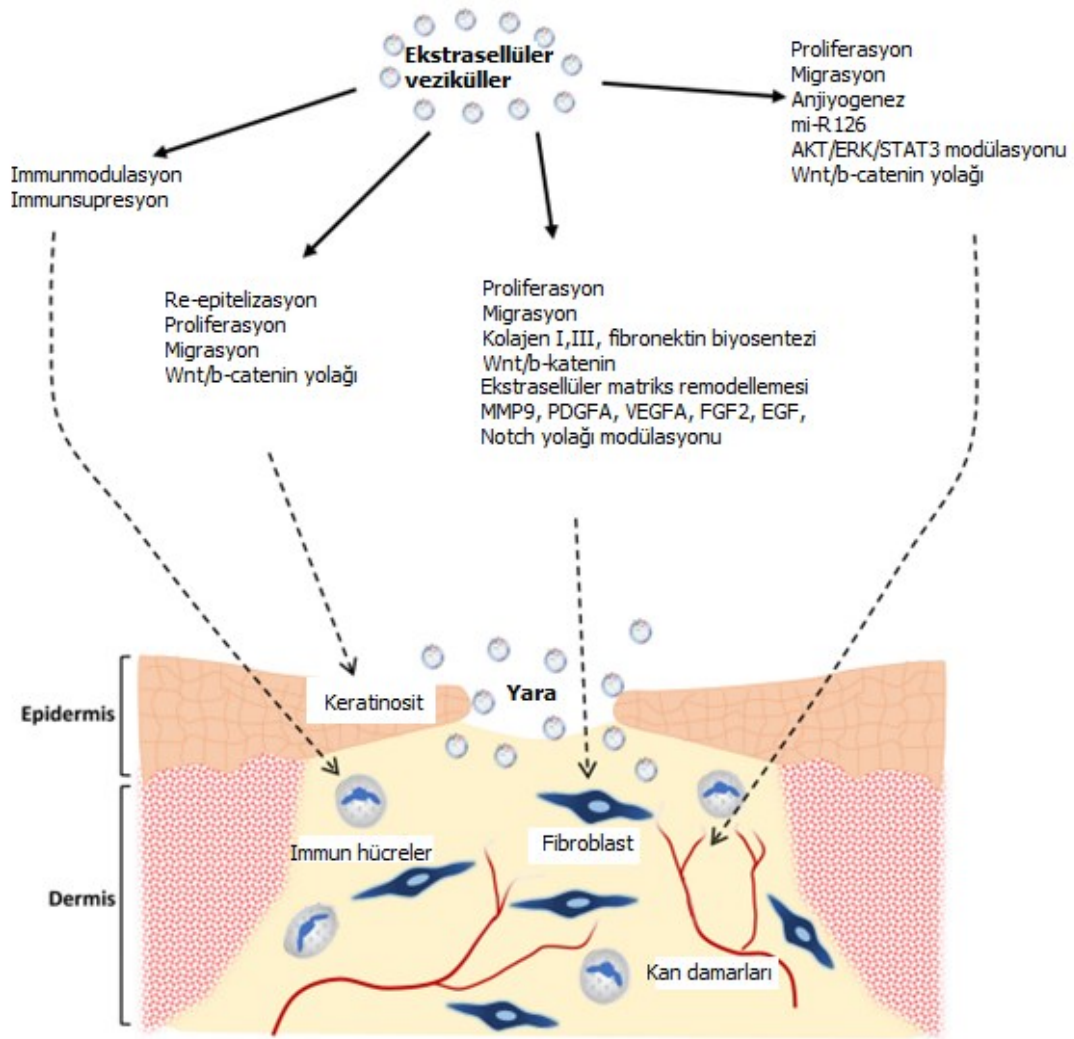
Yaşlanan hücrelerin genç hücrelerden daha fazla EV saldıgı gösterildiğinden, kültürdeki pasajların sayısı da önemli bir rol oynamaktadır. EV üretimine etki eden değişkenlere, EV kargosunun belli bir özelliğini açığa çıkarmak için müdahale edilebilir. Örneğin, hipoksiye maruz kalan hücreler, normal koşullarda büyütülen hücrelerden daha yüksek anjiyogenik kapasiteye sahip EV'ler üretmektedir. Birçok molekül, protein ve nükleik asit, anjiyogenez, hücre göçü ve inflamatuvar yanıtın proliferasyonu veya düzenlenmesi gibi rejenerasyonu destekleyen süreçlere katılabilmektedir. [228]

2.4.3 Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlar

MKH'ler en çok tercih edilen terapötik eksozom kaynaklarıdır. MKH ile son on yılda yapılan klinik çalışmalar bu hücrelerin rejeneratif çalışmalarda güvenilir olduğunu kanıtlamıştır. [232] MKH'lardan elde edilen eksozomların avantajı, filtrasyon

yoluyla sterilize edilebilmeleri ve kullanıma hazır bir ürün olarak üretilibilmeleridir. MKH uygulamalarından farklı olarak eksozom uygulamalarının tümörjenik potansiyele sahip olmaması hücre bazlı tedavilerde yaşanan güvenlik sorunlarını ortadan kaldırmaktadır. [233,234] MKH-eksozomları nörolojik, kardiyovasküler, bağışıklık, böbrek, kas-iskelet sistemi, karaciğer, solunum, göz ve cilt hastalıklarının yanı sıra kanserler dahil olmak üzere çeşitli hastalık modellerinde yeni hücresiz terapötik stratejiler için MKH'lere alternatif olarak uygulanmıştır. [235,236] MKH-eksozomları ile ilgili yapılan klinik öncesi çalışmalarda, MKH'ler çeşitli doku ve hücrelerden şu sırayla izole edilmiştir: kemik iliği (%51), göbek/plasental dokular (%23), yağ dokusu (%13), embriyonik kök hücreler veya indüklenmiş pluripotent kök hücreler (%8) ve diğerleri (%5). [237]

MKH-eksozomlarının terapötik özellikleri, temel olarak immünomodülatör ve immünsupresif özelliklerinden kaynaklanmaktadır. İnterlökin 1 beta (IL-1 β) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin düzeylerini düşürerek transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF β) düzeylerini artırabilmektedir. Yoğun ve kronik inflamasyon süreçlerinin iyileşmesini sınırlayabileceği ve tehlikeye atabileceği gibi bazı patolojik durumların tedavisi için kullanılabilmektedir. EV'lerin yaşlanma karşıtı özellikleri, hem uyarılmış pluripotent kök hücrelerden (iPSC) hem de genç MKH'den salgılanan EV'ler ile yapılan çalışmada reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre içi seviyelerini ve yaşlanan MKH kültürlerinde hücresel yaşlanmayı azaltması ile kanıtlanmıştır. EV'lerin sahip olduğu anti-fibrotik özellikleri eksozomların karaciğer, kalp, akciğer ve deri gibi organlardaki fibrozisin tedavisinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. [225]



Şekil 2.18 Ekstrasellüler veziküllerin yaralı doku üzerindeki etkileri [225]

Tedavide eksozomların kullanılmasının bazı avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar arasında:

- ❖ Büyük miktarda hücre üretimi gerektirmeden izole edilebilir.
- ❖ Uygun sıcaklık koşullarında ihtiyaç duyulana kadar saklanabilir.
- ❖ *In vivo* bozulmaya karşı korunabilir ve içerikleri kapsüllenebilir (hızla bozulan sitokinler, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri ve RNA gibi küçük çözünür moleküllerle bağlantılı bazı problemlerin önlenmesi)
- ❖ Yapısı kararludur ve uzun ömürlüdür.
- ❖ Damardan enjekte edilebilir, vezikül boyutları MKH'lerden küçük olduğundan ince kılcal damarlarda daha rahat dolaşabilir ve uzak yerlere ulaşabilir.

- ❖ Kan-beyin bariyerini geçebilir.
- ❖ Hipoimmunojenik özelliğe sahip olduğundan bağışıklık reddi çok düşüktür.
- ❖ Hücresel ürünlerin uygulanması sonucu oluşabilecek hücre farklılaşması ya da tümör oluşumu gibi istenmeyen yan etkilerin oluşma riski düşüktür.

2.4.4 Eksozomların karakterizasyon analizleri

EV içerikleri protein, lipid ve RNA moleküllerinden oluşmaktadır. EV niceliklerinin belirlenmesi için bu moleküllerin ölçülebilmesi yeterlidir. Ancak bu yöntemler, EV parçacıklarının sayısı hakkında kesin bilgi vermemektedir. Nanoparçacık izleme analizi (NTA), dinamik ışık saçılması (DLS) dahil olmak üzere parçacıkların sayısını ve boyutunu ölçmek için çeşitli yöntemler mevcuttur. En yaygın kullanılan yöntem NTA'dır. [238-244] NTA, sulu bir çözeltideki parçacıkların hareketini izleyerek parçacıkların sayısını ve boyutunu belirler. [245] Son zamanlarda, floresan olarak etiketlenmiş EV'leri spesifik antikorlarla saptamak için floresan NTA çalışmaları yapılmıştır [246]. Tetraspaninler (CD9, CD63 ve CD81), Annexins, Flotillin, ALG-2-etkileşimli protein X (Alix) ve tümör duyarlılık geni 101 (TSG101) proteini dahil olmak üzere çeşitli proteinlerin eksozomlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. CD9, CD63, CD81, TSG101 ve Alix gibi proteinler, köken hücrelere kıyasla eksozomlarda oldukça zengin oldukları bilindiğinden eksozomlar için spesifik belirteçler olarak önerilir. [247-249] Ek olarak, Alix ve TSG101, MVB'lerin oluşumunda yer aldığından, bu proteinlerin varlığı, eksozomların endositik kökenini desteklemek için gerekmektedir. Kalite kontrol analizleri için, eksozomlarda bu proteinlerin saptanması en azından yarı nicel yöntemler için önerilmektedir. ELISA ve flow sitometrik analizin her biri hem GMP (Good Manufacturing Practise; İyi Üretim Uygulamaları) uyumlu tesisler hem de genel akademik laboratuvarlar için uygundur. Western blot, akademik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu yöntem, uygun nicelleme ve yöntem doğrulama eksikliği nedeniyle sınırlı bir yöntemdir. [250] EV'lerin saflığı da kalite kontrol için kritiktir. EV'lerin saflığını analiz etmek için en basit yöntem; partikül-protein, protein-lipid veya RNA-partikül oranlarını belirlemektir. Potansiyel tehlikeli maddelerin uzaklaştırılması için antibiyotikler ve serum dahil olmak üzere hücre kültürü sürecinden gelen safsızlıklar da analiz edilmelidir. Her EV grubu, tekrarlanabilirliği sağlamak için akademik laboratuvarlarda bile terapötik amaçlar veya fonksiyonel testler için

kullanılmadan önce rutin kalite kontrol testleri ile kalifiye edilmelidir. Bununla birlikte, EV'lerin nicelleştirilmesi son derece zorlayıcı olmaya devam etmektedir. Nano flow sitometrisi, doğrudan stokastik optik rekonstrüksiyon mikroskobu, optik disk teknolojilerine sahip ExoCounter ve görüntüleme flow sitometrisi gibi yeni teknolojiler ve araçlar tanıtılmaktadır. Tamamen GMP uyumlu cihaz ve teknolojilerin geliştirilmesi biraz zaman alacak olsa da, EV'lerin nicelleştirilmesi için metodolojilerde atılan büyük adımların yakın gelecekte mevcut engellerin aşılmasıyla sonuçlanması beklenmektedir.

2.4.5 Eksozomların fonksiyonları

Son yıllarda artan çalışmalar, EV'lerin yalnızca doku onarımı ve bağışıklık düzenleme gibi normal fizyolojik süreçlerin dışında hayati çeşitli hastalıkların oluşumunun altında yatan patolojileri belirleme gibi önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. [251] EV, çeşitli biyolojik mekanizmalar aracılığıyla fizyolojik olayları ve hücresel davranışı düzenlemektedir. Protein veya lipid ligandlar aracılığıyla membran reseptörlerini aktive etmek ve içeriklerini reseptör hücrelere dökmektir. Bu şekilde transkripsiyon faktörlerini, onkogenleri, miRNA, mRNA ve hatta bulaşıcı partikülleri transfer edebilmektedir. [252] Bu nedenle, temel hücresel ve biyolojik işlevleri kontrol etmek için çok işlevli sinyal kompleksleri anlamına gelen sinyalozomlar olarak da kabul edilmektedir. [253] EV'yi içeren biyolojik süreçler, anjiyogenez, antijen sunumu, apoptoz, pıhtılaşma, hücresel homeostaz, iltihaplanma, hücresel farklılaşma ve hücreler arası sinyalleşmeyi içermektedir. Progenitör hücrelerden gelen eksozomların, endotel hücrelerinde migrasyon, proliferasyon ve kan damarlarının oluşumunu uyardığı bulunmuştur. [254]

Eksozom serbest bırakılması, kargolarına ve reseptör hücre tiplerine bağlı olarak apoptozu inhibe edebilir veya aktive edebilir. [255] EV'nin antijen sunan yardımcı T lenfositler olarak işlevselliği geçen yüzyılın sonundan beri bilinmektedir. Bu nedenle, B lenfositlerinin, MHC sınıf II'de zenginleştirilmiş ve T lenfositlerini aktive etme kapasitesine sahip veziküller salgıladığı bildirilmiştir. EV, proinflamatuvar (kanser hücreleri, sinovyal fibroblastlar, CD-4 +T hücreleri, makrofajlar veya dendritik hücreler tarafından üretildiklerinde) veya antiinflamatuvar (MKH, dendritik hücreler veya T hücreleri) olarak çalışabilmektedir. Sonuç olarak, EV bağırsak hastalığı, sepsis, artritis, diyabet, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıklar

gibi immünolojik hastalıkların oluşumunda veya önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. EV'nin fizyolojik rolleri, kargolarına ve proteinleri, nükleik asitleri ve diğer molekülleri reseptör hücrelere aktarma kapasitelerine bağlıdır. Kan-beyin bariyerini geçme kapasitesi olan hastalara damardan verilebilmektedir. Bu nedenle, son zamanlarda çeşitli patolojilerin prognozu, teşhisi ve tedavisi için önemli potansiyele sahip ilgili terapötik araçlar olarak kabul edilmiştir. [256]

Bu fonksiyonları yerine getirebilmeleri, aşağıdakiler de dahil olmak üzere çeşitli nedenlerden kaynaklanmaktadır:

- ❖ K kenlendikleri hücrelerin fizyolojik durumunu yansıtan farklı biyomoleküller taşıyabilmeleri
- ❖ Kanseri gibi hastalıkların patolojilerinde kararlı biyobelirteçler olarak kullanılabilmesi
- ❖ Vücut sıvıları boyunca hareket edebilmeleri
- ❖ Beyin omurilik, idrar, tükürük ve kan gibi bu tür vücut sıvılarından invaziv olmayan tekniklerle tanımlanmaları ve nicelleştirilmesinin kolay olması
- ❖ Kanseri gibi hastalıkların tedavisi için miRNA, shRNA, siRNA ve ayrıca farmakolojik açıdan ilgi çekici diğer bileşikler dahil olmak üzere ilaçları taşımak ve serbest bırakmak için terapötik araçlar olarak kullanılabilmesi
- ❖ Rejeneratif ve/veya antiinflamatuvar kapasiteye sahip farklı hücrelerden izole edilebilmeleri sebebiyle hasarlı dokuları onarmak için uygulanma potansiyeli olması

MKH-eksozomlarının M1'den M2'ye makrofaj polarizasyonunu desteklediğine dair çalışmalar yapılmıştır. M1 makrofajlar, IL-1 , IL-12 ve TNF-  gibi geniş bir proinflamatuvar sitokin ve kemokin spektrumunun ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. Buna karşılık, M2 makrofaj fenotipi, Th2 sitokinler tarafından indüklenir ve IL-10 ve TGF-  gibi anti-inflamatuvar faktörlerin ve IL-1RA, CD163 ve C-C motif kemokin gibi M2 belirteçlerinin salgılanmasına yol açmaktadır. Çeşitli inflamatuvar hastalık modellerinde MKH-eksozomları tarafından immünomodülasyon da bildirilmiştir. Örnekler aşağıdaki gibidir:

- ❖ Melatoninle  n koşullandırılmış sıçan kemik iliği MKH eksozomlarının oksidatif stres ve apoptozu azaltarak, antioksidan ve anti-apoptotik proteinleri artırarak

ve anjiyogenezi güçlendirerek sıçan renal IR yaralanma modelinde böbrek hasarını azalttığı bildirilmiştir. [257]

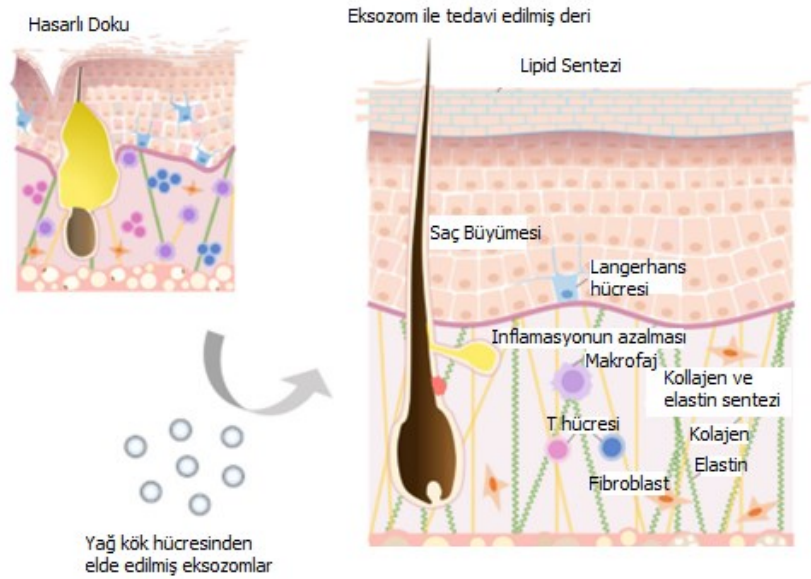
- ❖ İnsan göbek kordonundan izole edilmiş MKH'lerden elde edilen eksozomların, sıçanlarda otofajiye bağlı bir şekilde sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarını (AKI) azalttığı da bildirilmiştir. [258]
- ❖ İnsan göbek kordonundan izole edilmiş MKH'lerden elde edilen eksozomların, sıçanlarda deneysel otoimmüniteyi azalttığı tespit edilmiştir. [259]
- ❖ İnsan plasenta kaynaklı MKH'lerden elde edilen eksozomların Duchenne musküler distrofi (DMD) modeli oluşturulmuş fareye verilmesi doku fibrozisini ve iltihabı azaltmıştır. [260]
- ❖ İnsan göbek kordonundan izole edilmiş MKH'lerden elde edilen eksozomların makrofaj M2 polarizasyonu yoluyla pulmoner inflamasyonu ve alveolar-kılcal sızıntıyı azaltarak akciğer, kalp ve beyin patolojisini iyileştirdiği belirtilmiştir. [261]
- ❖ Kuduz viral glikoprotein (RVG) peptidi tarafından fare kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerden izole edilen eksozomların hedeflenen teslimi, plak birikimini, astrositlerin aktivasyonunu ve proinflamatuvar ekspresyonu azaltarak ve TNF- α , IL- β ve IL-6, IL-10, IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin seviyelerini arttırarak transgenik APP/PS1 farelerinin bilişsel işlevini geliştirdiği tespit edilmiştir. [262]
- ❖ İnsan kemik iliğinden elde edilmiş MKH'lerden izole edilen eksozomların, post-iskemik immünosupresyonu ve lenfopeniyi azaltarak ve ayrıca nörojenez ve anjiyogenezi uyarak farelerde nörolojik bozukluğu iyileştirdiği belirtilmiştir. [263]
- ❖ Fare kemik iliğinden elde edilen MKH'lerden elde edilen eksozomların, TLR4/NF- κ B sinyal yolunu hedefleyen miRNA'ların teslimi yoluyla makrofaj polarizasyonunda yer alan çoklu faktörleri düzenleyerek fare diyabetik periferik nöropati modelinde termal ve mekanik uyarıların eşikliğini düşürdüğü tespit edilmiştir. [264]

EV'ler veya eksozomlar, köken hücrelerine bağlı olarak yaşlanma hücrelerini hafifletmede ve hatta gençleştirmede önemli bir role sahiptir. Çalışmalar, EV'lerin veya eksozomların yaşa bağlı hastalık belirteçleri olarak hareket ettiğini göstermektedir. [265-267]

EV'lerde veya eksozomlarda yaşa bağlı değişikliklerin aşağıdakilerle sonuçlandığı bildirilmiştir:

- 1) Fibroblast, epitel hücreleri ve kanser hücrelerinin yaşlanması sırasında salınan EV'lerin veya eksozomların sayısında bir artış [268,269]
- 2) İnsanlarda olduğu kadar farelerde ve sıçanlarda da yaşın ilerlemesi ile birlikte en az 30'lu yaşlardan 60'lı yaşlara kadar dolaşımdaki EV seviyelerinde azalma [270-272]
- 3) Yaşlanma ile ilişkili EV veya eksozom bileşiminde değişiklikler (miRNA'lar, proteinler veya lipidler) [273]

65 yaşın üzerindeki yaşlı bireylerin sayısındaki küresel artış, yaşlı ciltler için onarım veya gençleştirici ürünlere yönelik taleplerin artmasına sebep olmaktadır. Çoğunlukla MKH kültüründen elde edilen kök hücre besiyeri yaşlanmayı önleyici, kırışık önleyici, cilt ve saç bakımı için bir cilt bakım ürünü olarak kullanılmaktadır. [274]



Şekil 2.19 Yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerden izole edilen eksozomların deri üzerindeki etkisi [274]

Farklı kök hücre kaynaklarından elde edilen eksozomların yara iyileşmesi üzerindeki etkinliği de farklıdır. Cilt ve yara bakım ürünleri için farklı hücrelerden gelen eksozomların güvenliği ve etkinliği analiz edilerek ve yağ dokusu kaynaklı

MKH'lerden elde edilen eksozomların kemik iliği MKH'lerden elde edilen eksozomlara göre birçok açıdan daha güvenli ve etkili olduğu bulunmuştur;

1) Yağ dokusu kaynaklı MKH'lerde majör doku uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf II ifadesinin olmaması

2) Yağ dokusu kaynaklı MKH eksozomları kemik iliği kaynaklı eksozomlarına kıyasla daha yüksek seviyelerde anti-inflamatuar M2 makrofajlarının indüklenmesini sağlaması

3) Hem *in vivo* hem de *in vitro* yağ dokusu kaynaklı MKH eksozomları tarafından kanser büyümesinin baskılanması [274].

İnsan vücudunun en büyük organı olan deri, vücudun iç ve dış çevresi arasındaki dengeyi sağlamaktadır. Cildin normal anatomik yapısı ve fonksiyonel bütünlüğü bozulduğunda, vücudun kendi koruma mekanizması altında yara iyileşmesi ile ilgili bir dizi fizyolojik ve patolojik onarım mekanizması başlatılmaktadır. İyileşme, karmaşık ve dinamik bir hücrel sinyal yanıtı ile oluşan biyolojik ve moleküler aktivite süreçlerinden geçmektedir. Doku onarımını sağlamak 5 adımda gerçekleşir. Bu aşamalar sırasıyla; hemostaz, inflammatuar, proliferasyon, migrasyon ve yeniden şekillenmedir. Yara iyileşmesi kompleks bir süreçtir ve genellikle haftalar veya aylar sürmektedir. Yara iyileşmesi gerçekleşmediği ya da tedavi edilmediği durumlarda dinamik sistem, çok yavaş bir iyileşme süreci olan lokal kan akışının azalması, inflammatuar infiltrasyon ve iskemi veya nekrozdan kaynaklanan bir kas spazmı kısır döngüsüne yakalanmaktadır. Kötü yara iyileşmesi klinik olarak skar oluşumu, hiperpigmentasyon, uzun süreli iyileşme, uzun süreli ülserasyon ve diğer morfolojik ve fonksiyonel anormallikler ile karakterizedir. Düşük seviyeli lazer, gelişmiş terapötik pansumanlar, negatif basınçlı yara tedavisi, elektrik stimülasyonu, hiperbarik oksijen ve deri grefti gibi iyileşmeyi geliştirmek için birçok geleneksel terapötik yaklaşım rapor edilmiştir. Bu yaklaşımların hiçbirisi tamamen tatmin edici değildir. Bu nedenle bu yöntemler klinik uygulamada yaygın olarak kullanılamamaktadır. Teknolojinin de ilerlemesiyle birlikte mevcut tedavi yöntemlerine alternatif olarak eksozomların kullanılmasına ağırlık verilmektedir. [275]

Kutanöz yara iyileşmesi, yaralı cildi iyileştirmenin karmaşık bir sürecidir. [276–278] Birçok hücre tipi, kutanöz yara iyileşme süreci sırasında aşağıdaki gibi oldukça karmaşık bir sırayla birbirleriyle etkileşime girmektedir [279];

1) Trombositler, kırmızı kan hücreleri ve hücre dışı matris moleküllerinden oluşan kan pıhtılarının oluşumunu başlatır.

2) Nötrofiller, monositler ve makrofajlar, inflamatuvar faz sırasında fonksiyon gösteren önemli hücrelerdir. Nötrofiller tarafından salınan kemotaktik faktörler, makrofajlardan monositleri ve sitokinleri çeker ve çevredeki normal dokulardan yaralı bölgeye girmek için fibroblastların göçünü uyarır.

3) Endotel hücrelerinin anjiyogenezi ve vaskülarizasyonu, proliferatif faz sırasında yara bölgesinde göç eden hücrelerin proliferasyonunu desteklemek için oksijen temin eder. Fibroblastlar ayrıca yarada bir gerilme kuvveti oluşturmak için miyofibroblastlara farklılaşır. Fibroblastlar, keratinositlerin göçünü ve çoğalmasını aktive eden büyüme faktörleri salgılar. Reepitelizasyon, hücrelerin kontakt inhibisyonu ile migrasyonun durdurulması sonucu tamamlanır [279].

4) Fibroblast, miyofibroblast ve diğer hücrelerin apoptoz ile yeniden modellenmesi ve ekstrasellüler matriksin bozunması, aylar ya da yıllar sürebilen yara izi yeniden şekillenmesi evresinde meydana gelir. MKH-EV'ler veya MKH-eksozomları, inflamasyonu modüle etme, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar ve keratinositler dahil olmak üzere çeşitli hücrelerin göçünü ve proliferasyonunu aktive etme ve hatta yara oluşumunu iyileştirme yetenekleri nedeniyle cilt yara iyileşmesinin tüm aşamalarını düzenlemektedir. [280-283]

MKH-eksozomlarının taşıdığı moleküller arasında sayısız büyüme faktörü ve Wnt aktivatörü taşıdığı bilinmektedir. Göbek kordonu MKH eksozomlarının Wnt4 ve Wnt11'i taşıdıkları, Wnt sinyalini aktive ettiği ve hedef hücrelerde hücre proliferasyonunu desteklediği bulunmuştur. [284] MKH-eksozomları, saç büyümesi için de çekici tedavi seçeneklerinden biridir. Ancak bugüne kadar, MKH-eksozomlarının saç büyümesi üzerindeki etkilerini bildiren yalnızca bir yayın vardır. Yapılan bu çalışmada, fare kemik iliği MKH-eksozomlarının insan dermal papilla hücrelerinin çoğalmasını desteklediği ve saç büyümesi için gerekli olan VEGF ve IGF-1 gibi büyüme faktörlerinin salgılanmasını indüklediği gösterilmiştir. [285,286]

2.5 Salisilik asit

Bitkisel bir preparattan izole edilen farmakolojik olarak aktif ilk ilaçlar on dokuzuncu yüzyılda tanımlanmıştır. [287] Bunlar analjezik salisin (2-(hidroksimetil)fenil- β -D-glukopiranozit) ve metaboliti salisilik asit (SA) (2-hidroksibenzoik asit)'dir. Bu maddeler söğüt kabuğu ekstrelerinden elde edilmiştir. [287] Söğüt kabuğu ekstrelerinin analjezik ve antipiretik (ateş düşürücü) aktiviteleri kanıtlanmıştır. [288] On dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısında SA, yaygın olarak aspirin olarak adlandırılan, daha mide-bağırsak dostu steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaç asetilsalisilik asit (ASA veya 2-[asetiloksil]benzoik asit) oluşturmak üzere asetillenmiştir. [289]

SA bir monohidroksibenzoik asit, bir tür fenolik asit ve bir beta hidroksi asittir. Salisin metabolizmasından elde edilmektedir. Aspirinin aktif bileşenine (asetilsalisilik asit) kimyasal olarak benzer ancak aynı olmayan bir bileşik olmasının yanı sıra, en iyi akne karşıtı tedavilerde kullanımıyla bilinmektedir. SA'nın tuzları ve esterleri salisilatlar olarak bilinir. Kimyasal olarak SA, bir hidroksil grubu veya onun fonksiyonel türevleri ile aromatik bir halkaya sahip olan çeşitli bitki fenolikleri grubuna aittir. Serbest SA, 157-159°C'de eriyen kristal bir tozudur. Suda orta derecede çözünür, ancak polar organik çözücülerde yüksek oranda çözünmektedir. Sulu çözeltisinin pH'ı 2.4'tür; pKa 2.98 ve log Kow 2.26'ya eşittir. [290] SA'nın bir analogu olan aspirin, sulu çözelti içinde kendiliğinden SA'ya hidroliz olur [291]. SA, çeşitli gruplara ait 36 bitkiden karakterize edilmiştir. Pirinç, yengeç otu, arpa ve soya fasulyesi gibi bitkilerde SA seviyesi yaklaşık 1 mg/g taze kütledir. [292,293]

Karboksil içeren karbona bitişik atomda bir hidroksil grubuna sahip bir benzoik asittir. Bu bileşik daha uygun bir şekilde o-hidroksibenzoik asit olarak adlandırılmaktadır. Asetillenmiş formu olan aspirin komplikasyonsuz ağızdan alınır. Deri yoluyla sistemik olarak emildiğinde çocuklarda teorik bir Reye sendromu riski oluşturmaktadır. Reye sendromu, viral bir enfeksiyon, çoğunlukla grip veya su çiçeği sırasında salisilat (genellikle aspirin) tüketiminden sonra ensefalopatinin ve karaciğerin dejenerasyonunun gelişmesidir. Gebe hastalarda topikal SA kullanımını gösteren hiçbir çalışma olmamasına rağmen, aspirin ile ilişkisi ve hayvan modellerinde doğum kusurlarına neden olan sistemik absorpsiyonu nedeniyle FDA (Food and Drug Administration) kurallarına göre

Gebelik Sınıf C olarak kabul edilir. Ayrıca, sistemik SA, SA peelingi yapılan kadınların emzirilen bebeklerinde veya pıhtılaşma önleyici hastalarda trombosit pıhtılaşma sorunlarına neden olmaktadır. [294]

SA, 2000 yılı aşkın süredir çeşitli cilt bozukluklarını tedavi etmek için topikal olarak kullanılmaktadır. MS birinci yüzyılda, Pliny nasırları ve mısırları tedavi etmek için söğüt kabuğunu SA kaynağı olarak kullanmıştır. SA'nın stratum corneumu yumuşatma ve pul pul dökme yeteneği 1860'larda keşfedilmiştir. Alman dermatolog Paul Gerson Unna, SA'nın özelliklerini ve kullanımını açıklamakla tanınır. Diğer topikal ajanların penetrasyonunu arttırdığı da bilinmektedir. Bir zamanlar bir keratolitik ajan olarak kabul edilen SA'nın, hücreler arası keratin filamentlerini kırmak veya parçalamaktan ziyade hücresel bağlantıları bozma kabiliyetinden dolayı bir desmolitik ajan olarak rolü tanınmaktadır. [295]

SA tipik bir peeling ajanıdır. [296] SA konsantrasyonunun %0,5'ten %30'a, hatta %50'ye kadar yükselmesi [297], etkisini temizleme ve iltihaplanmadan kimyasal soymaya kadar değiştirmektedir. [298] SA'nın güvenilirliği ve toleransı gösterilmiş ve bu nedenle dermatolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. [297] SA, stratum corneum'u yumuşatabilir ve desmozomları hızla çözerek korneositlerin yapışmasının azalmasına ve korneosit tabakalarının pul pul dökülmesine neden olabilir. [299] Sonuç olarak SA, komedolitik özelliklere sahiptir ve hücre dönüşümünü destekler. Lipotropizmi nedeniyle SA, yağ bezine kolayca nüfuz eder ve ek iyileştirici etki için hiperseboreyi (ergenlik dönemiyle tetiklenen yağ bezlerinin meydana getirdiği bir salgı olan sebumun gereğinden fazla üretilmesi durumu) antagonize eder. Antiinflamatuvar aktivite SA'nın bir diğer önemli özelliğidir ve yüz eritemini giderir. Bununla birlikte, SA'nın kullanıldığı spesifik mekanizmalar ve sinyal yolları belirsizliğini korumaktadır. [300]

Sigiller ve lokalize hiperkeratoz, % 10 ila % 40 salisilik asit konsantrasyonları ile tedavi edilebilir. Daha düşük konsantrasyonlarda plak sedef hastalığı ve akne tedavisinde kullanılır. Diğer endikasyonlar arasında akantozis nigrikans, aktinik keratoz, iktiyoz, yüzeysel kimyasal peeling ve tinea nigra bulunur. Genel olarak, akne ve kseroz tedavisi için reçetesiz satılan ilaçlar % 5 veya daha az konsantrasyonlarda SA içermektedir. Sigil ve nasır tedavisi için solüsyonlar % 10 ila % 40 konsantrasyonlarında hazırlanmaktadır. Reçeteli güçlü kremler ve losyonlar

% 6 veya üzeri konsantrasyonlar içermektedir. SA'nın gücü ve toksisitesi, kimyasal yapısının karboksil veya hidroksil grupları üzerindeki ikamelerle değiştirilir. Bu yapı SA'nın ağrı, vücut ısısı, solunum, asit-baz dengesi, böbrekler, kalp, gastrointestinal sistem, ürik asit atılımı, kan ve romatizmal, inflamatuvar ve immünolojik süreçler üzerindeki etkilerinin yanı sıra lokal iritasyon oluşturmaya da neden olur. SA'nın benzen halkası, ultraviyole radyasyonu deriden yayılan daha uzun dalga radyasyonuna dönüştürme işlevi görmektedir. Isı, böylece bir güneş koruyucu etkisi sağlamaktadır [301].

2.6 Aleo-emodin

Aloe vera kelimesi Arapça "Alloeh" kelimesinden türetilmiştir ve "parlayan acı madde" anlamına gelir. "Vera" Latince bir kelimedir ve "gerçek" anlamına gelir. Aloe vera 2000 yılı aşkın süredir fitoterapide veya fitomedikallerde kullanılan bir bitkidir. Mısırlı bilim adamı aloe verayı "ölümsüzlük bitkisi" olarak görmüş ve 2000 yıl kadar önce Yunanlılar bu bitkiye "her derde deva" demişlerdir. [302]

Aleo vera ilk olarak 1934 yılında yapılan çalışma ile modern tıp dergisinde yayınlanmıştır. Bu yayında tüm yaprağın radyasyon sonucu oluşan dermatiti tedavi etmek için nasıl kullanıldığı açıklanmıştır. 20. yüzyılda aleo veranın çok çeşitli tıbbi özelliklerini açıklayan birçok makale yayınlanmıştır. Raporlar esas olarak bitkinin bütün yaprağının, jelinin veya suyunun anti-diyabetik, antikanser ve antimikrobiyal özelliklerine odaklanmıştır. [303] Aloe veranın farmakolojik özellikleri Tablo 2.3'de özetlenmiştir.

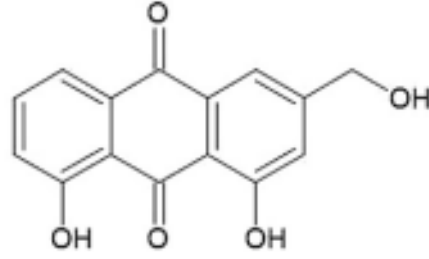
Tablo 2.3 Aleo veranın farmakolojik etkileri [303]

	Bileşen	Etkileri
Vitaminler	Vitamin A,B ve C	Antioksidan olarak çalışır ve serbest radikalleri nötralize eder.
Enzimler	Alilaz, alkalın fosfataz, amilaz, bradikininaz, karboksilaz, selülaz, lipaz, peroksidaz	İnflamasyonu azaltır ve metabolizmaya yardımcı olur.
Şekerler	Glukoz, fruktoz ve polisakkaritler	Beslenme kaynağı ve anti-alerjik aksiyon
Yağ asitleri	Kolesterol, beta-sisesterol, lupeol gibi bitki steroidleri	Anti-septik ve analjezik
Hormonlar	Oksin ve giberellin	Yara iyileşmesi ve anti-inflamatuvar etki
Antrakininon	Aloin ve emodin	Analjezik, anti-bakteriyel ve anti-viral

Aloe vera, Liliaceae familyasına ait iyi bilinen, sıcak tropik iklimlerde kolayca yetişen kaktüs benzeri bir bitkidir. Aloe vera yaprağındaki jel, geleneksel olarak sindirim sistemi rahatsızlıkları, güneş yanığı ve yaraların tedavisinde kullanılmıştır. Aloe vera jelinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda farmakolojik etkileri, anti-inflamatuvar, antibakteriyel, antioksidan, bağışıklık arttırıcı ve hipoglisemik özellikleri incelenmiştir. [304]

% 99,0-99,5 su içeriğine sahiptir ve geri kalan % 0,5-1,0'inin 200'den fazla aktif bileşik ve 75 besin maddesi içerdiği kanıtlanmıştır. Bu bitkide bildirilen aktif bileşikler saponinler, şeker, enzimler, vitaminler, aloesin, aloe-emodin, aloin, acemannan, aloemannan, aloeride, metilkromonlar, flavonoidler, naftokinonlar, steroller, mineraller, antrakinonlar, amino asitler, lignin, SA, yağda çözünen ve suda çözünen vitaminler, enzimler, mineraller, basit/kompleks şekerler, organik asit ve fenolik bileşiklerdir. Ayrıca, iyileştirici etki gösteren yüksek molekül ağırlıklı bileşiklere sahiptir. Laktin benzeri proteinler, polisakkaritler ve postagladinler, Mannos-6-fosfat yara iyileşmesinde rol oynar. Antiviral özellikler için çeşitli bitkilerden antrakinonlar incelenmiştir. [302] Su tutma kapasitesi yüksek olduğundan cildi nemlendirmek için kullanılmaktadır. Jelin, yara iyileşmesini hızlandırdığı ve hücre büyümesi, mide rahatsızlıkları, kabızlık, termal yanık, güneş yanığı, radyasyon kaynaklı yaralanmalar, cilt hastalığı, enflamatuar etki, diyabet, ülser vb. hastalıklar için kullanıldığı bilinmektedir. Aloe vera jeli ile vücudun bağışıklık sisteminin uyarılabileceği çeşitli araştırmalarda da öne sürülmektedir. Ayrıca ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Kozmetik ve tuvalet endüstrisinde, çok çeşitli endikasyonlar için hem harici hem de dahili kullanımlar için toz, kapsül, krem, losyon, sabun, şampuan, yüz temizleyici, yağ ve diğer ürünlerin üretiminde temel malzeme olarak kullanılmıştır. Aloe türlerinden birçok aktif bileşen izole edilmiş ve biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Bunlar arasında aloin ve aloe-emodin bitkinin ana aktif bileşenleri olarak tanımlanmıştır. [305]

Aloe-emodin (1,8-dihidroksi-3-hidroksimetil-antrakinon), doğal bir antrakinon türevidir ve *Cassia occidentalis*, *Rheum palmatum L.*, *Aloe vera* ve *Polygonum multiflorum Thunb* gibi Çin bitkilerinin aktif bir bileşenidir. [306] Zorlu şartlarda hayatta kalması, bilim insanlarını aloe veranın antibiyotik etkileri olduğuna inanmaya teşvik etmektedir. Aleo-emodin akciğer, mide, karaciğer, melanom, meme ve kolon kanseri hücreleri gibi farklı tümör hücreleri üzerindeki dikkate değer antineoplastik aktivitesi nedeniyle çok dikkat çekmiştir. Ayrıca, aloe-emodinün antivirüs, antienflamatuar, antibakteriyel, antiparaziter, nöroprotektif ve hepatoprotektif gibi geniş bir farmakolojik etki yelpazesi sergilediği gösterilmiştir. [307] Aleo-emodinün kimyasal yapısı Şekil 2.20'de gösterilmiştir.



Şekil 2.20 Aloe-emodin kimyasal yapısı [308]

Aloe-emodin, influenza virüsü, inflamasyon, sepsis, Alzheimer hastalığı, glokom, sıtma, karaciğer fibrozu, sedef hastalığı, Tip 2 diyabet ve büyüme bozuklukları dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların profilaksisi ve tedavisi için değerli bir tedavi seçeneği olabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, önceki çalışmalar, çeşitli kemoterapötik ajanlar ve hedefe yönelik tedavilerle birlikte aloe-emodin kanser tedavisinde daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, aloe-emodin diğer ilaçlarla kombinasyon halinde güvenle kullanılabilmesi için aloe-emodin diğer ilaç metabolizması üzerindeki etkisini değerlendirmek önemlidir [307].

Antrakınonların antiinflamatuvar ve immünomodülatör etkileri ile ilgili olarak, önerilen bir mekanizma antioksidasyonu içerir. Antrakınolar, antioksidanlar ve radikal temizleyiciler olarak işlev görebilir. Reaktif oksijen türleri ve serbest radikal aracılı reaksiyonlar, inflamatuvar yanıtta yer alır ve karaciğer nekrozuna katkıda bulunabilir. [309] Karaciğer örneklerinin histolojik analizi, aloe-emodin ile tedavi edilen sıçanlarda lenfositlerin ve Kuffer hücrelerinin inflamatuvar infiltrasyonunun azaldığını göstermiştir. Aloe-emodin ön tedavisi, karbon tetra klorürün neden olduğu akut karaciğer hasarını azaltmıştır. [310] Aloe-emodin, hepatosit hücrelerinin ölümüne ve lipid peroksidasyonunu takiben oluşan inflamatuvar yanıtı karşı koruma sağlamaktadır. [311] Aloe-emodin antioksidan ve radikal moleküllere karşı yok edici aktivitesi, linoleik asidin peroksidasyonuna karşı bir koruma mekanizması olarak önerilmiştir. Aloe-emodin dahil antrakınonların antiprotozoal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Aloe-emodin, mide kanserinin olası bir nedensel faktörü olan *Helicobacter pylori*'nin doza bağlı büyüme inhibisyonunu ortaya çıkarmıştır. [312,313] Aloe-emodin, arilamin N asetiltransferaz aktivitesinin inhibitörü gibi davranabilir, böylece arilamin kanserojenlerinin karsinogenezi indüklemedeki etkilerini azaltabilmektedir. Ayrıca

aleo-emodin tedavisine yanıt olarak iyileşen dokular tarafından antibiyotik faktörleri salınmaktadır [314].

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

- Ters mikroskop (Olympus CKX41)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Hava akımlı kabinler (Laminar flow -Thermo Scientific Herasafe, Faster BHEN 2006)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C, FrioCell 111 25 °C)
- Hassas terazi (PrecisaGravimetrics AG)
- Vortex (LMS (laboratuvarı medical supplies) VTX-3000L)
- Su banyosu (GFL, Kerman)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph instruments)
- ELISA cihazı (Spektromax)
- Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
- -152 °C dondurucu (Panasonic)
- -80 °C dondurucu (Panasonic)
- -197 °C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Etüv (Nüve)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- Mikropipetler (10, 100 ve 1000 µl'lik ,Thermo, Pippetman)
- Pipet uçları (1-10, 20-200, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık, AxyGen)
- 15 ve 50 ml. Santrifüj tüpleri (Eppendorf , Falkon)
- ELISA 96 kuyulu plakları (TPP)
- Hücre kültürü plakları (TPP)
- Hücre kültür flaskları 25, 75, 175, 225 ve 300 cm² (TPP, Corning)

- Serolojik pipet tabancası (Thermo, BlueSwan)
- Serolojik pipetler 5,10, 25 ve 50 ml (Falkon)
- Kriyotüpler (Corning, Nest)
- Enjektör ucu filtre (0.22 µm)
- Otoklavlanabilir cam şişeler 50-1000ml'lik (ISOLAB, SCHOTT)
- Thoma lamı hücre sayımı için (Menzel superior)
- Enjektörler 1, 5, 10 ve 50 cc'lik (Set Medikal)
- Zetasizer NanoZS 90
- Ultrasantrifüj (Beckman Coulter)
- Ultrasantrifüj Tüpü (Optiseal, Beckman Coulter)
- Flow sitometri cihazı (BD)
- Real Time PCR (Thermo)
- Termal Döngü Cihazı
- Gen Ekspresyonu (Qiagen), Qiagen RNA izolasyon kiti
- Spektrofotometre (Spektramax)
- Thermo Pierce BCA Protein Assay Kit
- System Biosciences Exo-Flow Exosome FACS Kits
- Qubit® RNA Assay Kit for Use With The Qubit®2.0 Fluorometer [Invitrogen/Molecular Probes]
- TeloTAGGG Telomerase PCR Elisa Plus Kiti
- Human MSC Analysis Kit (Stemflow, BD)
- 100 mm plastik kültür petri (Biopointe)
- Rt2 Syber Green Master Mix (Qiagen)
- SEM-ESEM-FEG (Low Vac)
- Nanosight NS300
- Vicell XR Cell Analyzer (Beckman Coulter)

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Besiyeri/Çözeltiler

- Tripan mavisi (Biological Industry)
- Amonyum sülfat, (NH₄)₂SO₄ (merck)
- Sodyum klorür, NaCL (Sigma)
- Potasyum hidroksit, KOH (Merck)

- Sodyum bikarbonat, NaHCO₃ (Merck)
- Etanol (Merck)
- L-Glutamine (PAN Biotech)
- Salisilik asit (Tekkim)
- Aleo-emodin (Abcam)
- RPMI-1640 (GIBCO Invitrogen)
- DMEM F12 (Lonza, Capricon)
- DMSO (Origen)
- Trypsin EDTA (Biological Industries)
- Penisilin/streptomisin (Biological Industries)
- Human Serum (Sera Care)
- MSC NutriStem XF Basal Medium (Biological Industries)
- MSC Nutristem Supplement (Biological Industries)
- FBS-fetalbovine serum (GIBCO Invitrogen)
- DPBS (Gibco)
- Metanol (Sigma)
- Formaldehit (Sigma)
- Vi-Cell Reagent Pak
- Qubit® RNA Assay Kit for use with the Qubit®2.0 Fluorometer
[Invitrogen/Molecular Probes]
- Human MSC Analysis Kit (Stemflow, BD)
- BD FACSanto (BD Biosciences)
- Qiagen RNA izolasyon kiti
- RT2 First Standard Kit (Qiagen)
- TeloTAGGG Telomerase PCR Elisa Plus Kiti
- System Biosciences Exo-Flow Exosome FACS Kits
- CD63 PE/CD81 APC ve CD 9 PE antikorları

3.2 Metod

3.2.1 *In vitro* Hücre Kültürü

Ekstrasellüler vesikül, salisilik asit ve aleo-emodin formülasyonlarının toksik ya da metabolik etkilerini belirleyebilmek için J774 Makrofaj hücre hattı, L929 fibroblast hücre hattı ve Vero hücresi (maymun böbrek epitel hücre hattı) kullanıldı. Hücreler standart hücre kültürü protokollerine göre çoğaltıldı ve donduruldu. Dondurma besiyeri olarak %70 DMEM, %20 Fetal Bovine Serum ve %10 DMSO kullanıldı. Hücrelerin sayım işlemleri için Thoma Lamı kullanıldı ve OLYMPUS marka mikroskop ile analiz edildi. 16 farklı kare içerisinde hücreler sayıldıktan sonra toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Hücre Konsantrasyonu} = \text{Hücre sayısı} \times \text{Seyreltme oranı} \times 10^4 \text{ hücre/mL}$$

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \text{Hücre konsantrasyonu} \times \text{Hücre Süspansiyon Hacmi} \quad (3.1)$$

3.2.1.1 J774 Makrofaj Hücre Hattının Kültürünün Yapılması ve Kriyoprezervasyonu

Kriyobankımızda mevcut olan J774 makrofaj hücre hatlarının kültürü, RPMI 1640 (%1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS, %1 glutamin) içeren 25 cm²'lik steril kültür flaskları kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler -196°C'lik azot tankından çıkarıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda hızlıca çözülerek % 10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri ile sulandırıldı. 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildikten sonra hücreler süspanse edildi ve Thoma lamı yardımıyla sayımları yapıldı. T25 flask içerisinde ml'de 1-2x10⁶ hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücreler flaskın yüzeyini kapladıktan sonra tripsinizasyon işlemi başlatıldı. Bunun için flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. PBS ile yıkandıktan sonra Tripsin-EDTA eklendi ve 37°C'de 3-4 dakika inkübe edildikten sonra hücreler flasklardan kaldırıldı ve falkon tüplere aktarıldı. Hücreler 5 ml RPMI 1640 (%10 FBS) ile sulandırılarak 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti tekrar RPMI 1640 ile sulandırıldı ve Thoma lamı ile sayım yapıldı. 1-2x10⁶ hücre/ml olacak şekilde flasklara ekim yapıldı. Artan hücreler kriyobank oluşturmak amacıyla taze hazırlanan dondurma solüsyonu ile yavaşça sulandırılarak 2 ml cryo tüplerin

içerisine aktarıldı. +4°C'de bir saat bekletildikten sonra -20°C'de 2 saat, ardından -40°C'de bir gece bekletilip sıvı azot tankına konuldu.

3.2.1.2 L929 Fibroblast Hücre Hattının Kültürünün Yapılması ve Kriyoprezervasyonu

Kriyobankımızda mevcut olan L929 fibroblast hücreleri -196°C'lik azot tankından çıkarıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda hızlıca çözülerek % 10 FBS içeren DMEM F12 içeren falkon içerisine alındı. 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 6-7ml DMEM F12 (%1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS, %1 glutamin) besiyeri ile sulandırıldı. Hücreler T25 flaska ekilerek %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücreler flask yüzeyini yeteri kadar kapladığında besiyeri uzaklaştırıldı ve flasklar PBS ile yıkandıktan sonra tripsin eklenerek %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 3-4 dk inkübe edildi. Flask yüzeyinden kaldırılan hücreler 5 ml % 10 FBS içeren DMEM F12 besiyeri ile sulandırıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tekrar sulandırıldı ve Thoma lamı ile sayım yapıldıktan sonra 1-2x10⁶ hücre/ml olacak şekilde flasklara ekim yapıldı. Artan hücreler kriyobank oluşturmak amacıyla taze hazırlanan dondurma solüsyonu ile yavaşça sulandırılarak 2 ml cryo tüplerin içerisine aktarıldı. +4°C'de bir saat bekletildikten sonra -20°C'de 2 saat, ardından -40°C'de bir gece bekletilip sıvı azot tankına konuldu.

3.2.1.3 Vero Hücre Hattının Kültürünün Yapılması ve Kriyoprezervasyonu

Kriyobankımızda mevcut olan Vero hücre hattı (maymun böbrek epitel hücresi) -196°C'lik azot tankından çıkarıldıktan sonra 37°C su banyosunda çözülür çözülmez % 10 FBS içeren DMEM F12 ile sulandırıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 6-7 ml DMEM F12 (%1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS, %1 glutamin) besiyeri ile sulandırılarak T25'lik flasklara ekim yapıldı. Hücreler flaskın yüzeyini yeteri kadar kapladıktan sonra düzenli olarak pasajlandı. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandıktan sonra tripsin eklenerek %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 3-4 dk inkübe edildi. Flask yüzeyinden kaldırılan hücreler 5 ml % 10 FBS içeren DMEM F12 besiyeri ile sulandırıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tekrar sulandırıldı ve Thoma lamı ile sayım yapıldıktan

sonra $1-2 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde flasklara ekim yapıldı. Artan hücreler kriyobank oluşturmak amacıyla taze hazırlanan dondurma solüsyonu ile yavaşça sulandırılarak 2 ml cryo tüplerin içerisine aktarıldı. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir saat bekletildikten sonra -20°C 'de 2 saat, ardından -40°C 'de bir gece bekletilip sıvı azot tankına konuldu.

3.2.2 *L. Major* Kültürünün Yapılması

Kriyobankımızda mevcut olan kutanöz leishmaniasis etkeni *L.major* promastigotlarının kültürü RPMI 1640 besiyerinde 27°C soğutmalı etüvde gerçekleştirildi. Parazitlerin gelişimi ve morfolojik durumu ters mikroskopta incelendi. Kültürün pasajı haftada iki kez yapıldı ve pasaj öncesi kültürden örnek alındı. Parazitlerin morfolojileri, hareketlilikleri incelendi ve sayımları yapıldı. Flaska 7 ml besiyeri eklendi ve üzerine 3×10^5 parazit/ml olacak şekilde kültürden parazit ekimi yapıldı. Parazitlerin kriyobankı oluşturmak üzere sıvı nitrojen tankına koymadan önce pasaj aşamasına gelen hücrelerin süspansiyon halindeki kültüründen 900 µl kriyo tüpe alınıp, 100 µl steril DMSO yavaşça tüpün çeperlerinden eklendi ve 1 saat 4°C 'de, 24 saat -40°C 'de bekletilip sıvı azot tankına kaldırıldı. Parazitlerin hareketli olmalarından ötürü thoma lamında sayılması zordur. Bu nedenle %2'lik formalinle parazitlerin fikse edilmesi gerekir. Kültürden 10 µl alınır ve 1:10 oranında %2'lik formalinle karıştırılarak 3-5 dakika bekletilir. Thoma lamında aşağıdaki formül kullanılarak sayım yapıldı;

$$\text{Parazit sayısı (1 ml içindeki parazit sayısı)} = \text{Ortalama hücre sayısı (16 karede yapılan parazit sayımı)} \times \text{Sulandırma katsayısı} \times \text{Thoma lamı sabiti (10.000)} \quad (3.2)$$

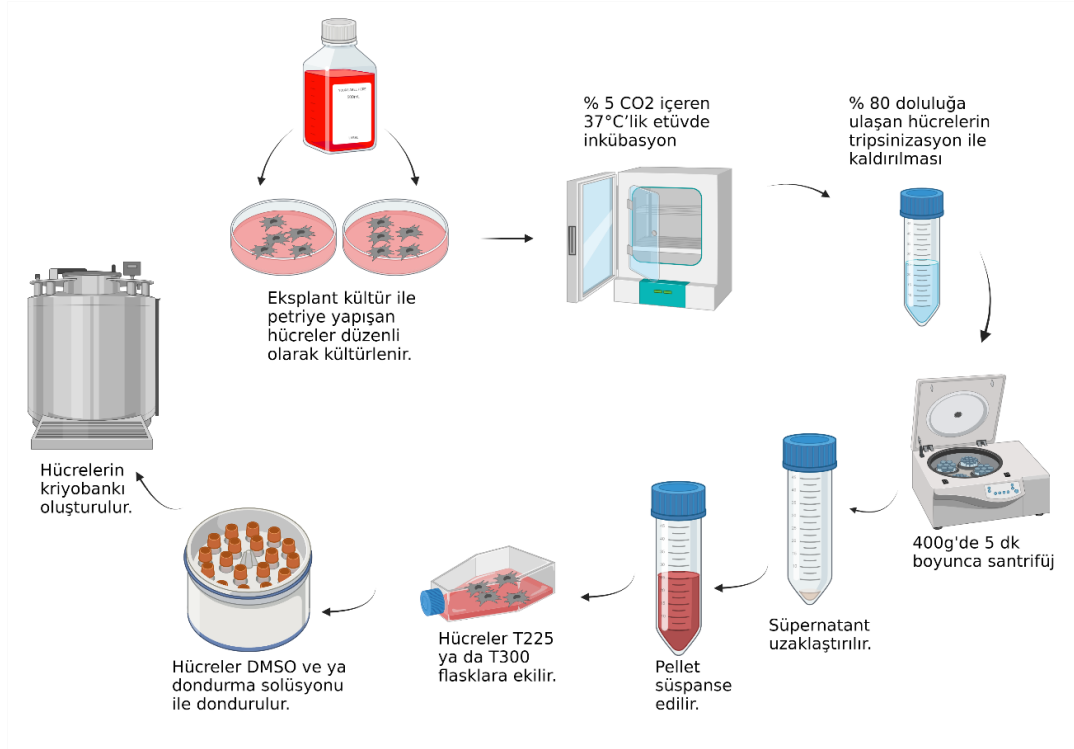
3.2.3 Göbek Kordonundan Mezenkimal Kök Hücrelerin Eldesi ve Karakterizasyonu

Liv Hospital Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümünde sezaryen ile doğum yapan sağlıklı donörden yazılı onam alındıktan sonra göbek kordonu steril şartlar altında Liv Hospital Rejeneratif Tıp ve Kök Hücre Merkezi'ne uygun doku taşıma solüsyonu içerisinde getirildi. İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practise-GMP) koşullarına uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla bağışçıdan serolojik testlerin (HbsAg, Anti-Hbs, Anti-HCV, HIV 1/2, VDRL, Anti-HBC Total) yapılması için kan alındı. Serolojik test sonuçlarının GMP şartlar altında çalışma koşullarına uygun

olması durumunda göbek kordonu dokusu işleme alındı. Göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin tez çalışması kapsamında kullanılabilmesi için İstinye Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvurularak çalışma onayı alındı (2017-KAEK-20).

3.2.3.1 Göbek Kordonundan Primer Kültür ile Hücre İzolasyonu ve Devamlı Kültürünün Yapılması

Kordon üniteleri yaklaşık 5 cm uzunlukta kesilerek küçük parçalara ayrıldı. Cam petri içerisinde PBS ile yıkanarak doku parçaları kandan uzaklaştırıldı. Endotel hücre kontaminasyonunu önlemek için arterler ve ven bir pens yardımıyla çıkarıldı. Göbek kordonunun parçaları daha küçük parçalara kesilecek ve dokunun iç kısmında yer alan Wharton Jeli 100 mm hücre kültürü plakalarına yapışacak şekilde konumlandırıldı. Doku etrafında kalan yıkama suyu kuruyana kadar laminar akış kabini içerisinde ağzı açık bir şekilde bekletildi. %2 insan serumu (Seracare, Milford, MA, ABD), 50 U/ml penisilin- streptomisin (Biological Industries, Cromwell, CT, ABD) eklenen MSC NutriStem® XF Basal Medium ve MSC NutriStem® XF Supplement (Biological Industries, Cromwell, CT, ABD) içeren hücre kültürü ortamında %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Yeterli yüzey doluluğuna ulaşan hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Hücreler Tripsin-EDTA kullanılarak flasklardan kaldırıldı ve falkon içerisine alındı. 400g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı ve pelet sulandırılarak hücre sayısı ve canlılıkları analiz edildi. Sayım ve canlılık analizleri için Vicell XR Cell Analyzer (Beckman Coulter) ve Reagent ViCell Pack sayım kiti kullanıldı. Hücrelerin belli pasajlarda dondurulması için Nutrifreez D10 Cryopreservation Medium kullanıldı. Eksplant kültür yöntemi ile petrilere yapışan hücreler ileri pasajlara aktarılarak karakterizasyon analizleri yapıldı.



Şekil 3.1 Göbek kordonundan mezenkimal kök hücre izolasyon, üretim ve kriyoprezervasyon süreçlerinin şematik özeti (Biorender.com’da çizildi)

3.2.3.2 Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri Yöntemi ile Karakterizasyonun Yapılması

Pasaj 3 seviyesine gelen hücrelerin flow karakterizasyonu için Human MSC Analysis Kit (Stemflow, BD) kullanıldı. Kültürden tripsinizasyon işlemi ile kaldırılan hücrelerden 1×10^6 hücre ayrılarak 2000 rpm’de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 300 µl PBS eklendi. Pozitif, negatif ve kontrol olmak üzere 3 farklı tüp hazırlandı ve hücreler paylaştırıldı. Tüpler içerisine antikorlar aşağıda listelendiği gibi eklendi;

- Kontrol; 20 µl Isotype Control Positive + 20 µl Isotype Control Negative
- Pozitif; 5 µl CD90 + 5 µl CD44 + 5 µl CD73 + 5 µl CD105
- Negatif; 20 µl Negatif Cocktail (CD34, CD45, CD11b, CD19, HLA-DR).

Antikorlar tüplere eklendikten sonra vorteksledi ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her tübe 2 ml cell wash eklenerek hücreler yıkandı ve 300g’de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 300 µl cell wash ile yıkandı ve BD FacsCanto (BD

Biosciences) cihazı ile okunarak BD FACS Diva 6.6 Software yazılım programında analizleri yapıldı.

3.2.3.3 Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Gen Ekspresyonu Analizlerinin Yapılması

Pasaj 3 seviyesine gelen hücrelerin gen ekspresyonu analizleri yapıldı. RNA izolasyonu Qiagen RNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. cDNA ise, RT2 First Standard Kit (Qiagen) kullanılarak sentezlendi. PCR çalışmaları Syber Green PCR Master Mix ile yapıldı. Numunedeki nükleik asit miktarı, döngü eşiği (CT) değeri ile ters orantılıdır. Bu değer, örnekteki kopya sayısı ile ilgilidir. 29'un altındaki CT değerleri, genlerin pozitif ekspresyon verdiğini gösterir. Ct değerleri 29'dan küçükse, bu genler kuvvetli pozitif genler olarak tanımlanır. 30-37 arasındaki genler, orta miktarda hedef nükleik asit gösteren reaksiyonlara kıyasla pozitif olarak kabul edilir. Çalışmamızda OCT4, SOX2, TERT ve ZFP42 gibi spesifik mezenkimal kök hücre genlerini analiz edildi. OCT4'ün mezenkimal kök hücrelerde bir pluripotens belirteci olduğu bilinmektedir. SOX2, pluripotent kök hücrelerde önemli bir transkripsiyonel düzenleyicidir. Oct4 ve Nanog geni ile birlikte embriyonik kök hücrelerde gen ekspresyonunu kontrol eder ve pluripotensi özelliklerini korurlar. ZFP4, bir pluripotens belirteci olmasının yanı sıra, Oct4'ün hedef genidir ve embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesi ile pluripotensin sürdürülebilirliği için gereklidir. Yapılan analizlerde kontrol olarak GAPDH seçilmiştir.

RNA izolasyonu

Qubit® RNA Assay Kit for use With the Qubit®2.0 Fluorometer [Invitrogen/Molecular Probes] RNA ölçümü için kullanıldı. Kit içerisindeki standartlar ile RNA miktarı ng/µl cinsinden hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda cDNA sentezinde kullanılması amacıyla elde edilen total RNA miktarının 0.8 µg olduğu belirlendi.

Pasaj 3 seviyesine gelen hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldıktan sonra 2×10^6 hücre ayarlandı ve üzerine 500 µl Buffer RLT 30 saniye boyunca vortekslendi. 2ml tüp üzerine yerleştirilen gDNA ayrıştırıcı dönüş kolonundan hücreler geçirildi. 10.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildikten sonra gDNA ayrıştırıcı dönüş kolonu atıldı ve 350 µl %70'lik etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Farklı 2 ml tüp üzerine RNeasy dönüş kolonu eklendi ve 700 µl örnek kolondan geçirildi. 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj

edildikten sonra tüp atıldı ve kolon yeni bir tüpün üzerine eklendi. Üzerine 700 µl RW1 eklendikten sonra 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlendi ve tüp tekrar atıldı. Kolon tekrar yeni bir tüpe aktarıldı ve bu sefer üzerinden 500 µl RPE eklendi ve 10.000 rpm'de 15 sn boyunca santrifüjlendi. Kolonu yeni bir tüpe aktarmadan önce tekrar 500 µl RPE eklendi ve 10.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj yapıldı. En son olarak kolon diğer bir tüpe alındı ve 1 dakika boyunca son hızda çevrilerek kuruması sağlandı. Son olarak kolon ependorf üzerine koyularak 45 µl RNaz içermeyen su eklendi ve kapağı kapatıldı. 10.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi ve RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

cDNA sentezi

DNA eliminasyon miksi hazırlama

RNA	7 µl
Buffer GE	2 µl
RNaz içermeyen su	1 µl
TOTAL HACiM	10 µl

Yukarıdaki oranda hazırlanan miks yavaşça pipetajlandı ve termal döngü cihazında 5 dakika boyunca 42°C'de inkübe edildi.

Reverse-transkriptaz miksi hazırlama

5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transkriptaz Mix	2 µl
RNaz içermeyen su	3 µl
TOTAL HACiM	10 µl

10 µl genomik DNA eliminasyon miksi ile 10 µl revers-transkriptaz miksi karıştırılarak pipetaj yapıldı ve döngü cihazına eklendi. 42°C'de 15 dakika, 95°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Döngü sonunda 91 µl RNaz içermeyen su eklendi ve reaksiyon buz içerisinde konularak polimeraz zincir reaksiyonu devam ettirildi. TERT, OCT4, SOX2 ve ZFP42 genlerinin ekspresyon seviyeleri Rt2 Syber Green Master Mix (Qiagen) ile ölçüldü. ΔCT değerleri hesaplandı.

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için seçilen TERT, OCT4, SOX2 ve ZFP42 genlerinin 1 µM'lık primerleri ve Gliseraldehit 2-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) primeri ticari olarak satın alındı.

PCR içeriklerinin hazırlanması

RT2 SYBR Green Mastermix	12,5 µl
c DNA sentez reaksiyonu	1 µl
Primer (1 µM)	1 µl
RNaz İçermeyen Su	10,5 µl
TOPLAM	25 µl

Hazırlanan karışımlar ile Real Time PCR amplifikasyon ürünü elde etmek için belli döngüler kullanıldı.

Tablo 3.1 Real Time PCR protokolü

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Hold	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	20 saniye	40
Annealing	55 °C	30 saniye	

3.2.3.4 Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Telomeraz Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi

Pasaj 3 seviyesine gelen hücrelerin telomeraz enzim aktivitesinin belirlenmesi için TeloTAGGG Telomerase PCR Elisa Plus Kiti kullanıldı. Tripsinizasyon ile kaldırılan hücrelerden 200.000 hücre her reaksiyon için ayrılır ve +4°C'de 3000g'de 5 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Pellet PBS ile yıkandıktan sonra tekrar +4°C'de 3000g'de 5 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 200 µl Lysis Reagent ile resüspanse edildi ve buzda 30 dakika boyunca inkübe edildi. Elde edilen lizat 16000g'de +4°C'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve bu örnekler "S1" olarak adlandırıldı. Ayrılan örnekler 5 µl alınarak 95°C'de 20 dk boyunca degradasyon sağlandı. Sıcaklığa maruz bırakılan

bu hücreler, bu aşamadan sonra “S0” olarak adlandırıldı. S0 ve S1 örnekleri kullanılarak aşağıdaki PCR karışımı hazırlandı;

Tablo 3.2 Lizatların PCR tüplerinin hazırlanışı

	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	S0	S1
Örnek/Kontrol	1 µl Lysis Reagent	1µl Kontrol Template (Low ya da High)	3µl Sıcaklık Uygulanmış Örnek	3µl Sıcaklık Uygulanmamış Örnek
Master Mix	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Su	19 µl	19 µl	17 µl	17 µl
Toplam Hacim	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Hazırlanan PCR örnekler (negatif kontrol, pozitif kontrol, S0 ve S1 örnekleri) aşağıdaki tabloda açıklanan PCR reaksiyonuna tabi tutulur;

Tablo 3.3 PCR reaksiyon süreçleri

	Zaman	Sıcaklık	Döngü
Primer Uzatma	10-30 dk	25 °C	1
Telomeraz İnaktivasyonu	5 dk	94 °C	1
Amplifikasyon;			
Denatürasyon	30 sn	94 °C	1-30
Annealing	30 sn	50 °C	
Polimerizasyon	30 sn	72 °C	
	10 dk	72 °C	1

Tut		4 °C	
------------	--	------	--

ELISA yapım aşaması

S1 örnekleri ve pozitif kontrol için 2 şer tane eppendorf hazırlandı. Bunlardan biri “T” diğeri “IS” diye isimlendirildi. (Örneğin; Örnek adı-S1/T ve Örnek adı-S1/IS; pozitif kontrol için PK/T ve PK/IS).

S0 ve negatif kontrol için birer tane eppendorf hazırlandı ve “T” olarak isimlendirildi. (Örneğin; Örnek adı-S1/T ve negatif kontrol için NK/T)

Hazırlanan “T” ve “IS” tüplerine 10 µL Denaturation Reagent ve 2,5 µL PCR ürünü eklendi. Tüpler 10 dk 15-25°C’de inkübe edildi

İnkübasyon süresi dolduğunda, hazırlanan tüplerden “T” olarak isimlendirilenlere Hybridization Buffer-T, “IS” olarak isimlendirilenlere Hybridization Buffer-IS’den 100 µl eklenir. (Negatif kontrol ve S0 örnekleri sadece T olarak adlandırıldığı için sadece Hybridization Buffer-T eklendiği unutulmamalıdır).

Örnekler mikrolaka modüle yüklendikten sonra üzeri kit içinden çıkan kaplama kâğıdı ile dikkatlice kapatıldı. Modül 37°C’de 2 saat 300 rpm’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyularda bulunan örnekler mikropipetle alınıp, atıldı. Boş kalan kuyular 3 kez Washing Buffer ile yıkandı. Her bir yıkamada Washing Buffer’ın kuyularda kalma süresinin en az 30 saniye olması gerekir. Yıkama işlemi ardından tüm kuyulara 100 µL Anti-DIG-HRP eklenir.

Washing Buffer Hazırlama: Kit içindeki Washing Buffer 10X’dır. Kullanımdan önce 1X’e steril distile su ile seyreltilmesi gerekmektedir. Önden hazırlanıp kullanıma kadar +4°C’de saklanabilir.

Anti-DIG-HRP Hazırlama: Kit içinde liyofilize olarak bulunur ve ilk olarak 240 µL steril distile su ile çözündürülür. Bu çözelti +4°C’de 6 ay saklanabilir. Çalışma öncesinde ise bu hazırlanan çözelti aşağıdaki örnekte verilen miktarlar baz alınarak seyreltilir.

10 mL Anti-DIG-HRP çalışma çözeltisi hazırlamak için; 200 µL Anti-DIG-HRP stoğu 9,8 mL Conjugate Dilution Buffer ile seyreltilir.

- Modülün üzeri kaplama kağıdı ile dikkatlice kapatıldı. 30 dk 300 rpm’de 15-25°C’de inkübe ettirildi.
- İnkübasyon sonunda kuyularda bulunan örnekler mikropipetle alınıp, atıldı.
- Boş kalan kuyular 5 kez Washing Buffer ile yıkandı. Her bir yıkamada Washing Buffer’ın kuyularda kalma süresinin en az 30 saniye olmalıdır.
- Daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş olan TMB Substrate’den her kuyuya 100 µL eklendi.
- Modülün üzeri kaplama kâğıdı ile dikkatlice kapatıldı. 20 dk 300 rpm’de 15-25°C’de inkübe ettirildi.
- İnkübasyon sonunda, kuyuların içindeki çözeltiler alınmadan üzerlerine 100 µL Stop Reagent Solution eklendi. Bu işlemin ardından 30 dk içinde ölçüm alınmalıdır.
- 450 ve 690 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

Verilerin hesaplanması

İlk olarak elde edilen tüm okuma verilerinde 450 nm’de elde edilen değerlerden 690 nm’de elde edilen değerler çıkartılır. Bu elde edilen yeni veriler ile aşağıda açıklanan hesaplama ve değerlendirmeler yapılır.

Negatif Kontrol Sonucu Değerlendirme: 450 ve 690 nm’deki veri farkından elde edilen değer 0,1’den küçük olmalıdır. Aksi halde test tekrar edilmelidir.

Pozitif Kontrol Sonucu Değerlendirme: Elde edilen fark verileri ile aşağıdaki formül hesaplanır;

$$[(\text{Pozitif kontrol}, T) - (\text{Negatif kontrol}, T)] / (\text{Pozitif kontrol}, IS) \quad (3.3)$$

Bu işlem ardından elde edilen değer Low Control kullanıldıysa 0,3 – 0,8 arasında, High Control kullanıldıysa 0,9 – 4 arasında olmalıdır.

Test Örneklerinin Değerlendirilmesi: Elde edilen fark verileri ile aşağıdaki formül hesaplanır.

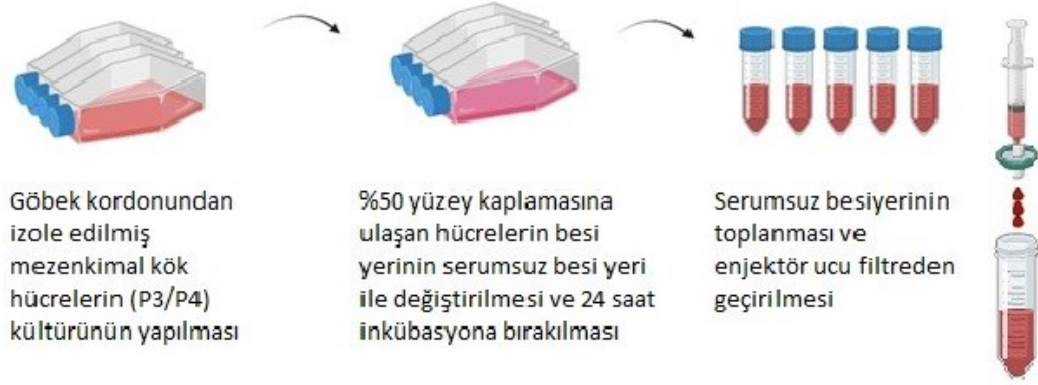
$$[[(S1, T) - (S0, T)] / (S1, IS)] / [PK-S1,T-NK-S0,T] / PK-S1,IS * 100 = RTA \quad (3.4)$$

Elde edilen sonuç test edilen örneğin **Relative Telomerase Activity (RTA)** değerini vermektedir.

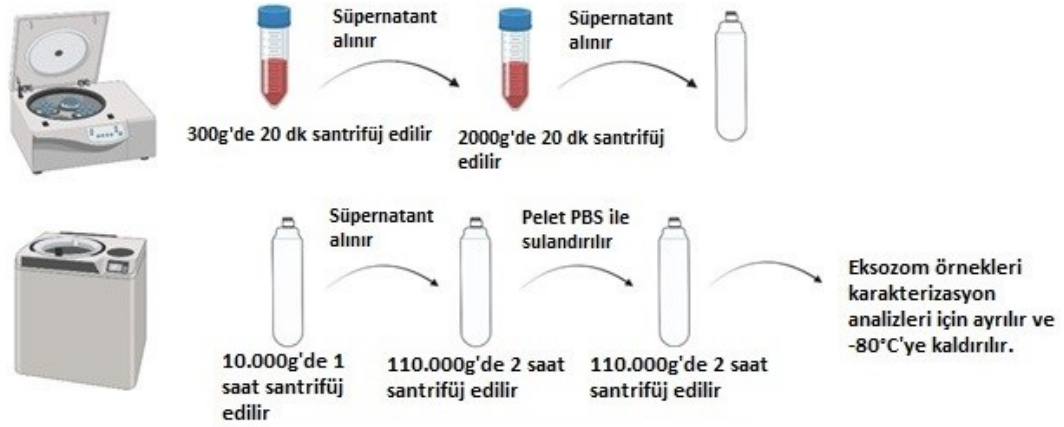
3.2.4 Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerden Ekstrasellüler Vesiküllerin Üretilmesi ve Karakterizasyonunun Yapılması

3.2.4.1 Eksozom Üretimi ve Saflaştırılması

Primer kültür izolasyonu yapıldıktan sonra belirli pasaj seviyesine gelen ve dondurulan hücrelerden belli aralıklarla eksozom üretimi yapıldı. -152°C'lik buzdolabından çıkarılan hücreler 37°C'lik su banyosunda hızlıca çözündürüldü ve %2 Human Serum içeren PBS içerisine aktarıldı. Hücreler 400g'de 5 dk boyunca santrifüj edildikten sonra Nutristem besiyeri ile sulandırıldı ve flask başına $1,5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde T300 flaslara ekim yapıldı ve %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde inkübe edildi. Hücreler %50-60 yüzey kaplamasına ulaştıktan sonra hücrelerin üzerinde bulunan Nutristem besiyeri uzaklaştırılarak flaslklar PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine eksozom besiyeri (DMEM F12+%1 penisilin/streptomisin) eklendi ve 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kültür süpernatantları 50 ml falkon tüpler içerisinde toplandı. Süpernatantlar 0.22 µm çapında enjektör ucu filtreden geçirildi ve santrifüj edildi. Eksozom eldesi için takip edilen santrifüj protokolü aşağıdaki gibidir;



Eksozom üretimi hemen yapılacaksa +4°C'de 1 hafta boyunca saklanabilir. Eksozom üretimi hemen yapılmayacaksa -80°C'de muhafaza edilmelidir.

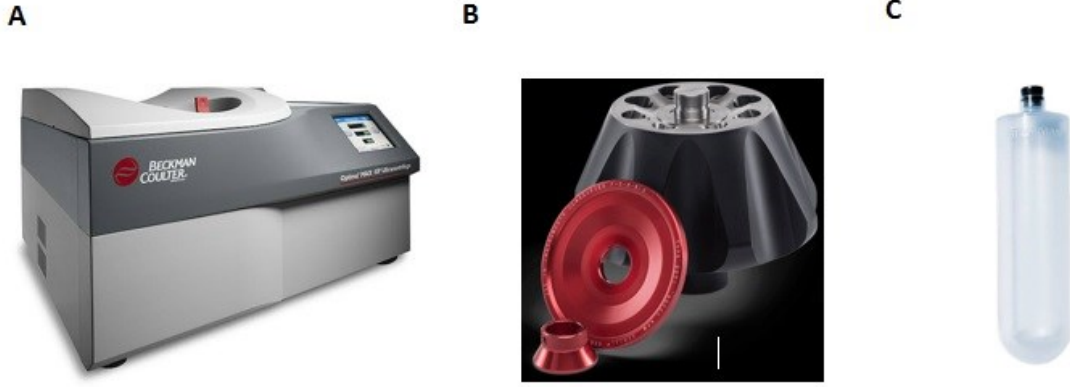


Şekil 3.2 Eksozom üretimi ve saflaştırma süreçlerinin şematik özeti (Biorender.com'da çizildi)

Hücre kültürü süpernatantlarından eksozomlar hazırlanırken, hücrelerin sağlıklı ve eksozom üretim periyodunun sonuna geldiklerinden emin olunması önemlidir. Aksi takdirde, süpernatant eksozom olmayan membran parçaları ile kirlenir. İlk adımda, artan hızlarda ardışık santrifüjler yaparak büyük ölü hücreleri ve büyük hücre döküntülerini ortadan kaldırmak amaçlanmıştır. Bu adımların her birinde, pellet atılır ve süpernatant sonraki adım için kullanılır.

Son süpernatant küçük keseciklerin toplanması için 110,000 x g'de ultrasantrifüjlendi (Beckman Coulter). Pelet, ortamda bulunan proteinleri elimine etmek için büyük miktarda PBS içerisinde yıkandı ve aynı yüksek hızda son bir kez

santrifüjlendi. Eksozom pelleti PBS ile sulandırılarak vortekslendi ve -80°C'de saklandı. Eksozom örneklerinin saflaştırılmasında kullanılan cihaz ve ultrasantrifüj tüpleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Eksozom izolasyonunda kullanılan a) Ultrasantrifüj b) Ultrasantrifüj Rotoru c) Ultrasantrifüj Tüpü

3.2.4.2 Eksozom Örneklerinin Flow Sitometri Yöntemi ile Karakterizasyonu

Elde edilen eksozom örneklerinin karakterizasyonu, ultrasantrifüj öncesi ve sonrası eksozom örneklerin saflığının analizi FACS Calibur cihazı ile flow sitometrik olarak yapılmış olup analizler için CD63, CD9 ve CD81 markerları kullanıldı. CD63 belirteci için System Biosciences Exo-Flow Exosome FACS Kits kullanıldı. Aynı zamanda CD63, CD9 ve CD81 antikorları ayrı ayrı kullanılarak flow sitometrik yöntemle yüzey belirteçleri analiz edildi.

Manuel Flow Sitometri Protokolü

Eksozom örnekleri her flow sitometri tüpüne eşit şekilde dağıtıldı ve tüplerden bir tanesi izotip kontrol tüpü, diğer iki tüp ise istenilen proteine özgü olan CD63 PE/CD81 APC ve CD 9 PE antikorları eklendi. Tüplere antikorlar eklendikten sonra karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 2 ml PBS ile 2200 rpm'da 5 dakika boyunca yıkandı. Yıkama sonrasında flow sitometri ölçümü yapabilmek için 300 µL PBS eklendi. BD FACS Calibur cihazından okutularak Cell Quest Pro yazılımı ile analiz edildi. Okutma esnasında flow sitometri eşiği mümkün olan en düşük değere indirgenerek logaritmik popülasyon arandı. Eksozom popülasyonu kapılanarak 10000 eksozom okutuldu ve floresan sinyali ilgili histogram grafiği üzerinden antikor yüzdesi değerlendirildi.

Exo-flow facs manyetik boncuk hazırlama

1. Boncuk çözeltisini kısaca vorteksleyin ve ardından numune başına 1.5 ml'lik bir tüpe 40 µl boncuk çözeltisini ekleyerek pipetleyin.
2. Örnekleri 2 dakika boyunca manyetik stand üzerinde bekletin.
3. 2 dakika sonra süpernatantı dikkatlice çıkarın. Manyetik boncuk peletlerini bozmadığınızdan emin olun.
4. Örnekleri manyetik standdan çıkarın ve 500 µl boncuk yıkama tamponu ekleyin. Birkaç kez ters çevirin.
5. Örnekleri manyetik sehpa üzerine yerleştirin ve toplam 2 yıkama için 2-4 arasındaki adımları tekrarlayın.
6. Tüm sıvıyı çıkarın, böylece sadece boncuklar tüpün yanında kalır.

Yakalama antikorumun boncuklara bağlanması

7. Tüpleri manyetik standdan çıkarın ve 10 µl biotinlenmiş yakalama antikoru (cd63) ekleyin. Boncukları tüpün dibine taşımak için pipet ucunu kullanarak numuneyi yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
8. Tüpleri 2 saat buz üzerinde bekletin. Hafifçe karıştırmak için her 30 dakikada bir tüpe hafifçe vurun.
9. 200 µl boncuk yıkama tamponu ekleyin ve karıştırmak için hafifçe vurun.
10. Örnekleri 2 dakika boyunca manyetik stand üzerine yerleştirin.
11. 2 dakika sonra süpernatantı dikkatlice çıkarın. Manyetik boncuk peletlerini bozmadığınızdan emin olun.
12. Örnekleri manyetik standdan çıkarın ve 500 µl boncuk yıkama tamponu ekleyin. Birkaç kez ters çevirin.
13. Örnekleri manyetik sehpa üzerine yerleştirin ve toplam 3 yıkama için 10-12 arasındaki adımları tekrarlayın.
14. Örnek başına 400 µl boncuk yıkama tamponu ekleyerek yakalama antikorboncuklarını süspanse edin.

Eksozom yakalama

15. Toplam 500 µl hacim için her bir boncuk örneğine 100 µl konsantre, izole edilmiş eksozom ekleyin.
16. Yakalama için gece boyunca 4°C'de dönen bir raf üzerinde inkübe edin.
17. Örnekleri 2 dakika boyunca manyetik stand üzerine yerleştirin.
18. 2 dakika sonra süpernatantı dikkatlice çıkarın. Manyetik boncuk peletlerini bozmadığınızdan emin olun.
19. Örnekleri manyetik standdan çıkarın ve 500 µl boncuk yıkama tamponu ekleyin. 2-3 kez ters çevirin; vorteks yapmayın. karıştırmak için tüpleri hafifçe vurun.
20. Örnekleri manyetik sehpa üzerine yerleştirin ve toplam 2 yıkama için 3-5 arasındaki adımları tekrarlayın.
21. Numune başına 250 µl nihai hacim için 240 µl exosome-fitc tamponu ve 10 µl exo-fitc exosome ekleyin.
22. Tüpleri 2 saat buz üzerinde bekletin. Hafifçe karıştırmak için her 30 dakikada bir tüpe hafifçe vurun.
23. Örnekleri 2 dakika boyunca manyetik stand üzerine yerleştirin.
24. 2 dakika sonra süpernatantı dikkatlice çıkarın. Manyetik boncuk peletlerini bozmadığınızdan emin olun.
25. Örnekleri manyetik standdan çıkarın ve 500 µl boncuk yıkama tamponu ekleyin. Birkaç kez ters çevirin.

3.2.4.3 Eksozom Örneklerinin BCA ile Miktarlarının Tayini

Eksozom preparatında bulunan toplam protein miktarının ölçülmesi, hücreler tarafından salgılanan eksozomların miktarı hakkında bir fikir vermektedir. Hücre kültür süpernatantlarının üretimi için kullanılan serum uygun şekilde temizlenirse ve deney dikkatli bir şekilde gerçekleştirirse, protein konsantrasyonunun nicelendirme için güvenilir ve tekrarlanabilir bir yaklaşım olduğu kanıtlanmıştır. Üretilen eksozomların miktarı hücre tipine göre değişir. Protein konsantrasyonu Thermo Pierce BCA Protein Assay Kit ile ölçülmüştür. Bikinkoninik testinin prensibi, alkalın şartlar altında Cu^{2+} 'nın Cu^{1+} 'a indirgenmesi ile Cu^{2+} protein kompleksi

oluşumuna dayanır. 562 nm'de absorbans kaydedilir ve protein konsantrasyonu standart bir eğri ile karşılaştırılarak belirlenir.

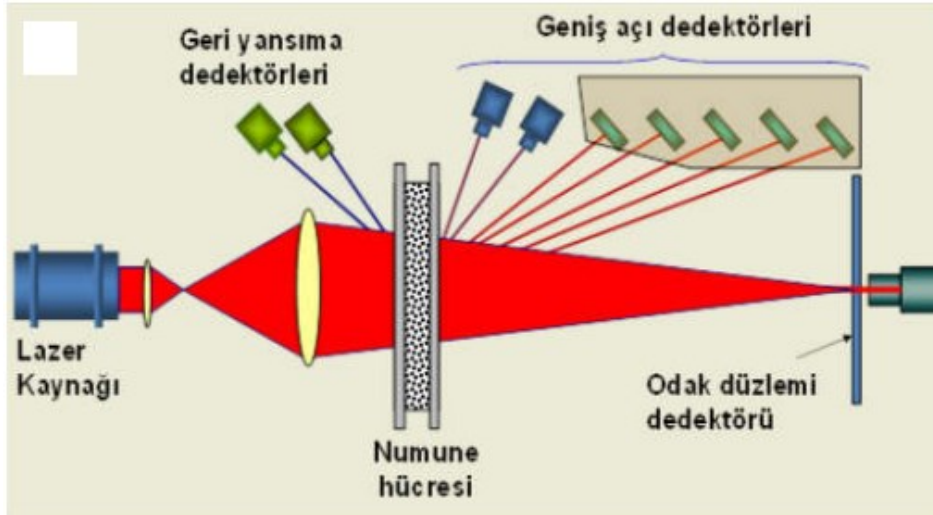
Tablo 3.4 BCA kit prosedürüne göre working solüsyonunun hazırlanması

Working Solution Hazırlanması	Pierce BCA Protein Assay Reagent A	50 birim
	Pierce BCA Protein Assay Reagent B	1 birim

- Protein standartları hazırlandı (0.5 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg ve 30 µg).
- Her kuyuya hazırlanan standartlardan 25 µl eklendi.
- Eksozom örneklerinin olduğu solüsyondan 25 µl örnek kuyusuna eklendi. Kontrollü çalışmak için eksozom örnekleri hem saf hem de 1:10 oranında sulandırılarak çalışıldı.
- Working Solution 50:1 oranında hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalarda her bir kuyuya 200 µl olacak şekilde eklendi.
- 37 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra 562 nm dalga boyunda Spectramax marka spektrofotometrede okutuldu.

3.2.4.4 Eksozom örneklerinin boyut analizlerinin yapılması

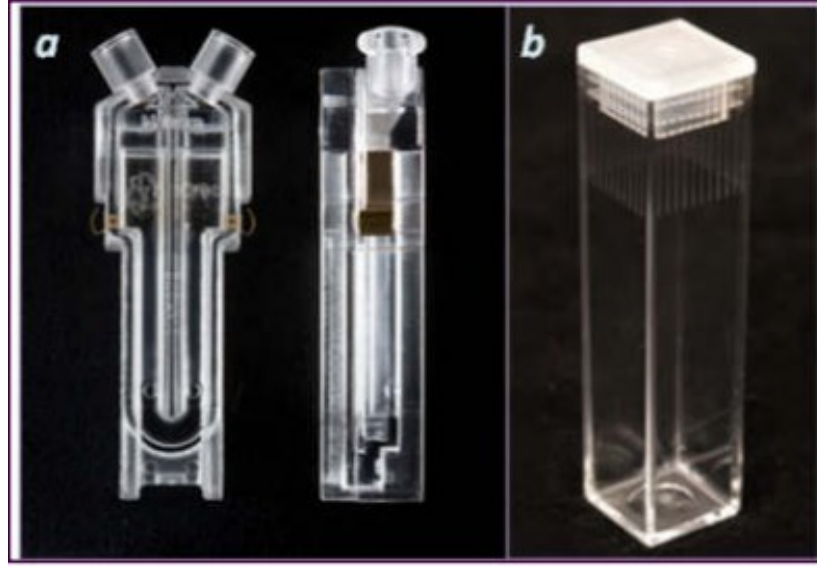
Elde edilen eksozom örneklerinin boyut analizleri iki farklı yöntem ile analiz edildi. Eksozom boyutunun ölçümü için Zetasizer NanoZS 90 ve Nanosight NS300 cihazları kullanıldı. Zeta boyut analizinde cihazın temel prensibi örnek üzerine kırmızı ve mavi lazer ışığı gönderilmesidir. Örnek üzerinden yansıyan ışıma yapan lazer ışığı cihazın dedektörleri aracılığıyla ölçülür. Örnek içerisinde parçacık boyut dağılımını ölçmek için saçılan ışığın açısı ve şiddeti kullanılır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Lazer saçınım boyut analiz cihazının çalışma prensibi

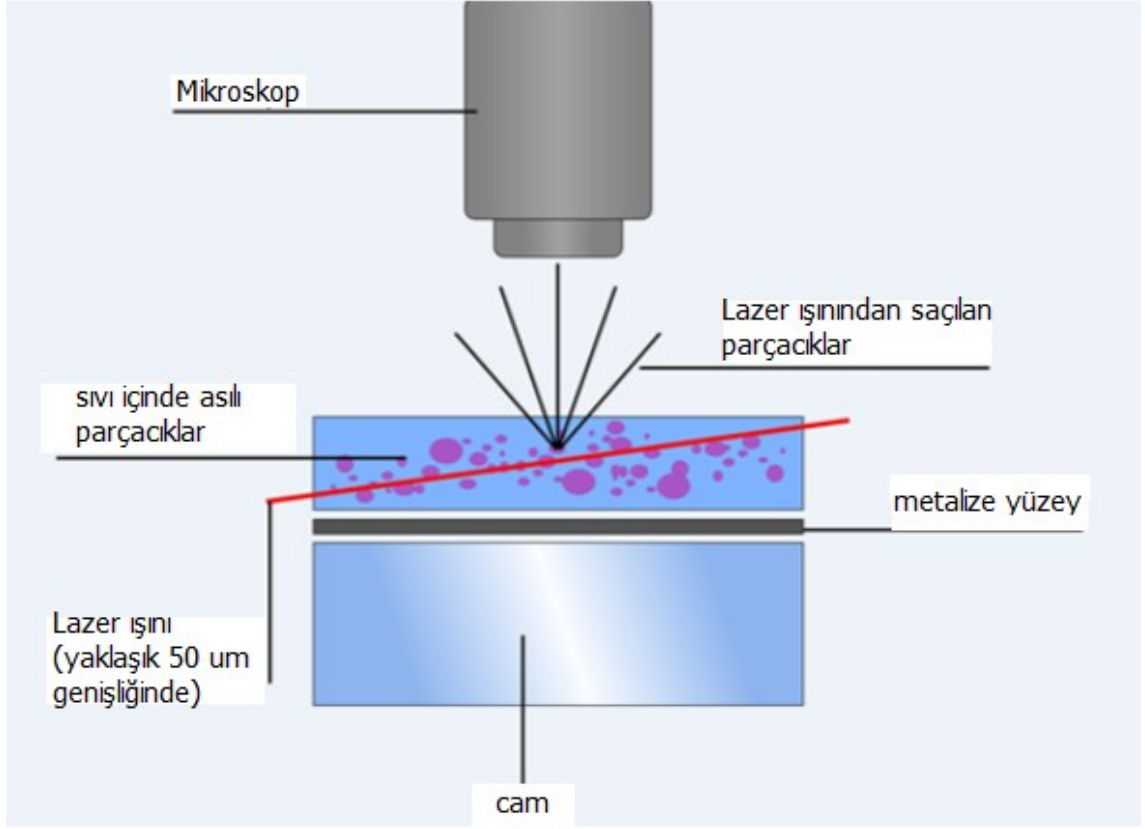
Örnek içerisinde geçen lazerin saçılma açısı örneklerin parçacık boyutlarını belirler. Örnek içinden saçılan açının logaritmik olarak artması parçacık boyutunun düşük olmasına bağlıdır. Lazer ışığının şiddeti ne kadar yüksek ve saçılma açıları düşük ise parçacık boyutu o kadar büyüktür [315].

Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların Zetasizer NanoZS 90 cihazında boyut analizleri için stok olarak hazırlanan 1 ml PBS içerisindeki eksozom örneğinden 5 µl alınarak 995 µl distile su ile seyreltildi ve 3 kez ölçüldü. Ölçümler için cihazın özel kuvvetleri kullanıldı. (Şekil 3.5). Ölçümlerin ortalaması alındı ve grafik oluşturuldu.



Şekil 3.5 a) Zeta potansiyel ölçüm küveti b) Parçacık boyutu ölçüm küveti

Nanopartikül İzleme Analiz (NTA) Cihazı, örnek içerisinde bulunan bir çok farklı partikülü aynı anda izleyerek ve kaydederek partikül ve boyut analizi yapmaktadır. Cihaz toplamda 3 adet önemli parçadan oluşmaktadır; kamera, şırınga pompası ve verilerin analizini yapan bilgisayar sistemi. Cihazın çalışma prensibi, sıvı solüsyon içeriğinde bulunan nanoboyuttaki parçacıkların boyut dağılımı ölçmek için hem ışık saçılımı hem de Brownian hareketini kullanmasıdır (Şekil 3.6). Numune tipine bağlı olarak 0,01- 1 μm çapındaki nanoboyuttaki parçacıkların boyut dağılımını ve konsantrasyonunu ölçebilmektedir. Cihaz yardımı ile, hücre dışı vesiküller, ilaç salınımı, nanoteknoloji, lipozomlar, protein agregasyonu, kozmetik ve gıda ürünleri gibi alanlarda kullanılan malzemelerle çalışma imkanı sunulmaktadır [316].



Şekil 3.6 Nanosight NS300 çalışma prensibi, Üretici Firma [317]

Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların boyut analizlerinin yapılabilmesi için stok olarak hazırlanan ve PBS ile sulandırılan eksozomlar, 1:100 oranında seyreltilerek enjektör yardımı ile cihaza yüklendi. Okuma sonuçları yazılım programı aracılığı ile analiz edildi.

3.2.4.5 Eksozom örneklerinin SEM analizlerinin yapılması

Eksozomların morfolojik analizlerini ve boyut ölçümlerini yapabilmek için SEM analizi yapıldı. İzole edilen eksozomlar %2 gluteraldehit çözeltisi ile lam üzerinde fikse edildi ve artan alkol serisinden (%40, %60, %80, %96-98) geçirildi. Alkol buharlaştıktan sonra

lamalar oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek kurutuldu. Fikse edilen örnek altın-palladyum ile kaplandı ve SEM-ESEM-FEG (Low Vac) cihazı ile analizleri yapıldı.

3.2.5 Deneylerde Kullanılacak Formülasyonların Hazırlanması

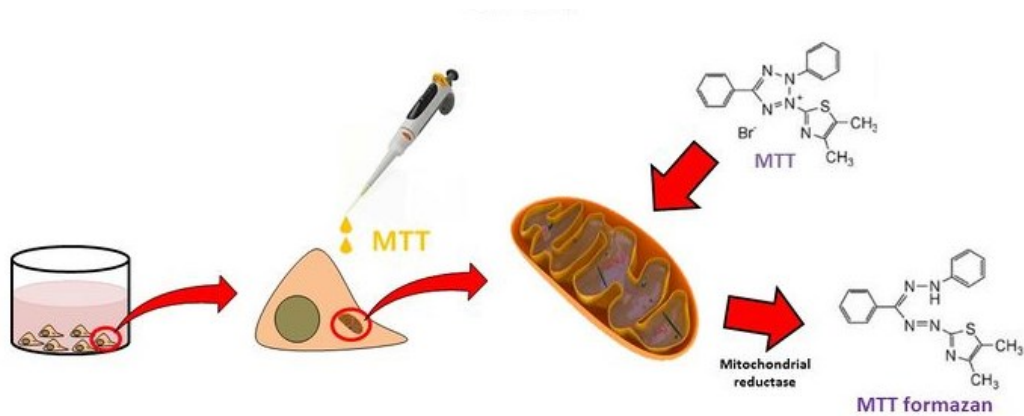
Salisilik asit kristali Tekkim Firmasından (Bursa, TÜRKİYE) satın alındı ve stok çözeltisi olarak 40 mM konsantrasyonda dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. *In vitro* analiz için tüm salisilik asit konsantrasyonları % 0.1 DMSO, %1

penisilin/streptomisin ve %10 Fetal Bovine Serum içeren RPMI 1640 ortamında hazırlandı. Aleo-emodin (ABCAM) 2000 µg stok solüsyonu DMSO içerisinde hazırlandı ve deneylerde çalışılan konsantrasyonlar % 0.1 DMSO, %1 penisilin/streptomisin ve %10 Fetal Bovine Serum içeren RPMI 1640 ortamında hazırlandı. Tüm deneyler için kontrol besiyeri olarak % 0.1 DMSO içeren RPMI 1640 besiyeri kullanıldı.

3.2.6 Eksozom, Salisilik Asit ve Aleo-Emodin Formülasyonlarının Farklı

Hücre Hatları Üzerindeki Toksik Etkisinin *in vitro* Olarak Belirlenmesi

Hücre hatları üzerindeki sitotoksik deneyler MTT deneyi ile yapıldı. MTT, hücre canlılığının, hücre çoğalmasının ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır. Bu kolorimetrik metod, sarı bir tetrazolyum tuzunun (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Canlı hücrelerde formazan kristallerinin oluşum mekanizması

Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri içerir. Çözünmeyen formazan kristalleri, bir çözündürme çözeltisi kullanılarak çözülür ve elde edilen renkli çözelti, 500-600 nm absorban ölçülerek nicelendirilir. Çözelti ne kadar koyu olursa canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı o kadar fazla olur. Deneylerde kullanılacak eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin maddelerinin sitotoksik etkisi L929, J774 ve Vero hücre hatları üzerinde incelenmiştir. Maddelerin hücre hatları üzerinde çalışılan dozları Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

Tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyeri içerisinde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücreler 37°C'de % 5 CO₂ içeren etüvde 12-16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler üzerine farklı konsantrasyonlarda eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT çözeltisinden tüm kuyucuklara 10 µl eklenerek 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için 100 µl DMSO eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildikten sonra 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Deney sonuçlarında kontrol grubunda elde edilen sonuç % 100 canlılık olarak kabul edildi ve tüm değerler kontrol grubuna göre kıyaslandı.

Tablo 3.5 Hücre sitotoksosite analizleri yapılan maddelerin konsantrasyonları

Eksozom	25 µg	50 µg	75 µg	100 µg	x	x
Salisilik asit	0,1mM	0,4 mM	1 mM	4 mM	10 mM	40 mM
Aleoemodin	25µg/m 1	50µg/m 1	75µg/m 1	100µg/m 1	150µg/m 1	200µg/m 1

3.2.7 Formülasyonların *L. Major* Parazitlerinin Metabolik Aktiviteleri Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

L. major kültüründen sayım yapıldıktan sonra elde edilen sonuca göre 20.000 parazit/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekim yapıldı. 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT çözeltisinden tüm kuyucuklara 10 µl eklenerek parazitler 27°C'de 4 saat inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için 100 µl DMSO eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildikten sonra 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Deney sonuçlarında kontrol grubunda elde edilen sonuç % 100 canlılık olarak kabul edildi ve tüm değerler kontrol grubuna göre kıyaslandı.

3.2.8 Formülasyonların Makrofaj Hücrelerinde Nitrik Oksit Üretimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Enfekte makrofajlar elde etmek için, kültürdeki *L. major* promastigotları hücre başına 10 promastigot (10⁵ parazit) olacak şekilde bir gün öncesinden ekilen J774

hücreleri üzerine ekildi. Daha sonra plakalar, %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Plakalar, fagosite edilmemiş promastigotları uzaklaştırmak için RPMI ortamı ile yıkandı ve enfekte olmuş makrofajlara formülasyonlar eklendi. 24 saatlik inkübasyondan sonra, fenol kırmızısı içermeyen RPMI ortamı ile hazırlanan formülasyonlardan süpernatantlar alındı ve nitrik oksit analizi yapıldı.

Nitrik Oksit ölçümü Griess Reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Standart grafiği elde etmek için standart madde olarak Sodyum Nitrit kullanıldı. Bunun için 10 ml distile su içinde 0,345 g Sodyum Nitrit çözülerek 500 µM stok çözelti hazırlanmış oldu. Elde edilen stok çözeltiden 0-100 µM (0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µM) aralığında standartlar hazırlandı. Tripsinizasyon ile flasklardan kaldırılan J774 hücreleri kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekildi. Bunun için %10 FBS içeren fenol redsiz RPMI 1640 besiyeri kullanıldı. Hücrelerin inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra, hücrelerin üzerindeki besi yeri atılarak formülasyonların olduğu besiyeri eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından standartlardan ve NO ölçümü yapılacak kültür ortamından 50 µl alındı ve 96 kuyucuklu plaklara eklendi. Bu örneklerin üzerine 50 µl Griess reaktifi eklenerek oda sıcaklığında, karanlıkta 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. 10 dakika sonra spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okundu ve hesaplamalar yapıldı.

Yapılan tüm deneyler sonucunda salisilik asit ve aleo-emodin dozlarının en iyi sonuç veren dozları ile eksozomun en iyi dozu seçilerek kombin formülasyonlar hazırlandı.

Tablo 3.6 Eksozom kombin dozlarının hazırlanması

Eksozom-Aleo emodin Kombin Dozları	Eksozom-Salisilik Asit Kombin Dozları
50 µg Eksozom + 25 µg/ml	50 µg Eksozom + 0,4 mM
50 µg Eksozom + 50 µg/ml	50 µg Eksozom + 1 mM
50 µg Eksozom + 75 µg/ml	50 µg Eksozom + 4 mM
50 µg Eksozom + 100 µg/ml	50 µg Eksozom + 10 mM

3.2.9 Formülasyonların *L. Major* Parazit Sayıları Üzerine Zamana Bağlı Etkisinin Belirlenmesi

Eksozom, salisilik asit, aleo-emodin ve eksozomların bu maddelerle kombin olarak hazırlanan dozlarının *L. major* parazitlerinin sayısına etkisini belirlemek için promastigotlar 1×10^6 parazit/ml olacak şekilde % 10 FBS içeren RPMI 1640 (%1 Penisilin/streptomisin, % 0,1 DMSO) içerisinde hazırlandı ve ependorflara ekildi. Parazit sayımı 24, 48, 72 ve 96. saatlerde thoma lam kullanılarak yapıldı. Parazitlerin tespiti için %4 formaldehit kullanıldı. Parazit ve formaldehit solüsyonu 1:10 oranında birleştirildi ve parazitlerin rahatça sayılabilmesi için 3-4 dakika bekletildi. Parazit büyümesinin inhibisyonu mikroskop altında incelendi.

3.2.10 Eksozom, Salisilik Asit ve Aleo-Emodin Formülasyonlarının Anti-Leishmanial Etkinliğinin Belirlenmesi

3.2.10.1 Formülasyonların Anti-Amastigot Etkisinin Belirlenmesi

Eksozom ve eksozomların salisilik asit ve aleo-emodin ile kombin olarak hazırlanan dozlarının anti-promastigot etkisini belirlemek için J774 hücreleri, kuyu başına 3×10^4 olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekildi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, kuyu başına 3×10^5 parazit ekildi ve makrofajların parazitler tarafından enfekte olması beklendiği için 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Daha sonra 50 µg eksozom, salisilik asit (0.4, 1, 4, 10mM) ve aleo-emodin (25, 50, 75 ve 100 µg/ml) formülasyonları enfekte makrofajlara kombinasyon halinde uygulandı ve 37°C'de 3 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ortam aynı formülasyonlarla değiştirildi ve 27°C'ye yerleştirildi ve 3 gün daha inkübe edildi. Ortamdaki promastigotların sayısı thoma lamı ile sayıldı ve analiz edildi.

3.2.10.2 Formülasyonların Enfeksiyon İndeksi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Eksozom ve eksozomların salisilik asit ve aleo-emodin ile kombin olarak hazırlanan dozlarının *L. major* promastigotları ile enfekte edilmiş makrofaj hücreleri üzerindeki etkisini incelemek için, 2 ml RPMI 1640 ortamı ile 6 kuyucuklu plakaların her bir oyuğuna 3×10^4 J774 makrofaj hücresi ekildi. 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra, her kuyuya 3×10^5 *L. major* promastigot ekildi ve makrofajları enfekte etmek için 37°C'de 3-4 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyular PBS ile yıkandı ve formülasyonları içeren ortam (2 ml) ilave edildi. Daha sonra plakalar

%5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 3 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra formülasyonlar çıkarıldı, kuyular PBS ile yıkandı ve enfekte olmuş makrofajlar 1 ml Metanol eklenerek 10 dakika boyunca fikse edildi. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara 750 µl GIEMSA boyası ilave edildi ve 2 dakika bekletildi. Daha sonra kuyucuklar 2-3 kez musluk suyu ile yıkandı ve kurutulduktan sonra immersiyon yağı damlatıldı ve mikroskop altında sayılarak formülasyonların parazitlerin makrofaj üzerindeki enfektivitesine etkisi belirlendi. Enfeksiyon indeksinin belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanıldı:

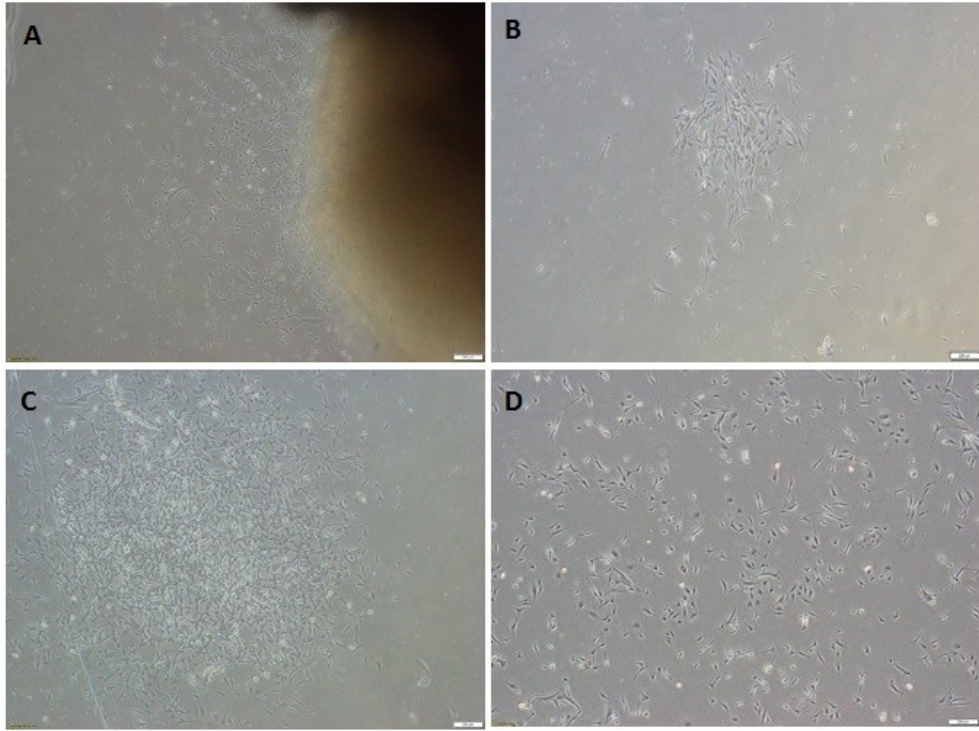
$$\text{Enfeksiyon indeksi} = (\text{Enfekte makrofaj sayısı} / \text{Toplam makrofaj sayısı}) \times \text{Makrofaj başına düşen toplam amastigot sayısı} \quad (3.5)$$

3.2.11 Eksozom, Salisilik Asit ve Aleo-Emodin Formülasyonlarının *in vitro* Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

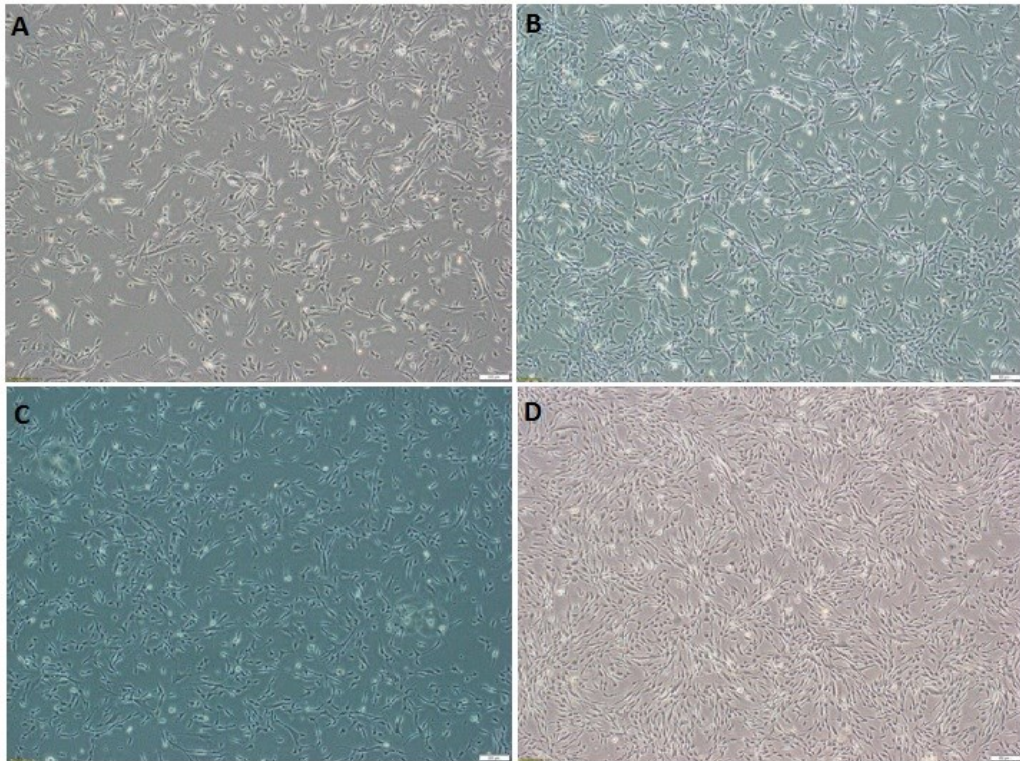
Eksozom ve eksozomun bu maddelerle kombin olarak hazırlanan dozlarının L929 hücre hattında yara iyileşmesi üzerine etkisinin belirlenmesi için 6 kuyulu plakalara kuyu başı 300.000 hücre olacak şekilde % 10 FBS ve % 1 Penisilin/streptomisin içeren DMEM F12 ile ekildi. 12-16 saat inkübasyona bırakılan hücreler 1000 µl'lik steril pipet ucu yardımıyla çizilerek yara modeli oluşturuldu ve eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin formülasyonları eklendi. Yara oluşturulan saat "0. Saat" olarak kabul edildi. Daha sonra 12, 24 ve 48. saatlerde düzenli olarak OLYMPUS DEE-3 marka fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekildi ve yara mesafelerinin ölçümleri yapıldı. 0. saatteki yara mesafesi %100 kabul edildi ve diğer saatler bu orana göre hesaplanarak karşılaştırıldı.

4.1 Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Görüntüleri

Mezenkimal kök hücre izolasyonu için sezeryan doğum yapan bağışçılardan yazılı onam alınan göbek kordonları kullanıldı. Kordondan küçük parçalar kesildi ve plakalara hücre göçü için eksplant kültürü yöntemi kullanıldı. Besiyerinin 3-4 günde bir düzenli olarak değiştirilmesi ile kültürün devamlılığı sağlanmıştır. Hücre göçü, dokudan plakalara 5-6 gün içinde gerçekleşti (Şekil 1A). 8-12 gün içinde, yapışan hücreler koloniler oluşturdu (Şekil 1B, C) ve pasajlandı (Şekil 1D). Hücreler pasajlandıktan sonra homojen bir dağılım göstermiş ve flaskların her bölgesine eşit dağılması sağlanmıştır (Şekil 2A, B, C). Hücreler %80-90 doluluğa ulaştığında, düzenli olarak pasajlandılar ve pasaj 3 seviyesinde donduruldular (Şekil 2D).



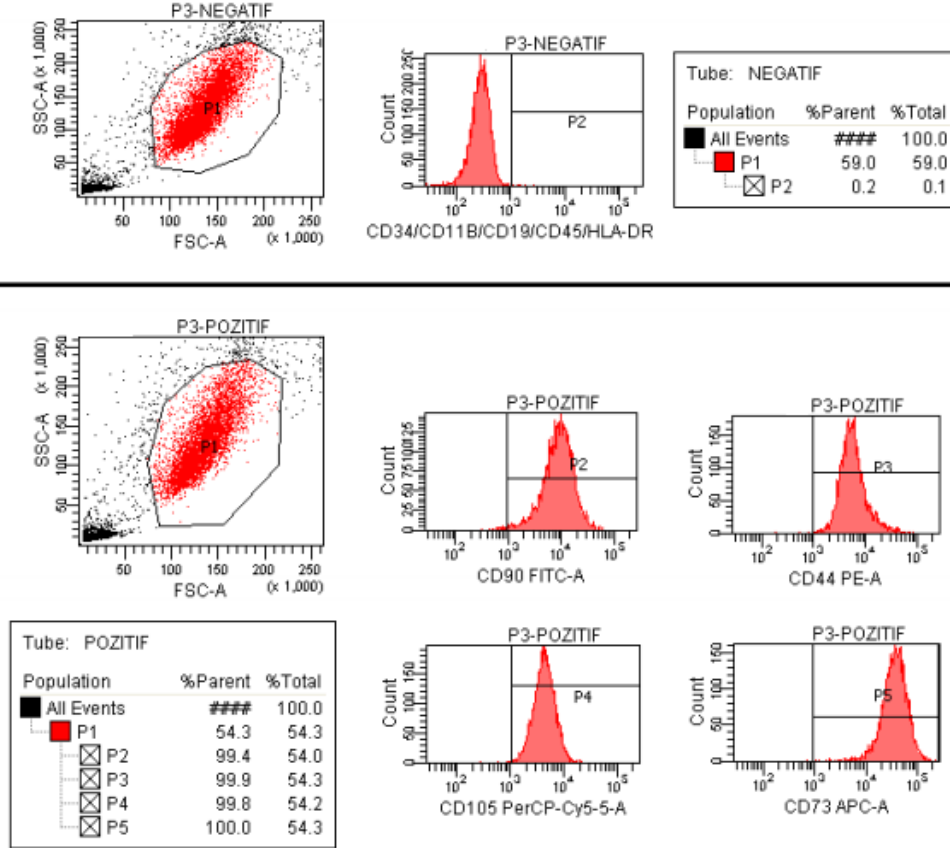
Şekil 4.1 Wharton Jeli kökenli mezenkimal kök hücrelerin morfolojik görüntüsü A) P0/5.gün B) P0/8.gün C) P0/11.gün D) P1/2.gün



Şekil 4.2 Wharton Jeli kökenli mezenkimal kök hücrelerin morfolojik görüntüsü A) P1/3.gün B) P2/4.gün C) P3/3.gün D) P3/Confluent

4.2 Göbek Kordonundan İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

4.2.1 Göbek Kordonundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometrik Analizleri

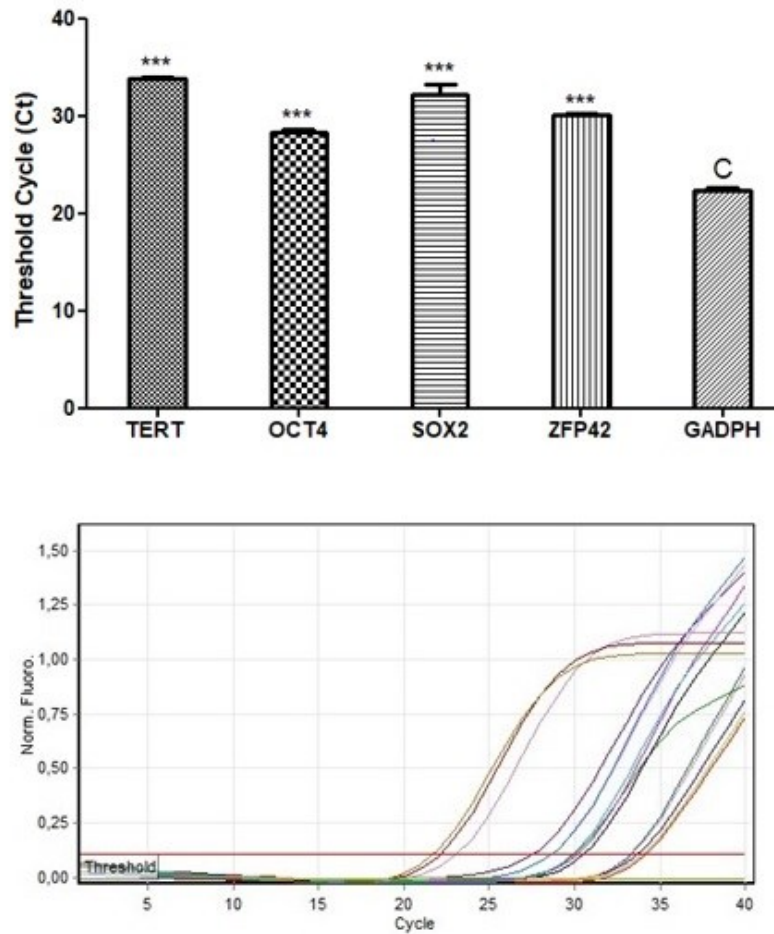


Şekil 4.3 Göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri

Mezenkimal kök hücre özelliklerini karakterize etmek için flow sitometrik analizler yapıldı. CD90, CD73, CD105, CD44 gibi kök hücrelerin karakteristik yüzey belirteçleri ve CD45, CD14, CD34, CD19 ve HLA-DR gibi negatif belirteçlerin karışımı analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre CD90+, CD73+, CD105+, CD44+ yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri sırasıyla % 99.87 ± 0.2338, % 99.93 ± 0.1033, %99.73 ± 0.3670, % 99.98 ± 0.04082 olarak belirlendi. Negatif yüzey belirteçleri kokteyl olarak çalışıldı ve sonuç 0.1333 ± 0.08165 olarak bulunmuştur (Şekil 4.3).

4.2.2 Gen ekspresyonu analizleri

CT değeri, nispi gen ekspresyon döngüsü eşiği olarak ölçülmüştür. Kantitatif PCR sonuçlarını raporlamak için ΔCt yöntemi kullanıldı. GAPDH kontrol olarak kullanıldı ve tüm genlerin ekspresyonlarının sonuçları kontrol ile karşılaştırıldı. Gen ekspresyonu sonuçları 3 tekrar halinde ölçülmüştür. Sonuçlara göre, tüm spesifik genler kontrol ile karşılaştırıldığında, incelenen tüm genlerin ifadelerinin kontrolden yüksek olduğu tespit edildi. TERT, OCT4, SOX2, ZFP42 ve GAPDH genlerinin Ct değerlerinin sonuçları sırasıyla 33.94 ± 0.2417 , 28.30 ± 0.6236 , 32.21 ± 1.903 , 30.20 ± 0.2928 ve 22.33 ± 0.7087 olarak belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Göbek kordonundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin pluripotensi genlerinin ekspresyon seviyeleri

4.2.3 Göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin telomeraz enzim aktiviteleri

Telomeraz aktivitesi, üreticinin protokolüne göre TeloTAGGG PCR ELISAPLUS kiti (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak belirlendi. Telomeraz aktivitesi, yarı nicel

bir şekilde 'göreceli telomeraz aktivitesi' (RTA) olarak tanımlandı. (S, T -S0) değeri S0 veya negatif kontrolden 2 kat büyükse numune telomeraz pozitif olarak kabul edildi. Kite önerilen değerlere göre negatif kontrol 0,1'den küçük ve pozitif kontrol 0,3-0,8 aralığında olmalıdır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre negatif kontrol 0,09 ve pozitif kontrol 0,45 olarak belirlendi. Bu verilerle kitin doğru çalıştığı kanıtlanmıştır. RTA düzeyi aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ RTA} = ((S, T - S_0) / S, IS) / PC * 100 \quad (4.1)$$

	450 nm			690 nm			FARK		
	S0	S,T	S,IS	S0	S,T	S,IS	S0	S,T	S,IS
Kontrol	0,0602	1,4631	3,1255	0,0397	0,0364	0,0282	0,0384	0,0390	0,0426
Wi-msc	0,0950	0,1897	2,7010	0,0384	0,0390	0,0426	0,0566	0,1507	2,6584

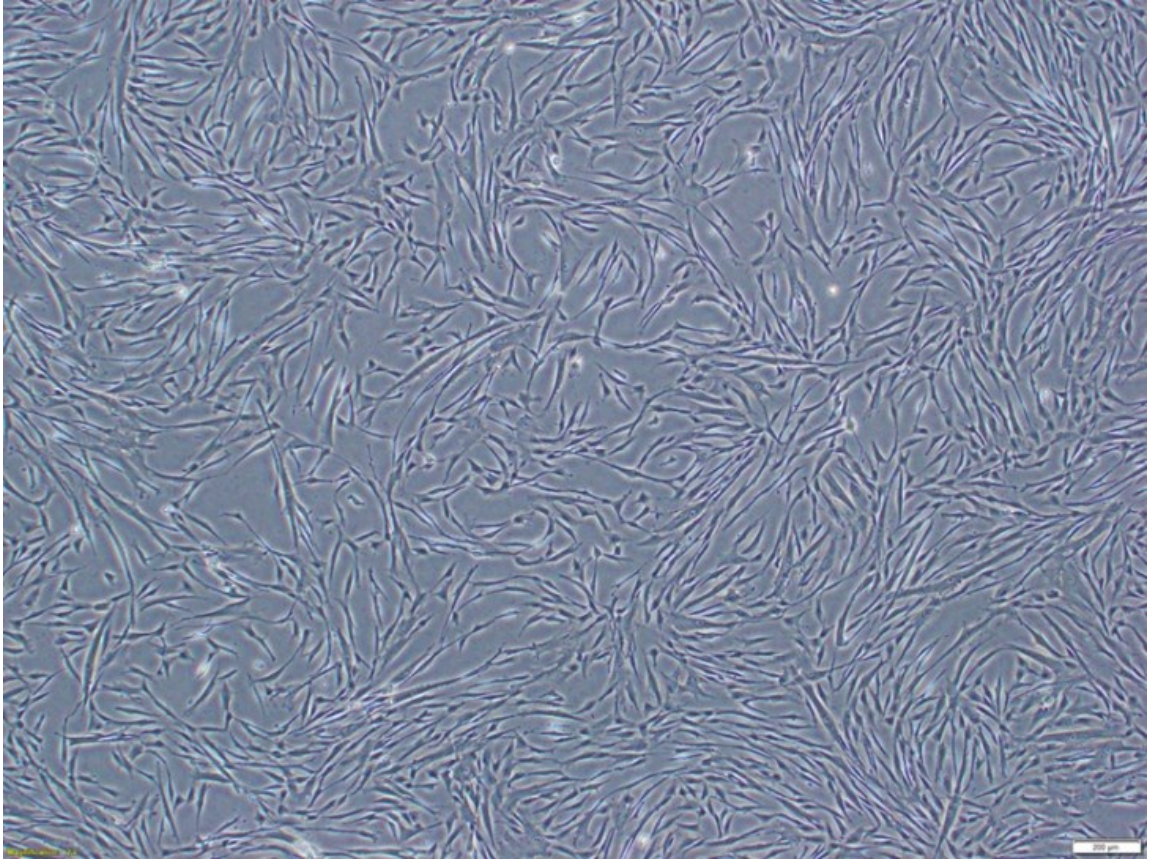
S0 Değerleri	(S,T-S0) Değerleri	(S,T-S0)/S,IS Değerleri	RTA
0,0566	0,0941	0,035397231	7,796603959

Şekil 4.5 Göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin telomeraz enzim aktivitesinin hesaplanması için kullanılan parametreler ve RTA seviyesinin hesaplanması

Elde ettiğimiz sonuçlara göre RTA yüzdesi %7,8 olarak belirlendi.

4.3 Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların karakterizasyonu ve miktar tayinlerinin yapılması

Eksozom eldesi için Nutristem besiyeri ile ekilen hücreler % 50-60 doluluğa geldikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandıktan sonra eksozom besiyeri (%1 penisilin/streptomisin içeren DMEM F12) eklendi. 24-48 saat inkübasyonun ardından hücrelerin morfolojik görüntüleri şekildeki gibidir.



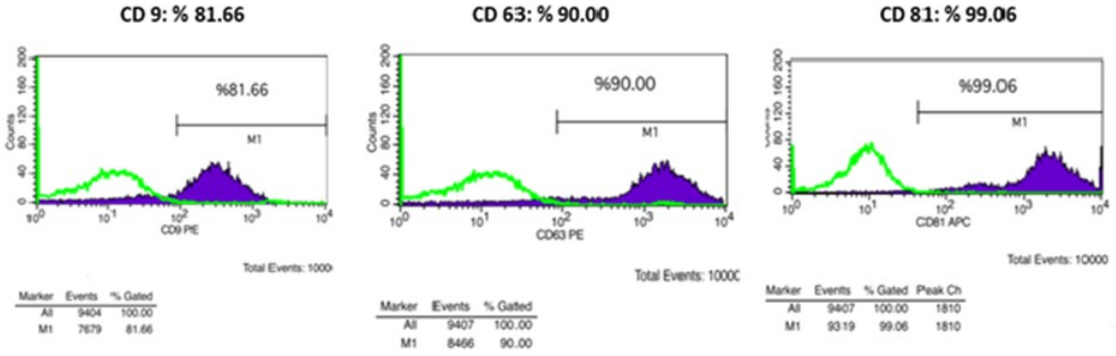
Şekil 4.6 Göbek kordonu kökenli mezenkimal kök hücrelerin serumsuz DMEM F-12 besiyeri içerisindeki mikroskopik görüntüsü

4.3.1 Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların flow sitometrik karakterizasyonu

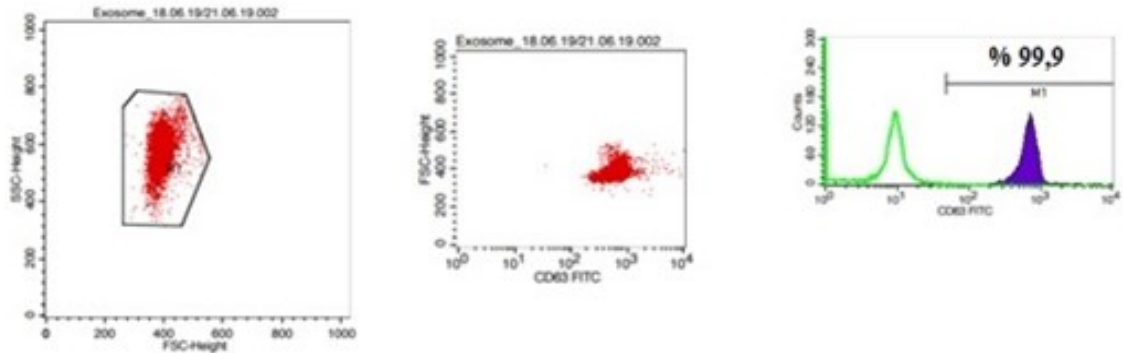
Hücre zarına benzer şekilde, eksozomlar yüzeylerinde spesifik işaretler içerir. Eksozomların karakterizasyonu, flow sitometri yöntemiyle CD9, CD81 ve CD63 gibi yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

Eksozom karakterizasyonu iki farklı yöntemle analiz edildi. Birinci yöntemde CD9, CD63 ve CD81 antikorları kullanılarak akış sitometrik analizi yapıldı. İkinci

yöntemde System Biosciences Exo-Flow Exosome FACS kiti kullanılarak analiz yapıldı ve CD63 yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyesi ölçüldü. Birinci yöntem kullanılarak yapılan analiz sonuçlarına göre eksozom örneklerinin CD9, CD63 ve CD81 yüzey belirteçleri sırasıyla %81,66, %90,00 ve %99,06 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). İkinci yöntemin uygulandığı flow sitometri sonucuna göre CD63 yüzey belirteçlerinin ekspresyon sonucu %99,9 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7 WJ-MKH kökenli eksozomların flow sitometri yöntemi ile karakterizasyon sonuçları



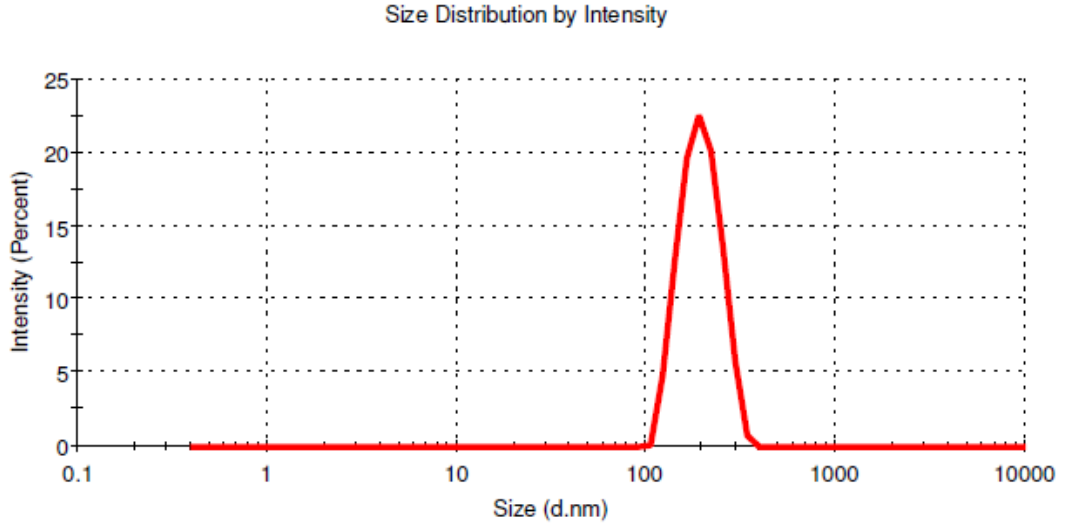
Şekil 4.8 WJ-MKH kökenli eksozomların Exo-Flow Exosome Purification Kiti ile flow sitometrik karakterizasyonu

4.3.2 Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların boyut analizi

Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların karakterizasyonları için boyut ve morfolojik analizleri yapıldı. Eksozomların boyut analizleri Zeta Sizer ve Nanosight NS300 cihazları ile yapıldı. Eksozomların morfolojik olarak karakterizasyonu SEM analizi yapıldı.

4.3.2.1 Zeta Sizer ile boyut analizleri sonuçları

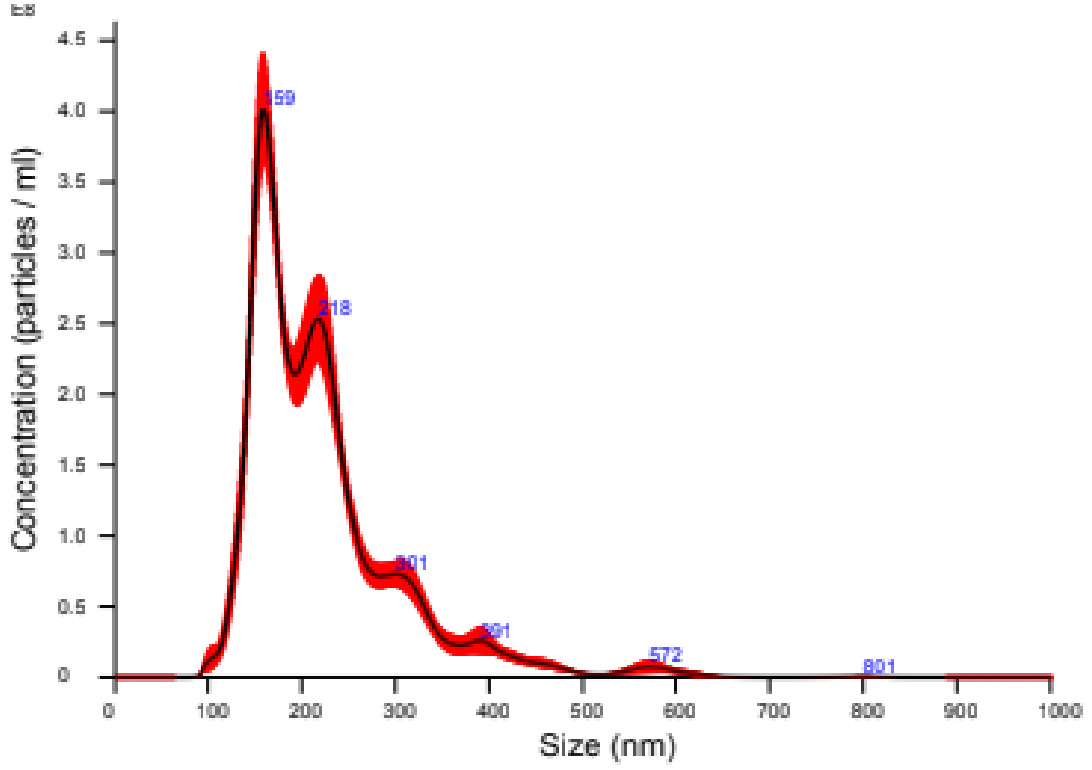
Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların boyut analizi için PBS ile sulandırılmış stok eksozom solüsyonundan 5 µl örnek alınarak 995 µl ile sulandırıldı. Eksozom örneklerinin ortalama boyutları $196.2 \pm 43,04$ nm olarak ölçüldü (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 WJ-MKH'lerden elde edilen eksozomların Zeta Sizer ile boyut analizi sonucu

4.3.2.2 NTA ile boyut analizi sonuçları

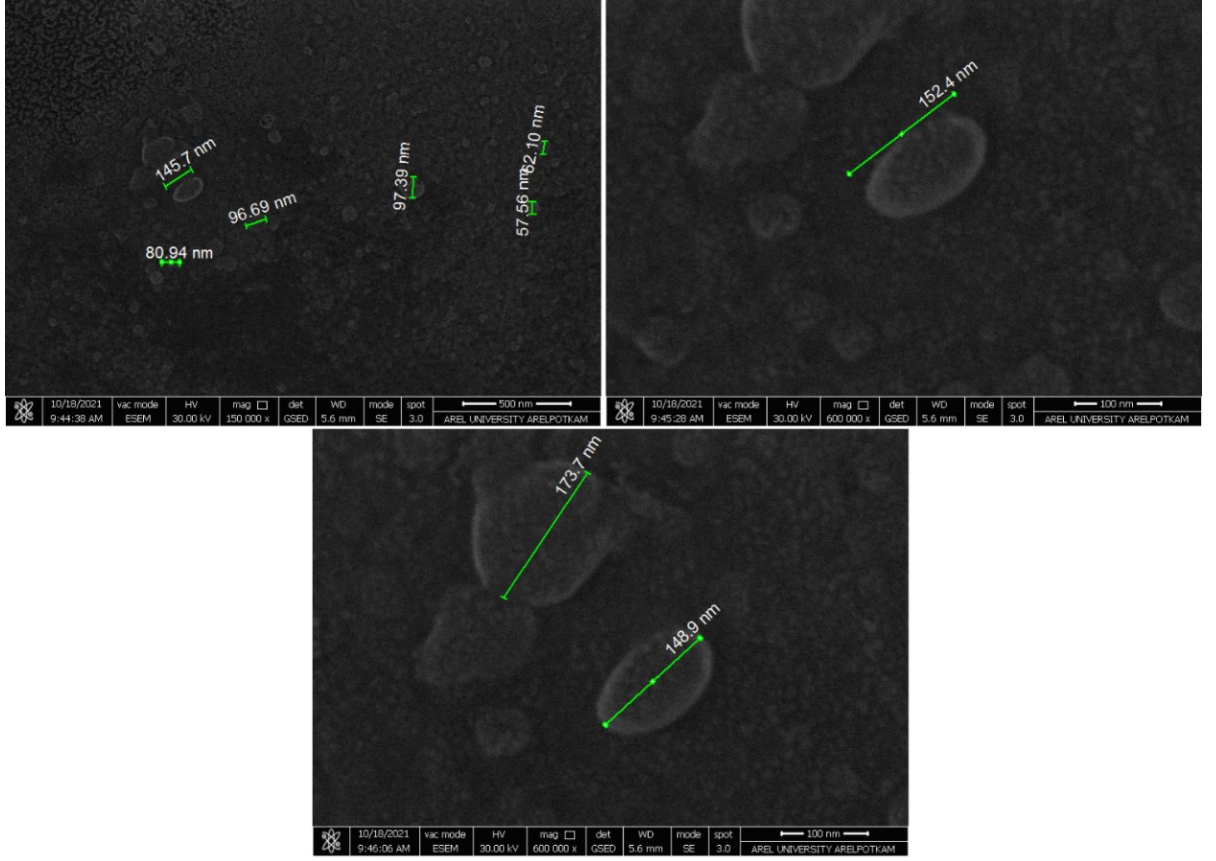
Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların boyut ve partikül analizleri Yeditepe University Extracellular Vesicle and Exosome Reseach Lab (EVER LAB)'da yapıldı. Stok olarak 1 ml PBS içerisinde sulandırılan eksozom örnekleri 1:100 oranında seyreltilerek steril enjektör ile Nanosight NS300 cihazına yüklenerek okutma yapıldı ve sonuçlar analiz edildi. Eksozom örneklerinin ortalama boyutları $158,6 \pm 83,8$ nm olarak ölçüldü (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 WJ-MKH’lerden elde edilen eksozomların Nanosight NS300 ile boyut analizi sonucu

4.3.3 Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların SEM ile karakterizasyonu

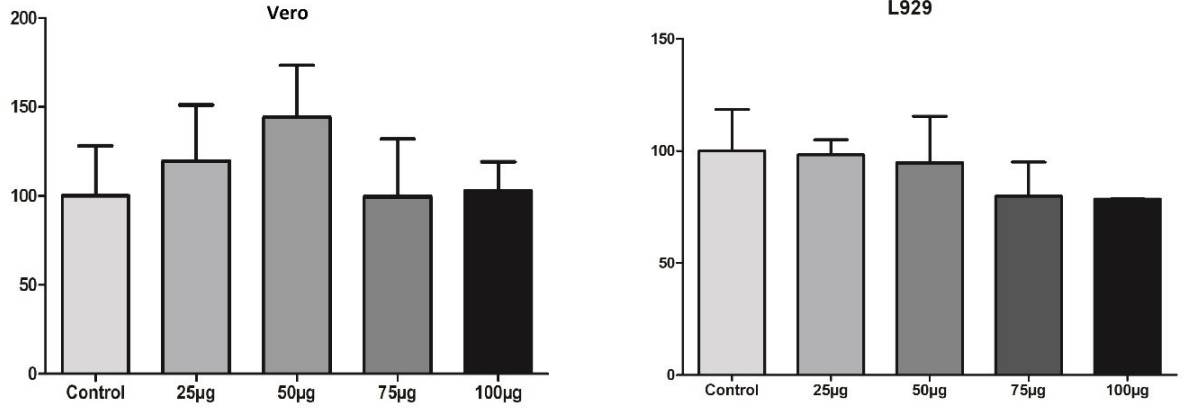
Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların boyut ve morfolojik özelliklerinin tespit edilmesi için SEM analizi yapıldı. Eksozomlar lam üzerine gluteraldehit ile fikse edilerek yükselen alkol serisinden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler altın-palladyum ile kaplanarak SEM analizi yapıldı. Eksozomların morfolojik özelliği olan “cup-shape” SEM analizi ile doğrulanmıştır. Ayrıca, SEM görüntüleme sonrası elde edilen eksozom boyut analizlerinin sonuçları Zeta Sizer ve NTA ile yapılan boyut ölçümlerini de karşılamaktadır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Eksozomların SEM morfolojik analizleri

4.4 Göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların farklı hücre hatları üzerindeki toksik etkisi

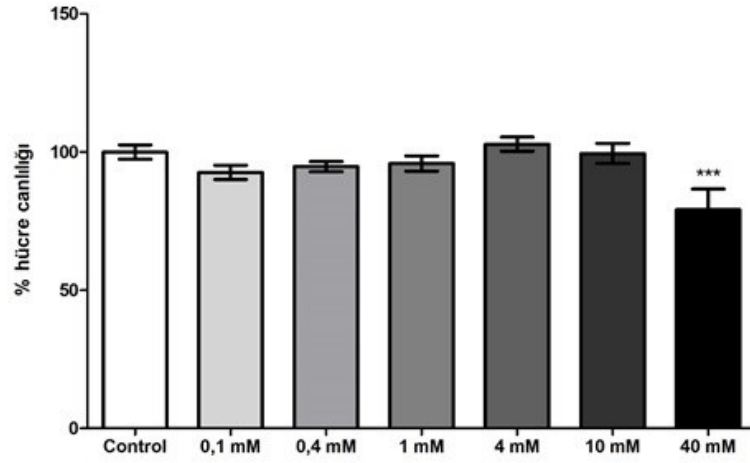
Ekstrasellüler vezikül konsantrasyonlarının Vero ve L929 hücre hatları üzerindeki toksik etkisini belirlemek amacıyla MTT testi kullanıldı. Kontrol değerleri %100 canlı olarak kabul edildi. Eksozom konsantrasyonlarının Vero hücreleri üzerindeki toksik etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında, 50 µg eksozom grubunda artış görülsede bu artış anlamlı bulunmamıştır. Tüm gruplarda kontrol grubuna göre kıyaslama yapıldığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ekstrasellüler vezikül konsantrasyonlarının L929 hücre hattındaki etkisi incelendiğinde; tüm gruplar kontrol grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Eksozom formülasyonlarının hücre hattında belirgin bir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Ekstrasellüler vesikül formülasyonlarının Vero ve L929 hücre hatları üzerindeki toksik etkileri

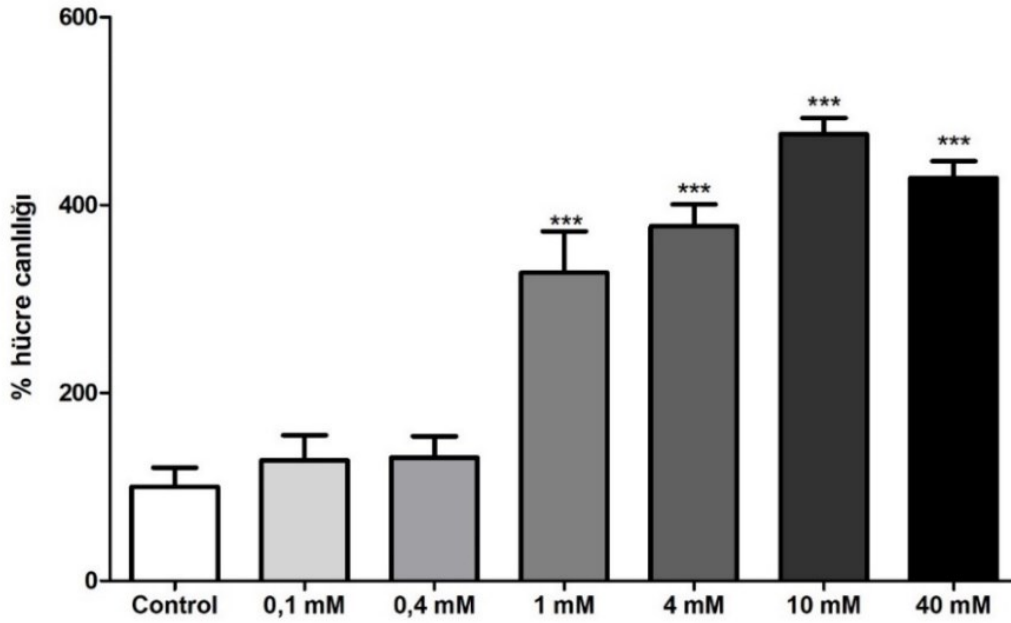
4.5 Salisilik asit konsantrasyonlarının farklı hücre hatları üzerindeki toksik etkisi

Salisilik asit dozlarının L929 ve J774 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla 1×10^5 hücre ekilmiş ve salisilik asit dozlarına maruz bırakılmıştır. Kontrol değerleri % 100 canlılık olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, farklı salisilik asit konsantrasyonlarının L929 hücre hattında canlılık üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında yalnızca 40 mM dozunda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Farklı salisilik asit konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi

Salisilik asitin J774 hücresi üzerindeki etkisi incelendiğinde 1, 4, 10 ve 40 mM salisilik asit dozlarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.14).

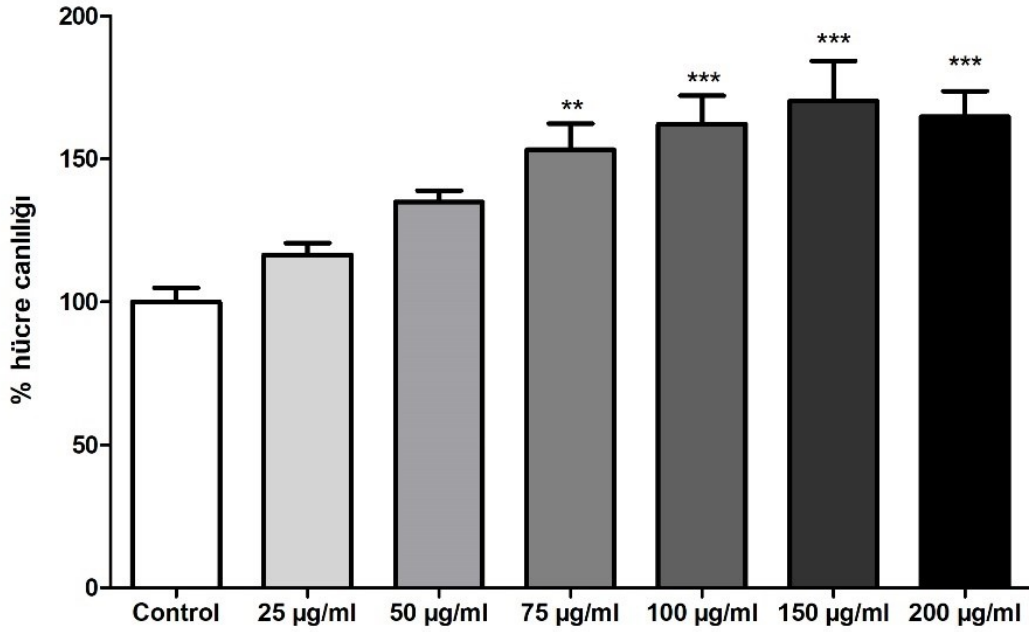


Şekil 4.14 Farklı salisilik asit konsantrasyonlarının J774 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi

4.6 Aleo-emodin konsantrasyonlarının farklı hücre hatları üzerindeki toksik etkisi

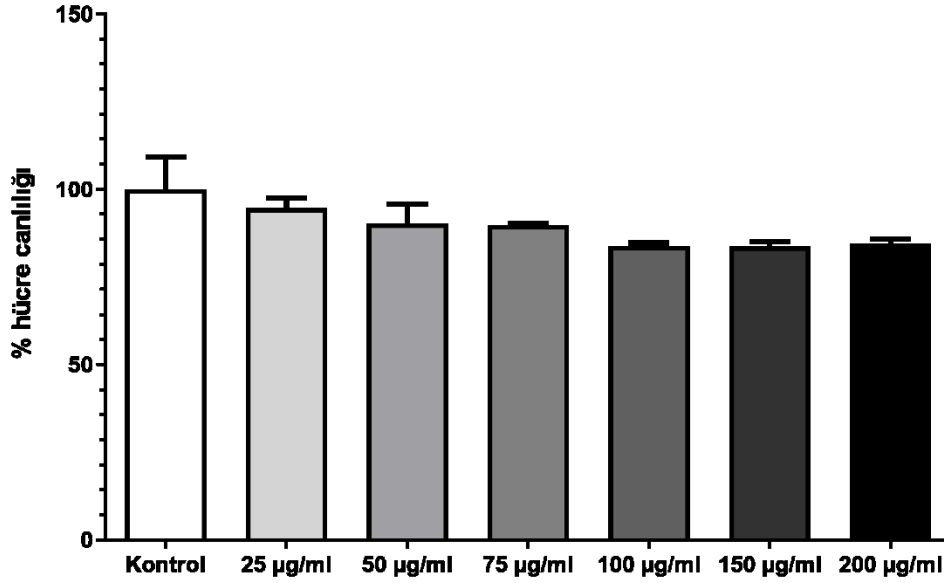
Aleo-emodin'in farklı konsantrasyonlarının L929 ve J774 hücreleri üzerindeki toksik etkisini belirlemek amacıyla MTT canlılık testi yapıldı. Deneylerde kontrol

grubunun sonuçları % 100 canlılık olarak kabul edildi. Elde edilen sonuçlara göre, farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında canlılık üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında düşük dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmazken 75, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.01$, $p<0.001$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi

Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının J774 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında tüm gruplarda anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının J774 hücre hattı üzerindeki toksik etkisi

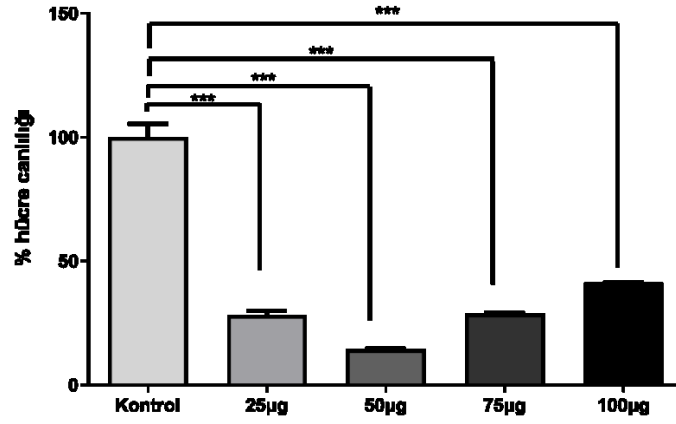
4.7 Formülasyonların *L. major* parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin konsantrasyonlarının *L. major* parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı. 10^5 parazit 96 kuyulu plakalara formülasyonlar ile birlikte ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonlandıktan sonra 10 µl MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. Her kuyuya 100 µl DMSO eklenerek oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi ve 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar % 100 olarak kabul edildi ve analizler yapıldı.

4.7.1 Eksozom konsantrasyonlarının *L. major* parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

5 farklı eksozom konsantrasyonunun *L. major* parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisi analiz edildiğinde ve sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm eksozom gruplarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (***: $p < 0.001$) (Şekil 4.17). 50 µg eksozom dozunda gözlemlenen azalmanın diğer eksozom gruplarından daha

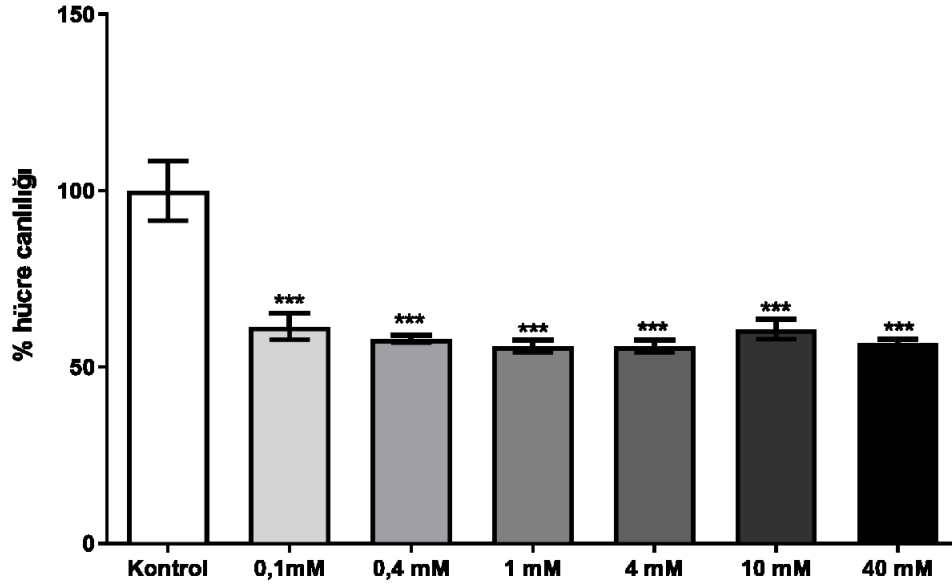
fazla olduğu belirlendi. Elde edilen bu sonuçlar ile, 50 µg eksozom dozunun *L.major* parazitlerinin metabolik aktivitesini azaltma da daha etkili olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.17 Eksozom formülasyonlarının *L. major* üzerindeki metabolik etkisi

4.7.2 Salisilik asit konsantrasyonlarının *L. major* parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

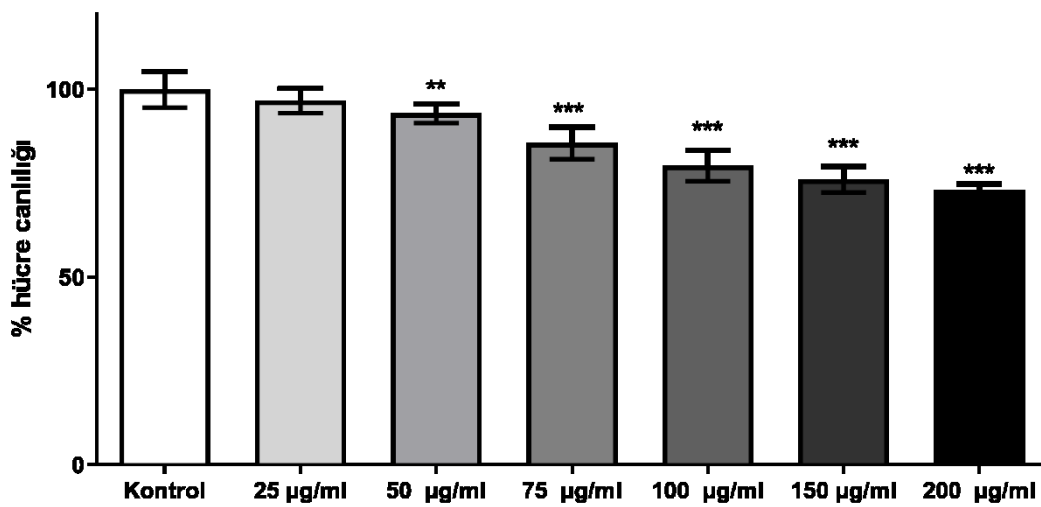
Farklı salisilik asit konsantrasyonlarının *L. major* parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisi analiz edildiğinde ve sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm dozlarda anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Salisilik asit formülasyonlarının *L. major* üzerindeki metabolik etkisi

4.7.3 Aleo-emodin konsantrasyonlarının *L. major* parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının *L. major* parazitlerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisi analiz edildiğinde ve sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında 25 µg/ml aleo-emodin dozunda anlamlı bir değişme olmadığı 50, 75, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Aleo-emodin formülasyonlarının *L. major* üzerindeki metabolik etkisi

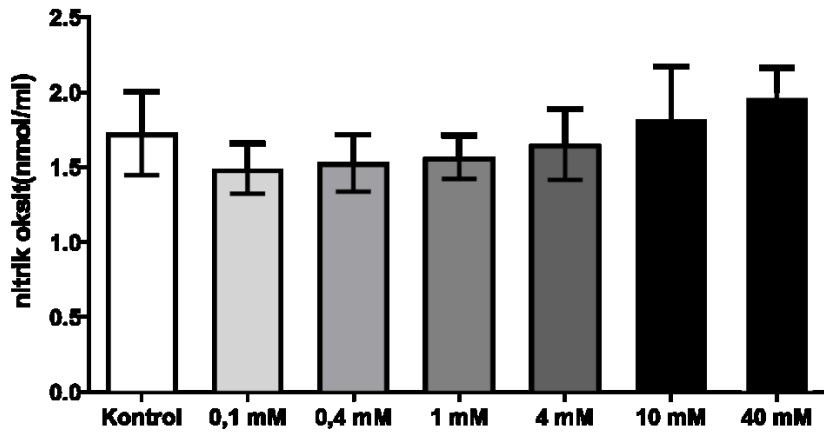
4.8 Formülasyonların Makrofaj ve Enfekte Makrofajlar Üzerinde Nitrik Oksit Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin farklı konsantrasyonlarının makrofaj ve enfekte makrofajlar üzerinde nitrik oksit (NO) üretimine etkisini belirlemek için Griess reaksiyonu kullanıldı. Griess reaksiyonu, nitritten asit katalizli nitroz asit oluşumundan (veya NO'nun otooksidasyonundan) üretilen NO türevli nitroza edici ajan, dinitrojen trioksitin (N_2O_3) sülfanilamid ile reaksiyona girerek bir diazonyum ürettiği iki aşamalı bir diazotizasyon reaksiyonudur. [318]

Asitleştirilmiş nitritten (veya NO'nun otooksidasyonundan) üretilen nitrozlaştırıcı ajan dinitrojen trioksit (N_2O_3) sülfanilamid ile reaksiyona girerek bir diazonyum türevi verir. Bu reaktif ara madde, 540 nm'de güçlü bir şekilde emen renkli bir diazo ürünü verecek şekilde N-1-naftilen diamin ile etkileşime girecektir.

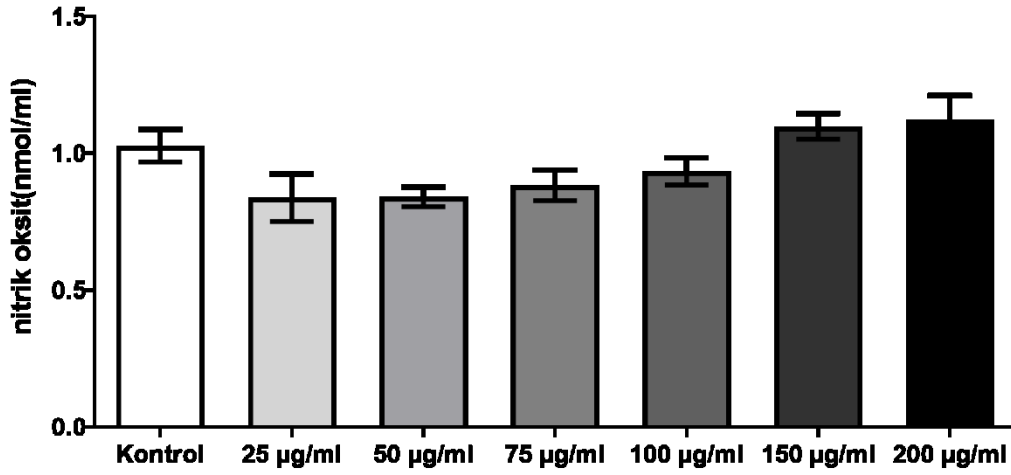
4.8.1 Formülasyonların Makrofajlar Üzerinde Nitrik Oksit Üretimine Etkileri

Farklı salisilik asit konsantrasyonlarının J774 makrofaj hücrelerinde nitrik oksit üretimine etkisi incelendiğinde ve konsantrasyonların etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Salisilik asit konsantrasyonlarının J774 hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkisi

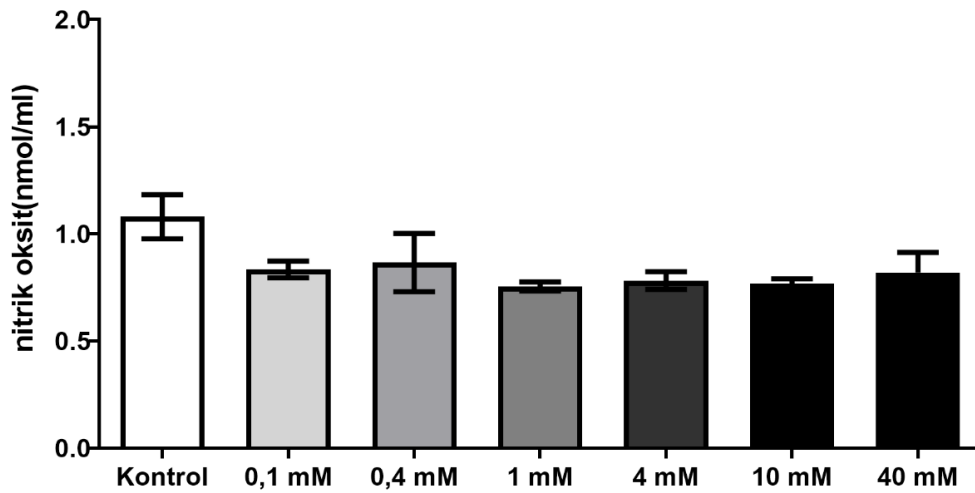
Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının J774 makrofaj hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkileri incelendiğinde ve gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 Aleo-emodin konsantrasyonlarının J774 hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkisi

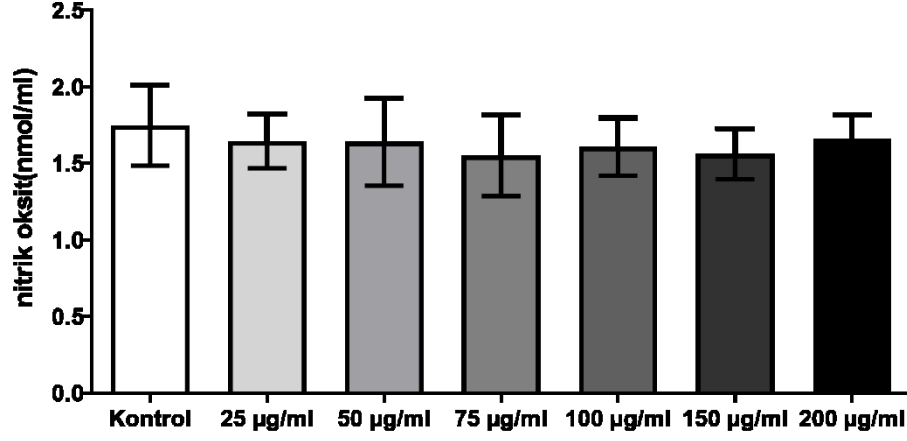
4.8.2 Formülasyonların Enfekte Makrofajlar Üzerinde Nitrik Oksit Üretimine Etkileri

Farklı salisilik asit konsantrasyonlarının enfekte makrofajlarda nitrik oksit üretimi üzerine etkileri incelendiğinde ve gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm salisilik dozlarında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 Salisilik asit konsantrasyonlarının *L. major* ile enfekte edilmiş J774 hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkisi

Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının enfekte makrofajlarda nitrik oksit üretimi üzerine etkileri incelendiğinde ve gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm aleo-emodin dozlarında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Şekil 4.23).



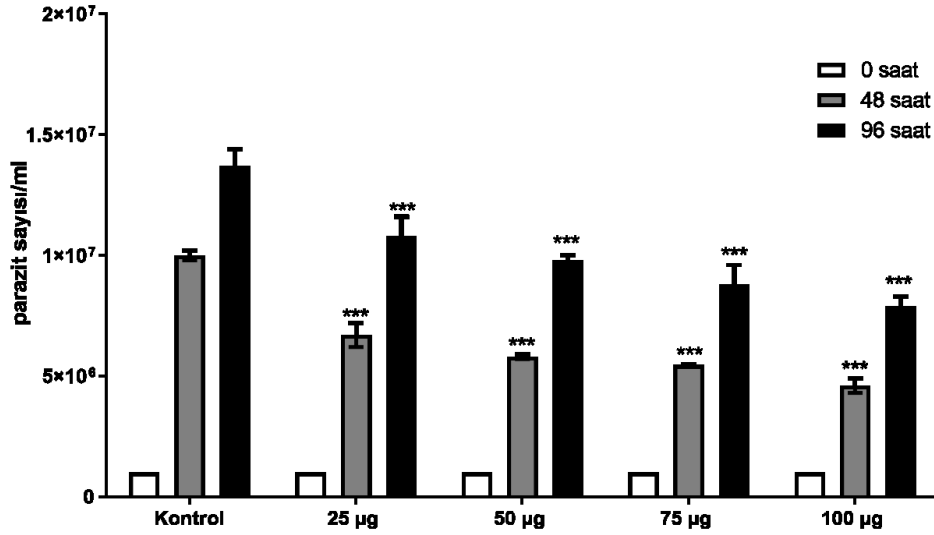
Şekil 4.23 Aleo-emodin konsantrasyonlarının *L. major* ile enfekte edilmiş J774 hücrelerinde nitrik oksit üretimi üzerine etkisi

4.9 Formülasyonların *L. Major* Parazit Sayısı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi

Eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin formülasyonlarının *L. major* parazit sayısı üzerine zamana bağlı etkisini incelemek için 1×10^6 parazit 2 ml ependorflar içerisine formülasyonlar ile birlikte ekildi ve inkübasyona bırakıldı. 24, 48 ve 96. saatlerde düzenli olarak sayımları yapıldı ve sonuçlar analiz edildi.

4.9.1 Eksozom Konsantrasyonlarının *L. Major* Parazit Sayısı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi

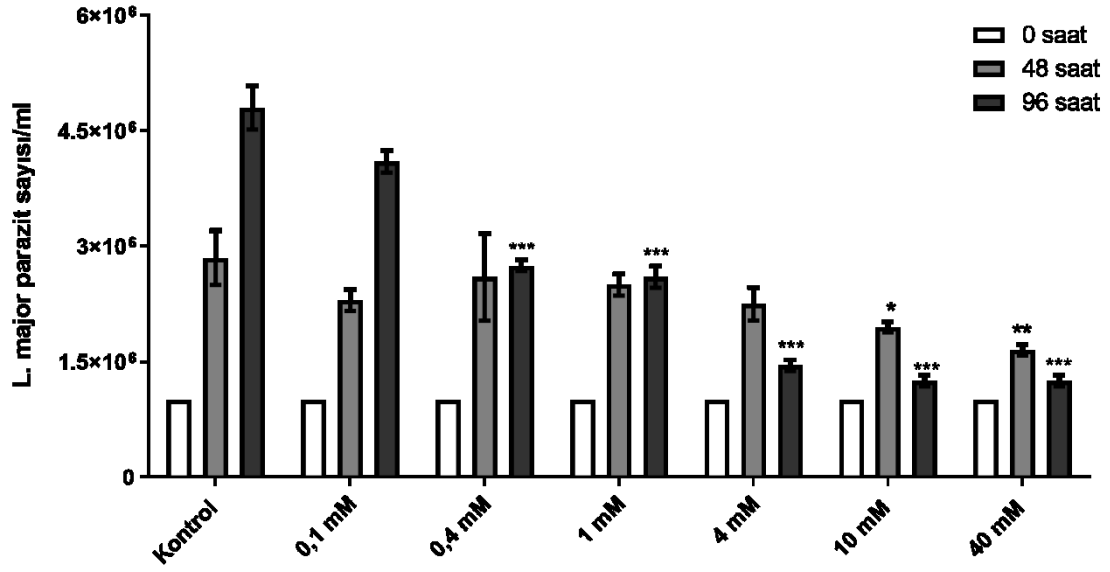
Farklı eksozom konsantrasyonlarının *L. major* parazit sayısı üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandı. 0. Saatte 10^6 /ml ekilen parazit sayısına göre analizler yapıldı. Her bir grupta parazit sayısı zamana bağlı olarak düzenli olarak artsa da kontrol grubu ile kıyaslandığında eksozom formülasyonlarının uygulandığı gruplarda bu artışın daha az olduğu gözlemlendi. 48. ve 96. saatte elde edilen verilerin sonuçları kontrol grubuna göre kıyaslandığında tüm eksozom gruplarında parazit sayısında anlamlı bir azalma olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4.24). 96 saatlik inkübasyonun ardından eksozomların en yüksek konsantrasyonunun uygulandığı grupta kontrol grubuna kıyasla parazit sayısında yaklaşık 1.5 katlık bir azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4.24 Eksozom formülasyonlarının *L. major* parazit sayısı üzerine zamana bağlı etkisi

4.9.2 Salisilik Asit Konsantrasyonlarının *L. Major* Parazit Sayısı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi

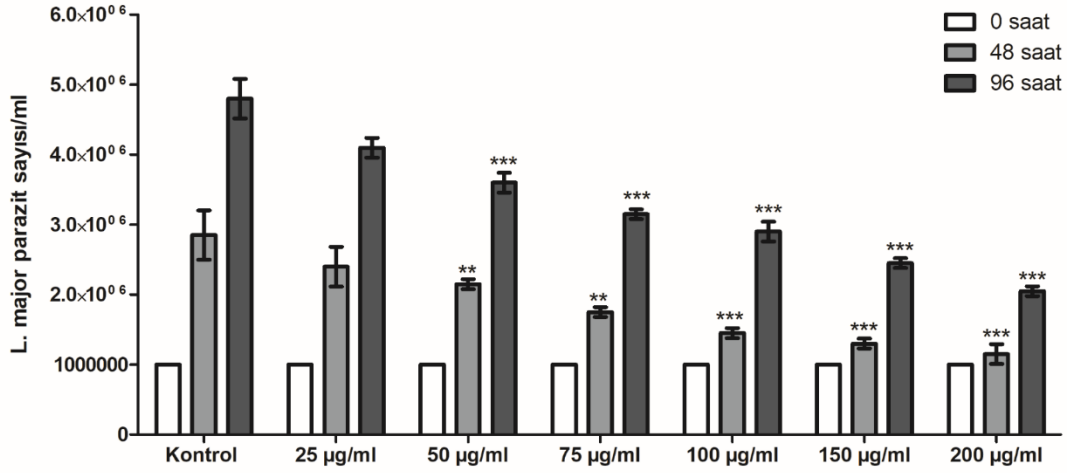
Farklı salisilik asit konsantrasyonlarının *L. major* parazit sayısı üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandı. 0. Saatte 10⁶/ml ekilen parazit sayısına göre analizler yapıldı. Her bir grupta parazit sayısı zamana bağlı olarak düzenli olarak artsa da kontrol grubu ile kıyaslandığında salisilik asit formülasyonlarının uygulandığı gruplarda bu artışın daha az olduğu gözlemlendi. 48. saatte elde edilen sonuçlara göre yalnızca 10 ve 40 mM salisilik asit dozlarının uygulandığı grupta kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.5$, $p<0.01$). 96. saatte elde edilen verilere göre tüm salisilik asit formülasyonlarında kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.25). 96 saatlik inkübasyonun ardından salisilik asitin en yüksek konsantrasyonunun uygulandığı grupta kontrol grubuna kıyasla parazit sayısında yaklaşık 2 katlık bir azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4.25 Salisilik asit formülasyonlarının *L. major* parazit sayısı üzerine zamana bağlı etkisi

4.9.3 Aleo-Emodin Konsantrasyonlarının *L. Major* Parazit Sayısı Üzerinde Zamana Bağlı Etkisi

Farklı aleo-emodin konsantrasyonlarının *L. major* parazit sayısı üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandı. 0. Saatte $10^6/\text{ml}$ ekilen parazit sayısına göre analizler yapıldı. Her bir grupta parazit sayısı zamana bağlı olarak düzenli olarak artsa da kontrol grubu ile kıyaslandığında aleo-emodin formülasyonlarının uygulandığı gruplarda bu artışın daha az olduğu gözlemlendi. 48. Saatte elde edilen sonuçlar kontrole göre kıyaslandığında $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ aleo-emodin dozunda anlamlı bir azalma tespit edilmezken $50, 75, 100$ ve $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ aleo-emodin dozlarında parazit sayılarında azalma anlamlı olarak tespit edilmiştir ($p < 0.5$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). 96. Saatte elde edilen sayım sonuçlara göre, aleo-emodin uygulanan gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Şekil 4.26). 96 saatlik inkübasyonun ardından aleo-emodin en yüksek konsantrasyonunun uygulandığı grupta kontrol grubuna kıyasla parazit sayısında yaklaşık 2 katlık bir azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4.26 Aleo-emodin formülasyonlarının *L. major* parazit sayısı üzerine zamana bağlı etkisi

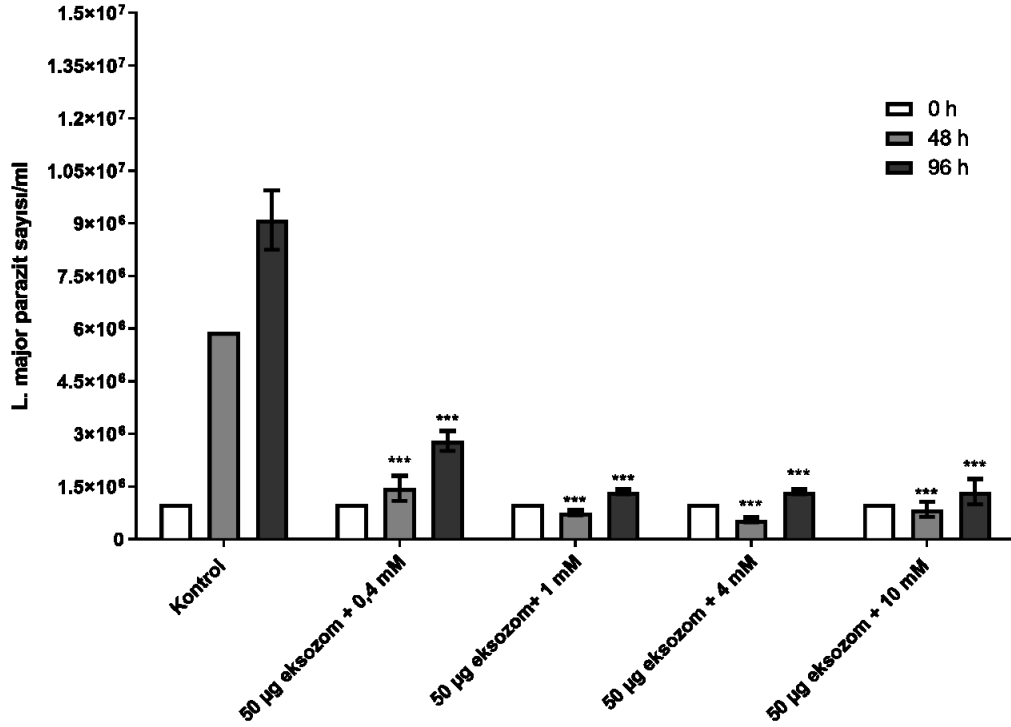
4.10 Eksozom ve Kombin Dozların *L. Major* Parazit Sayısı Üzerindeki Zamana Bağlı Etkisinin Belirlenmesi

Eksozom formülasyonları ile yapılan toksikolojik analizler, *L. major* parazit metabolik aktivitesi analizleri ve parazit sayım sonuçlarına göre elde edilen veriler doğrultusunda kombin çalışmalarda kullanılmak üzere 50 µg eksozom dozu seçildi. Salisilik asit ile yapılan çalışmalar doğrultusunda kombin çalışmalarda kullanılmak üzere 0.4, 1, 4 ve 10 mM salisilik asit dozları, aleo-emodin ile yapılan çalışmalar doğrultusunda kombin çalışmalarda kullanılmak üzere 25, 50, 75 ve 100 µg/ml aleo-emodin dozları seçildi. Eksozom ile salisilik asit ve aleo-emodin kombin formülasyonlarının *L. major* parazit sayısı üzerine zamana bağlı etkisini incelemek için 1x10⁶ parazit 2 ml ependorflar içerisine formülasyonlar ile birlikte ekildi ve inkübasyona bırakıldı. 24, 48 ve 96. saatlerde düzenli olarak sayımları yapıldı ve sonuçlar kontrole göre kıyaslanarak analiz edildi.

4.10.1 Eksozom ve Salisilik Asit Kombin Dozlarının *L. Major* Parazit Sayısı Üzerine Zamana Bağlı Etkisi

50 µg eksozom dozu 0.4, 1, 4 ve 10 mM salisilik asit konsantrasyonları ile kombin olarak çalışıldı. Kombin dozların *L. major* parazit sayısı üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandı. 0. Saatte 1x10⁶/ml ekilen parazit sayısına göre analizler yapıldı. Her bir grupta parazit sayısı zamana bağlı olarak düzenli olarak artsa da kontrol grubu ile kıyaslandığında kombin formülasyonlarının uygulandığı

gruplarda bu artışın daha az olduğu gözlemlendi. 48 ve 96. saatlerde elde edilen sayım sonuçları kontrol grubuna göre kıyaslandığında eksozom ve salisilik asitin kombin olarak uygulandığı tüm dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.27). 96 saatlik inkübasyonun ardından kombinasyonlara maruz kalan gruplardaki parazit sayısının kontrol grubuna göre 3 ila 6 kat arasında azaldığı belirlenmiştir.

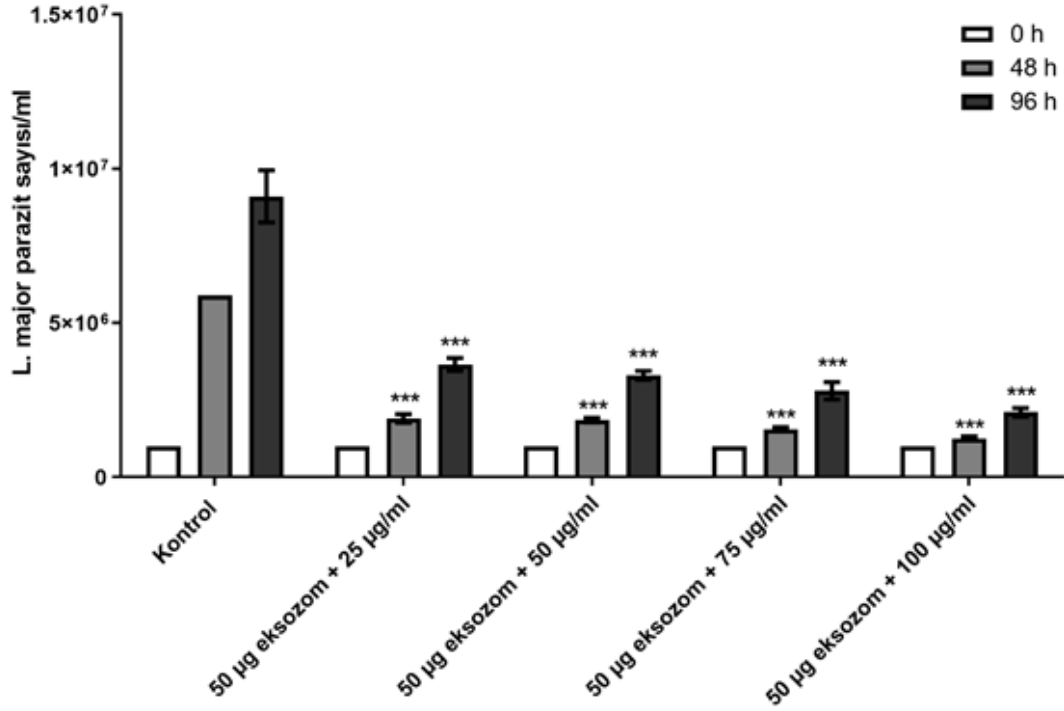


Şekil 4.27 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının *L. major* parazit sayısına zamana bağlı etkisi

4.10.2 Eksozom ve Aleo-Emodin Kombin Dozlarının *L. Major* Parazit Sayısı Üzerine Zamana Bağlı Etkisi

50 µg eksozom dozu 25, 50, 75 ve 100 µg/ml aleo-emodin konsantrasyonları ile kombin olarak çalışıldı. Kombin dozların *L. major* parazit sayısı üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandı. 0. Saatte 1x10⁶/ml ekilen parazit sayısına göre analizler yapıldı. Her bir grupta parazit sayısı zamana bağlı olarak düzenli olarak artsa da kontrol grubu ile kıyaslandığında kombin formülasyonlarının uygulandığı gruplarda bu artışın daha az olduğu gözlemlendi. 48 ve 96. saatlerde elde edilen sayım sonuçları kontrol grubuna göre kıyaslandığında eksozom ve aleo-emodin

kombin olarak uygulandığı tüm dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.28). 96 saatlik inkübasyonun ardından kombinasyonlara maruz kalan gruptaki parazit sayısının kontrol grubuna göre 2.5 ila 3.5 kat arasında azaldığı belirlenmiştir.



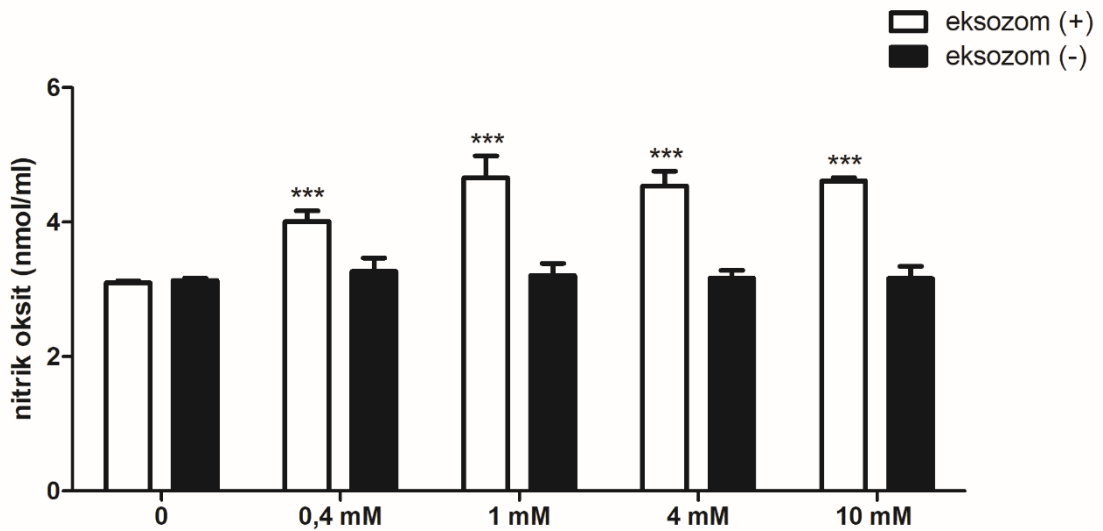
Şekil 4.28 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının *L.major* parazit sayısında zamana bağlı etkisi

4.11 Eksozom ve Kombin Dozların Enfekte Makrofajlarda Nitrik Oksit Üretimine Etkisi

Eksozom ile salisilik asit ve aleo-emodin kombin olarak hazırlandığı farklı konsantrasyonlarının enfekte makrofajlar üzerinde nitrik oksit üretimine etkisini belirlemek için Griess reaksiyonu kullanıldı. Reaksiyon sonucu oluşan kromogenik bileşik spektrofotometre ile ölçüldü.

4.11.1 Eksozom ve Salisilik Asit Kombin Dozlarının Enfekte Makrofajlar Üzerinde Nitrik Oksit Üretimine Etkisi

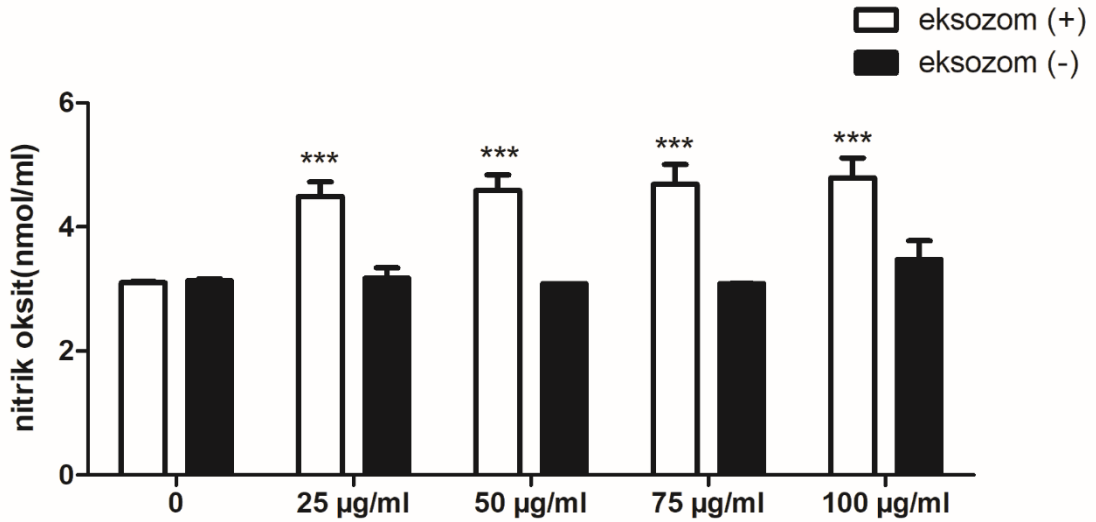
50 µg eksozom dozu ile 0.4, 1, 4 ve 10 mM salisilik asit konsantrasyonları ile kombin olarak çalışıldı. Kombin dozların enfekte makrofajlarda nitrik oksit üretimine etkisi kontrol grubundan elde edilen veriler ile kıyaslandı ve analiz edildi. Salisilik asitin tek uygulandığı dozlar % 0.1 DMSO içeren RPMI besiyeri ile ekilmiş enfekte makrofajlardan elde edilen veriler ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlara göre, salisilik asitin tek uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Salisilik asit ve eksozom kombin dozları, kontrol grubu ile kıyaslandığında NO üretiminde anlamlı bir artma tespit edilmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının enfekte makrofajların nitrik oksit üretimi üzerine etkisi

4.11.2 Eksozom ve Aleo-Emodin Kombin Dozlarının Enfekte Makrofajlar Üzerinde Nitrik Oksit Üretimine Etkisi

50 µg eksozom dozu ile 25, 50, 75 ve 100 µg/ml aleo-emodin konsantrasyonları kombin olarak çalışıldı. Kombin dozların enfekte makrofajlarda nitrik oksit üretimine etkisi kontrol grubundan elde edilen veriler ile kıyaslandı ve analiz edildi. Aleo-emodin tek uygulandığı dozlar % 0.1 DMSO içeren RPMI besiyeri ile ekilmiş enfekte makrofajlardan elde edilen veriler ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlara göre, aleo-emodin tek uygulandığı gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığı NO üretiminde anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir ($p>0.5$). Ayrıca aleo-emodin ve eksozom kombin dozları hem kontrol grubu ile hem de 50 µg eksozom dozu kıyaslandığında NO üretiminde anlamlı bir artma tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.30).



Şekil 4.30 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının enfekte makrofajların nitrik oksit üretimi üzerine etkisi

Elde edilen veriler doğrultusunda, salisilik asit ve aleo-emodin tek uygulanması sonucu elde edilen NO miktarında anlamlı bir fark tespit edilmezken, bu maddeler ile 50 µg eksozomun kombin olarak uygulanması enfekte makrofajlarda NO üretimini anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir.

4.12 Eksozom ve Kombin Dozların Anti-amastigot Etkisinin Belirlenmesi

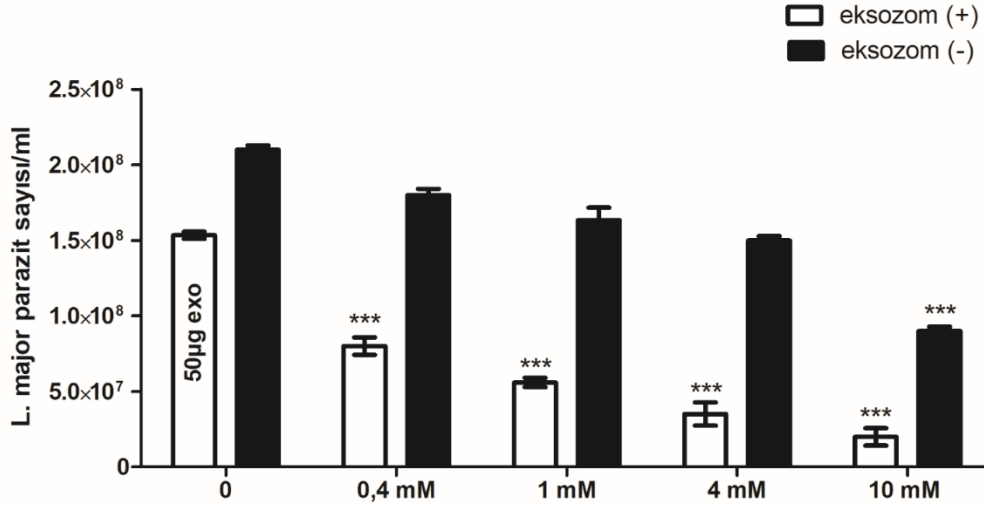
Eksozom ve eksozomların salisilik asit ve aleo-emodin ile kombin olarak hazırlanan dozlarının anti-promastigot etkisini belirlemek için J774 makrofaj hücreleri 1:10 oranında *L. major* parazitleri ile enfekte edildi. Enfekte makrofaj hücreleri formülasyonlar ile 3 gün inkübe edildikten sonra besiyeri değiştirildi ve 3 gün daha inkübasyona bırakıldı. 3 gün içerisinde makrofajlar içerisinde amastigot formda olan parazitlerin makrofaj içerisinden çıkması ve promastigot forma dönüşmesi prensibine dayanarak ortamdaki promastigot parazitler sayıldı ve sonuçlar analiz edildi.

4.12.1 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının anti-amastigot etkisi

50 µg eksozom dozu ile 0.4, 1, 4 ve 10 mM salisilik asit konsantrasyonlarının anti-promastigot etkisinin belirlenmesi için tüm dozlar hem tek hem de kombin olarak çalışıldı. Eksozom ve salisilik asitin tek uygulandığı dozlar % 0.1 DMSO içeren RPMI besiyeri ile ekilmiş enfekte makrofajlardan elde edilen veriler ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlara göre yalnızca 10 mM salisilik asit uygulanan grupta promastigot sayısında kontrole göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Diğer dozlarda anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Eksozom uygulanan gruptaki parazit sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0.001$).

Eksozom ile salisilik asitin kombin olarak uygulanan grup kontrol ile kıyaslandığında ise, tüm kombin dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.31). Kombinasyon uygulamasının *L.major* amastigot sayısını kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 8 kat azalttığı belirlenmiştir.

Kombinasyon uygulaması tek başına eksozom uygulaması ile kıyaslandığında *L.major* amastigotları üzerinde yaklaşık 4 katlık bir azalmaya neden olmuştur.



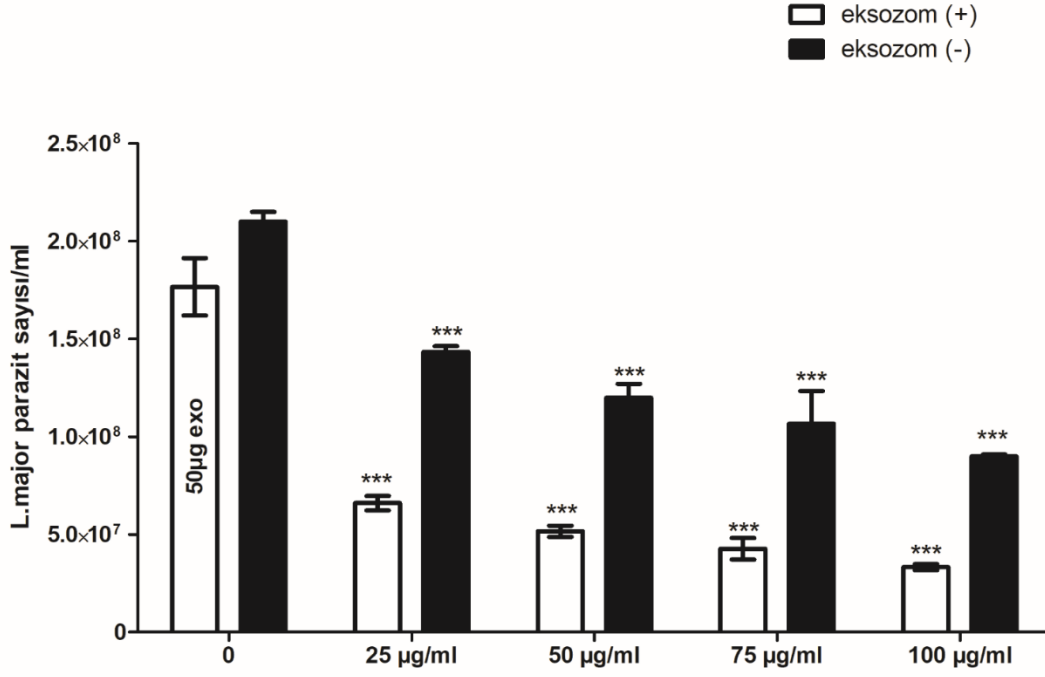
Şekil 4.31 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının *L. major* üzerine anti-amastigot etkisi

4.12.2 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının anti-promastigot etkisi

50 µg eksozom dozu ile 25, 50, 75 ve 100 µg/ml aleo-emodin konsantrasyonlarının anti-promastigot etkisinin belirlenmesi için tüm dozlar hem tek hem de kombin olarak çalışıldı. Eksozom ve aleo-emodin tek ve kombin olarak uygulandığı dozlar % 0.1 DMSO içeren RPMI besiyeri ile ekilmiş enfekte makrofajlardan elde edilen veriler ile kıyaslandı.

Elde edilen sonuçlara göre, aleo-emodin tek uygulandığı gruplar kontrol grubuna göre kıyaslandığında tüm gruplarda promastigot sayısının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Eksozomun tek başına uygulandığı grup kontrol grubu ile kıyaslandığında promastigot sayısında anlamlı bir düşüş tespit edildi ($p < 0.001$). Eksozom ile aleo-emodin kombin dozları kontrol grubuna göre kıyaslandığında ise promastigote sayısında anlamlı bir azalma tespit edildi (Şekil 4.32). Kombinasyonların uygulandığı grupta amastigot sayısının kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat azaldığı tespit edilmiştir.

Kombinasyonların etkinliği tek başına eksozom uygulaması ile kıyaslandığında tek başına eksozom uygulanan gruptaki parazit sayısının kombinasyonun uygulandığı gruplara nazaran 4 katlık bir artış gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.32 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının *L. major* üzerine anti-amastigot etkisi

Elde edilen tüm veriler doğrultusunda eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin tek başına uygulandığı durumda promastigote sayısının azaldığı fakat bu azalmanın eksozom kombin dozlarında daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

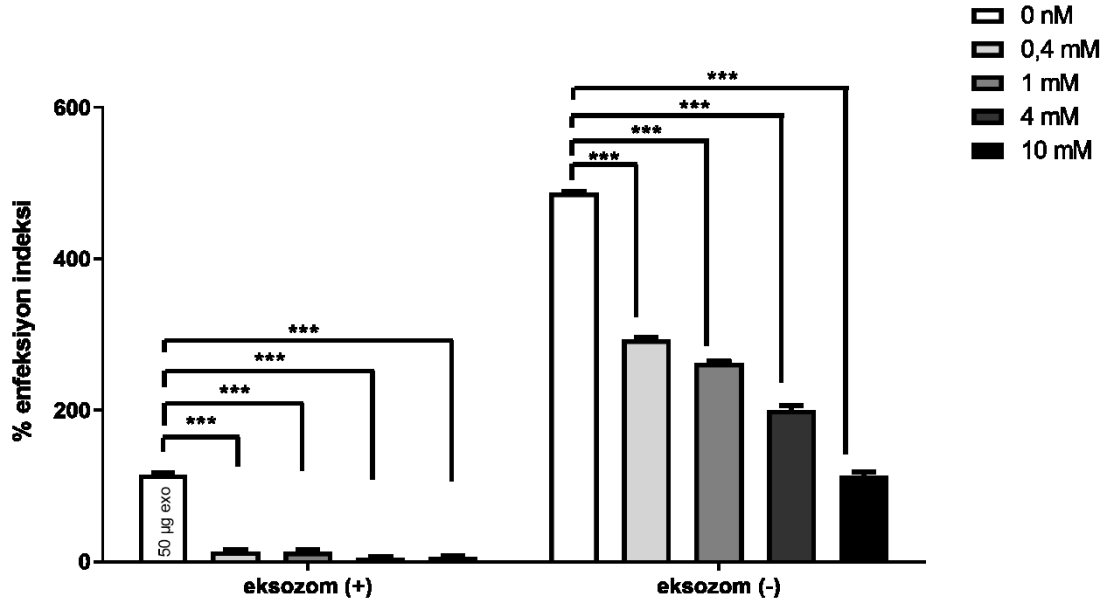
4.13 Eksozom ve Kombin Dozların Enfeksiyon İndeksi Üzerine Etkisi

Eksozom ve eksozomların salisilik asit ve aleo-emodin ile kombin olarak hazırlanan dozlarının anti-amastigot etkisini belirlemek için J774 makrofaj hücreleri 1:10 oranında *L. major* parazitleri ile enfekte edildi. Enfekte makrofaj hücreleri formülasyonlar ile 3 gün inkübe edildikten sonra GEMSA boyası ile boyandı ve makrofajlar içerisindeki amastigot parazitler sayılarak sonuçlar analiz edildi.

4.13.1 Eksozom ve salisilik asit kombin dozların enfeksiyon indeksi üzerine etkisi

50 µg eksozom dozu ile 0.4, 1, 4 ve 10 mM salisilik asit konsantrasyonlarının anti-amastigot etkisinin belirlenmesi için tüm dozlar hem tek hem de kombin olarak çalışıldı. Eksozom ve salisilik asitin tek ve kombin olarak uygulandığı dozlar % 0.1 DMSO içeren RPMI besiyeri ile ekilmiş enfekte makrofajlardan elde edilen veriler ile kıyaslandı. Salisilik asitin tek uygulandığı dozlar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda amastigot sayısında anlamlı bir düşüş tespit edildi. Ayrıca, eksozom ile salisilik asitin birlikte uygulandığı gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda anlamlı bir azalma tespit edildi. Bununla birlikte, eksozomun salisilik asit ile uygulandığı tüm gruplarda elde edilen amastigot sayısındaki düşüşün salisilik asitin tek uygulandığı gruba göre daha fazla olduğu tespit edildi ($p < 0.001$) (Şekil 4.33). Kombinasyonların farklı dozlarına maruz kalan enfekte makrofajların enfeksiyon indeksi değerinin anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür.

Tek başına eksozom uygulanan grup ile kıyaslandığında kombinasyonlara maruz kalan gruplarda enfeksiyon indeksinin 8 ila 10 kat azaldığı tespit edilmiştir.

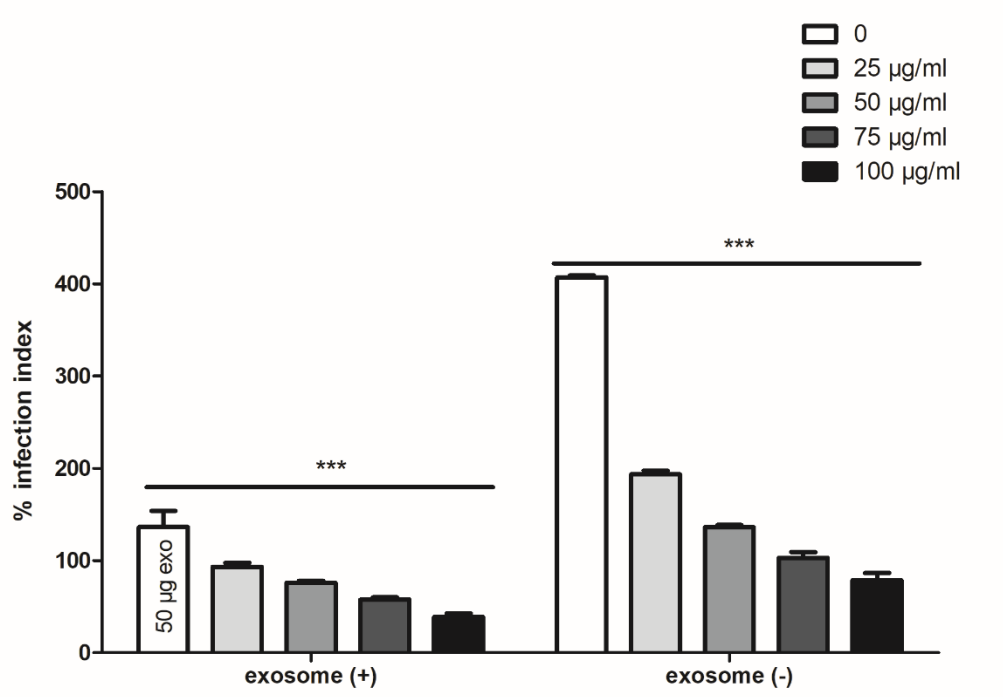


Şekil 4.33 Eksozom ve salisilik asit kombin dozlarının enfeksiyon indeksi üzerine etkisi

4.13.2 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozların enfeksiyon indeksi üzerine etkisi

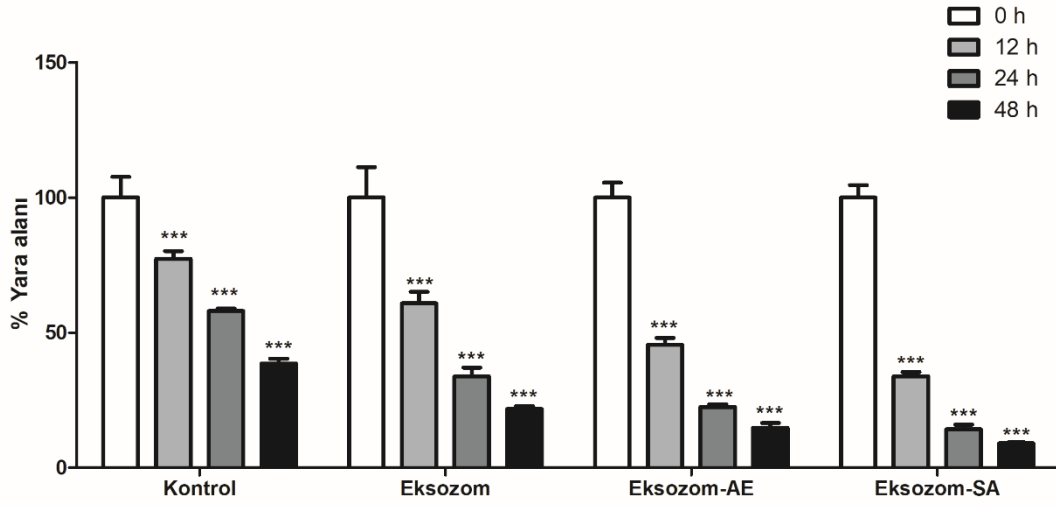
50 µg eksozom dozu ile 25, 50, 75 ve 100 µg/ml aleo-emodin konsantrasyonlarının anti-amastigot etkisinin belirlenmesi için tüm dozlar hem tek hem de kombin olarak çalışıldı. Eksozom ve aleo-emodin tek ve kombin olarak uygulandığı dozlar % 0.1 DMSO içeren RPMI besiyeri ile ekilmiş enfekte makrofajlardan elde edilen veriler ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlara göre, aleo-emodin tek başına uygulandığı gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplardaki amastigot parazit sayısında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0.001$). Aynı zamanda, aleo-emodin eksozom ile kombin olarak uygulandığı gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında parazit sayısında anlamlı bir azalma tespit edildi. Tek ve kombin olarak uygulanan dozlar kendi aralarında kıyaslandığında ise, eksozomun aleo-emodin ile birlikte uygulandığı gruplardaki amastigot parazit sayısının aleo-emodin tek uygulandığı gruba göre daha fazla azaldığı tespit edildi ($p < 0.001$) (Şekil 4.34). Kombinasyonların farklı dozlarına maruz kalan enfekte makrofajların enfeksiyon indeksi değerinin anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür.

Tek başına eksozom uygulanan grup ile kıyaslandığında kombinasyonlara maruz kalan gruplarda enfeksiyon indeksinin 2.5 ila 4 kat azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.34 Eksozom ve aleo-emodin kombin dozlarının enfeksiyon indeksi üzerine etkisi

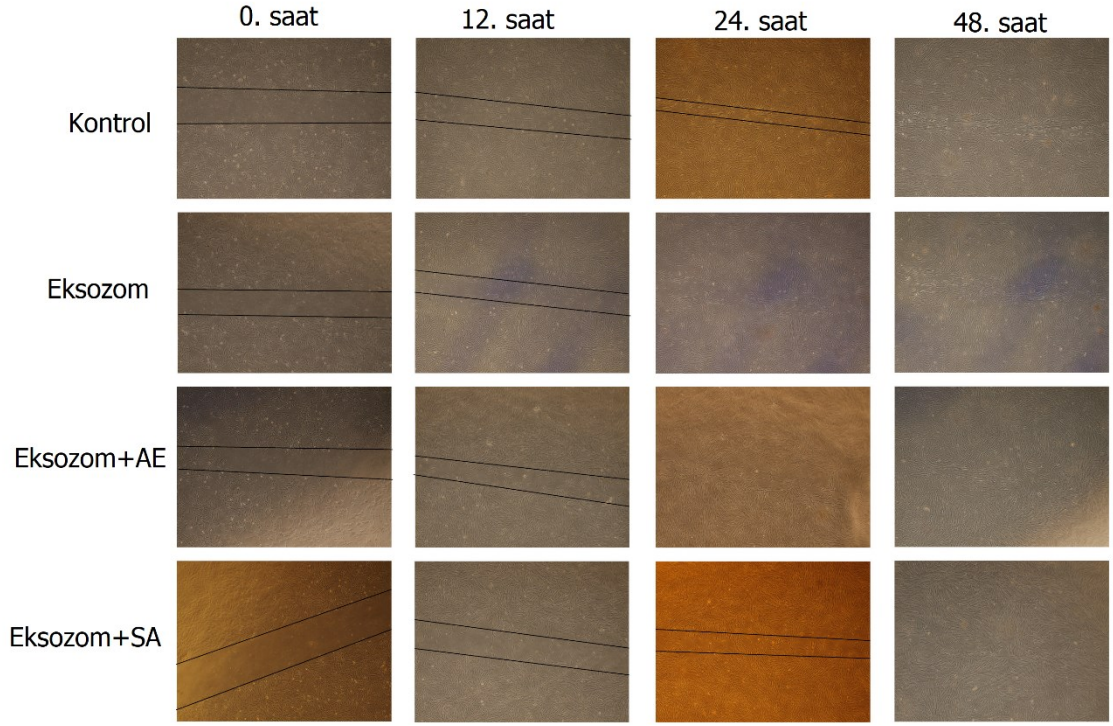
4.14 Formülasyonların *in vitro* Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi



Şekil 4.35 Formülasyonlarının L929 hücre hattında yara iyileşmesi üzerine etkisi

Eksozom, salisilik asit ve aleo-emodin yüksek dozlarının kombin formülasyonlarının yara iyileşmesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla L929 hücreleri ile *in vitro* yara modeli oluşturuldu. Yara modeli oluşturmak için ekilen hücreler 1000 µl lik steril pipet ucu ile çizildi ve oluşan yaraların 0., 12., 24. ve 48. saatlerde düzenli olarak Olympus E-330 EVOLT Review marka fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekildi. Her bir grubun 0. saatindeki yara genişliği %100 olarak kabul edildi ve alandaki kapanma oranı hesaplanarak 0. saatte ölçülen yara genişliği ile kıyaslandı.

Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubunun 12., 24. ve 48. Saatlerdeki yara alanı incelendiğinde yara iyileşmesinin zamana bağlı olarak anlamlı oranda arttığı, yara alanının anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p < 0.001$). Eksozom, eksozom+aleoemodin ve eksozom+salisilik asit dozlarının uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre kıyaslandığında yara alanında zamana bağlı olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0.001$). Şekil 4.35 incelendiğinde, kombin dozlarda zamana bağlı olarak iyileşme oranının daha yüksek, yara alanındaki azalmanın tek uygulama yapılan gruplara kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 Formülasyonların L929 hücre hattında *in vitro* yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi

İhmal edilen bir tropikal hastalık olarak Leishmaniasis, tüm dünyada tropikal ve subtropikal bölgelerdeki geniş popülasyonları etkiler. Dünya Sağlık Örgütü WHO'nun 2016 tarihli en son raporuna göre, yüksek düzeyde endemik 11 ülkede 399 milyon insan, hastalığın kutanöz formu için risk altındadır. En fazla enfekte olan 12 ülkede 556 milyon kişi VL tehlikesiyle karşı karşıyadır. Endemik bölgelerde her yıl 900 000 ila 1,3 milyon yeni vaka ve 20 000 ila 30 000 ölüm bildirilmektedir [319]. Şu anda insanlar için leishmaniasis'e karşı onaylanmış bir aşı yoktur. Mevcut onaylanmış aşılardan Leishmune, Leish Tec ve CaniLeish dahil olmak üzere köpek visceral leishmaniasis önlenmesi içindir [320]. Kutanöz forma karşı gerçekten etkili tek yaklaşım olan leishmanization uygulaması, güvenlik endişeleri nedeniyle sonlandırılmıştır [321]. Leishmaniasis için mevcut tedaviler, kutanöz ve mukokutanöz formlar için antimonlarla kemoterapiyi ve VL için Amfoterisin B'yi (AmB) içerir. Sitotoksikite dışında, ilaç direnci mevcut tedavinin önündeki ana engeldir [322]. Kutanöz leishmaniasis sonucu deride oluşan nodüller, derin yaralar her ne kadar öldürücü olmasa da uzun vadede hasta bireylerde psikolojik sorunlar yaratabilmektedir. Tedavide kullanılan ilaçların dezavantajları sebebiyle tedaviye yönelik yeni yaklaşımların araştırılması gerekmektedir. Bu sebeple kök hücreler ve bu hücrelerden elde edilen eksozomların kutanöz yara modellerini iyileştirmesine yönelik rejeneratif özellikteki çalışmalar artmıştır.

Bu çalışmada KL tedavisinde kullanılmak üzere göbek kordonundan MKH izolasyonu, üretimi ve karakterizasyonunu yapılması, MKH'lerden elde edilen EV izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılması ile ekstrasellüler veziküllerin yara iyileştirmesindeki etkinliği daha önce gösterilen salisilik asit ve aloe-emodin isimli bileşenlerle kombinasyon halinde in vitro sitotoksik, antileishmanial ve yara iyileştirici aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, antileishmanial ilaçların dezavantajlarını içermeyen hem antiparaziter etkinlik hem de yara iyileştirici özellik gösterebilen yeni nesil ilaç adayları formülasyonların geliştirilmesi hedeflenmiştir.

MKH'lerin bağışıklık sistemini baskılayıcı özelliği ve hasarlı dokuya özgü farklılaşma ve onarım kapasitesi nedeniyle rejenerasyon ve onarım çalışmalarında büyük etkisi vardır. MKH'ler, CD105, CD73 ve CD90 yüzey belirteçlerinin pozitif ifadesi ve CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR'nin negatif ifadesi ile Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından belirlendiği şekilde karakterize edilir [174]. WJ'den izole edilen kök hücrelerin pozitif belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri de literatüre uygun olarak %90'ın üzerinde ve negatif belirteçlerin %2'den az olarak analiz edildi. Arno ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada WJ'den elde edilen mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Karakterizasyon için MKH hücre yüzeyi belirteçleri (CD90+, CD73+, CD105+, CD45-, CD14-, CD34-, CD19- ve HLA-DR-) kullanılmış ve hücrelerin kök hücre karakteristik özelliklerini taşıdıkları tespit edilmiştir [323]. Doi ve arkadaşlarının 2015 yılında farklı kaynaklardan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin yara iyileşmesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, göbek kordonu kanı ve WJ kökenli mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini karşılaştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, her iki kaynaktan da elde edilen hücrelerin CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri mezenkimal kök hücre karakteristiğini karşılamaktadır [324]. Tormin ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada kemik iliğinden izole ettikleri mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon analizlerini yapmışlardır. Gen ekspresyonu ve flow sitometrik karakterizasyon yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamıza benzer olarak CD90, CD75, CD105 pozitif yüzey belirteçleri ve CD34, CD45, CD14, CD19, HLA-DR negative yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir [325]. 2018 yılında insan yağ dokusu kaynaklı sekonder hücre hattı mezenkimal kök hücreler ile yapılan bir çalışmada MKH'lerin karakterizasyonu için flow sitometrik analiz yapılmış ve elde edilen sonuçlar ISCT'nin belirttiği değerlere uygun olarak tespit edilmiştir [326].

Tormin ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin karakterizasyonu için flow sitometrik analiz yaparak CD73, CD90, CD105, CD45, CD14, CD34 ve HLA-II yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini analiz etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar ISCT'nin belirlemiş olduğu kriterler doğrultusundadır [325]. Yukarıda özetlenen çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile

çalışmamızda kullandığımız göbek kordonundan elde edilen MKH'lerden izole edilmiş eksozomların ekspresyon sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Mezenkimal kök hücreler yüksek farklılaşma kapasitesine ve rejeneratif özelliklere sahiptir. Potansiyel kullanımları, hasarlı dokuları yenilerken teratomun olmamasına ve taze hücre havuzlarının gelişmesine bağlıdır. Bazı çalışmalar, MKH'lerin tümör hücresi büyümesini destekleyebileceğini göstermiştir [327, 328]. Kök hücrelerde telomer uzunluğunun korunması, hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşma profilleri için önemli bir faktördür [329]. Embriyonik kök hücrelerde telomeraz enzim aktivitesi çok yüksek iken somatik hücrelerde bu oran çok düşüktür. Bu nedenle, MKH'lerin telomerik güvenliği, relatif telomeraz enzim aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Daha önceki bir çalışmada farklı hücre hatlarının telomeraz enzim aktiviteleri araştırılmıştı. Bu çalışmada dental papilla dokusu, göbek kordonu, yağ dokusu ve kanser hücrelerinden (MDA-MB-231, U87 MG ve MCF-7) elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanıldı. Somatik hücre olarak fetal fibroblast ve erişkin kas hücreleri kullanıldı. Çalışmanın sonuçlarına göre MDA-MB-231, U-87 MG, MCF-7, DPSCs, UCSCs ve ASCs hücrelerinin telomeraz aktiviteleri 35 ± 6.7 , 36 ± 3.5 , 44 ± 4.7 olarak bulunmuştur. 51 ± 3.3 , 46 ± 4.4 ve 34 ± 3.0 . Öte yandan, bu çalışmada WJ-MKH'lerin telomeraz enzim aktivitesi %7 olarak belirlendi. Bir önceki çalışma ile karşılaştırıldığında, mezenkimal kök hücrelerimizin RTA seviyesinin kanser hücre hattının RTA seviyesinden çok daha düşük olduğu analiz edildi. Bir diğer çalışmada, somatik hücreler ile kanser hücrelerinin telomeraz enzim aktiviteleri karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar kanser kök hücre RTA düzeyi ile karşılaştırılmış ve kanser hücrelerinin RTA sonuçlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir [330]. Yapılan bir çalışmada 24 farklı kanser türünde telomer uzunlukları ve telomeraz aktiviteleri araştırılmış ve sonuçların normal hücrelere göre önemli değişiklikler içerdiği tespit edilmiştir. Telomeraz aktivitesi metastatik tümörlerde çok yüksek iken iyi huylu tümörlerde yoktur. Çalışmalar, tümörlerin %85'inden fazlasının telomeraz aktivitesine sahip olduğunu kanıtlamıştır [331].

Transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun somatik kök hücre özelliklerinin korunması için gerekli olduğu öne sürülmüştür. Oct4 ve Sox2 gen ekspresyon analizleri kök hücrelerin pluripotensi özelliklerinin tespit edilmesi için yapılmaktadır [332]. Telomerik uçların uzunluğu, telomeraz ters transkriptaz

(TERT) geninin ekspresyonu ile kontrol edilmektedir. Somatik hücreler genellikle düşük veya saptanamayan telomeraz seviyelerine sahiptir. Azalan TERT aktivitesi, hücre kültüründe MKH'lerin farklılaşması ve artan pasaj sayısı ile ilişkilidir. Kanser hücrelerinin artan seviyelerde telomeraz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir [333].

2011 yılında kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin transkripsiyon analizlerinin yapıldığı çalışmada, OCT4 ve SOX2 genlerinin RT-PCR ile analizi yapıldı. Çalışmada kontrol geni olarak GAPDH kullanıldı. 21 gün boyunca osteojenik indükleme yapılan kemik iliği kaynaklı MKH'lerden 0., 6. ve 21. günlerde örnekler alındı ve OCT4 ve SOX2 genlerinin ifadeleri analiz edildi. 6 günlük osteojenik indüksiyonun ardından hücrelerde benzer bir OCT4 ve SOX2 transkripsiyonu seviyesi gözlemlendi. 21. günde elde edilen transkripsiyon seviyesi 6. günden daha düşük olarak gözlemlendi. OCT4 ve SOX2 proteinlerinin ekspresyonu, RT-PCR sonuçlarını doğrulamak için western blot analizi ile de değerlendirildi. OCT4 ve SOX2 proteinleri, farklılaşmamış kemik iliği kaynaklı MKH'lerde ve kemik iliği kaynaklı MKH'lerde osteojenik farklılaşmayı takip eden 14 ve 21. günlerde değil, 7. günde saptandı Bu sonuçlar, RT-PCR analizinin sonuçlarıyla tutarlı olarak tespit edildi. Bu sonuçlar, osteojenik farklılaşmayı takiben 7. günde farklılaşmamış hücreler olduğunu göstermektedir [334]. Gade ve arkadaşlarının 2012 yılında buffalo kemik iliğinden izole ettikleri MKH'ler ile yaptıkları çalışmada moleküler ve hücresel karakterizasyon analizleri yapmışlardır. OCT4 pluripotensi geninin ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile analiz ederek bu hücrelerin MKH olduklarını kanıtlamışlardır. Ayrıca, hücre yüzeyi ve pluripotens belirteçlerinin ifadesi, buffalo kemik iliği MKH'lerinin 4. pasajında immüno Floresan ile değerlendirildi. Pluripotens belirteçleri OCT4, SOX2 ve Nanog belirteçleri poliklonal antikorlar kullanılarak lokalize edildi. RT-PCR ve immüno Floresans yöntemine ek olarak aynı belirteçlerin flow sitometrik analizleri de yapıldı. OCT4, SOX2 ve Nanog yüzey belirteçlerinin eksprese edildiği tespit edilmiştir. [335]. Karaöz ve arkadaşlarının 2011 yılında, insan diş özü kök hücreleri ile kemik iliği kaynaklı MKH'lerin nöral ve epitelyal kök hücre özelliklerini karşılaştırdıkları çalışmada OCT4, SOX2 ve Nanog genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Kök hücrelerin pluripotensi özelliklerini yansıtan bu genlerin her iki hücre hattında da ekspre edildiklerini tespit etmişlerdir [332]. Yapılan bu çalışmada, göbek kordundan izole edilen MKH'lerin karakterizasyonu için OCT4,

SOX2, TERT transkripsiyon faktörlerine ek olarak ZPF42 transkripsiyon faktörünün de ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. GAPDH geninin kontrol olarak kullanıldığı analizler sonucunda, göbek kordonundan izole edilen MKH'lerde belirtilen genlerin ifadesi olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçların yukarıda özetlenen diğer çalışmalarla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonlarının yapılmasının ardından bu hücrelerden eksozom üretimi gerçekleştirildi. Son zamanlarda, hücre dışı biyolojiye ilgi büyük ölçüde artmış ve biyofiziksel özelliklerine ve biyogenezlerine bağlı olarak farklı vezikül türleri tanımlanmıştır. Eksozomlar, 40 ila 100 nm boyutunda homojen küçük parçacıklardır ve endositik geri dönüşüm yolundan türetilir. Birçok çalışmada mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomların doku rejenerasyonu ve organ hasarında etkili olduğu gösterilmiştir. Sırasıyla böbrek bozuklukları, kardiyovasküler problemler, Parkinson ve yara iyileşmesi üzerine de çalışmalar vardır [336].

İzole edilmiş eksozomların karakterizasyonu için flow sitometri ile yüzey belirteçlerinin ekspresyonu, Zeta ve NTA ile boyut analizleri ve SEM ile morfolojik analizler yapılmıştır. Çalışmamızda hem manuel olarak hem de Exo Flow kiti ile flow sitometrik analiz yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışılan örneklerde yüksek CD9, CD63 ve CD81 seviyelerinin eksprese edildiği ve eksozomların varlığına işaret ettiği gösterilmiştir. Birçok farklı çalışmada eksozomlar için gerekli olan ekspresyon seviyeleri de gösterilmiştir [337-340]. Yin Hu ve ark., 2017 yılında yaptıkları çalışmada göbek kordon kanından elde edilen eksozomların karakterizasyonu için flow sitometrik analiz yaparak CD63 ekspresyonunun varlığını kanıtlamışlardır [337]. Adolf Geiger ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada insan fibrosit kaynaklı eksozomların CD9, CD81 ve CD63 yüzey belirteçlerinin ifadesini analiz etmiştir ve elde edilen sonuçlara göre yüzey belirteçlerinin ifadesinin varlığı kanıtlanmıştır [341]. Zang ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada, insan göbek kordonu MKH'lerinden elde edilmiş eksozomların sıçan derisinde oluşan yanık yarasını iyileştirmesindeki etkisi incelenmiştir. İzole edilen eksozomların karakterizasyon analizleri için Western blot yöntemi kullanılarak CD9, CD63 ve CD81 yüzey belirteçlerinin ekspresyonu

analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar MKH'lerin CD9, CD63 ve CD81 yüzey belirteçlerini eksprese ettiklerini göstermiştir. [342]. Zhao ve arkadaşlarının 2017 yılında insan amniyotik epitelial hücrelerden elde edilen eksozomların yara iyileşmesini arttırması ve yara oluşumunu inhibe etmesi üzerine yaptıkları çalışmada, elde ettikleri eksozomların karakterizasyon analizleri için CD63, CD9 ve CD81 yüzey belirteçlerinin hem western blot hem de flow sitometrik analizlerini yapmışlardır. Western blot yöntemi ile CD9, CD63, Alix ve TSG101 gibi bazı ekzomal belirteçlerin eksprese edildiğini gösterdi. Flow sitometrik karakterizasyon analizlerine göre, göbek kordonu MKH'lerinden izole edilmiş eksozomların yüzey belirteçleri sırasıyla CD9 (%88.8±6.1), CD63 (%98.1±1.2), CD81 (%91,7±3.6) olarak tespit edilmiştir [343].

2020 yılında yapılan bir çalışmada, HS-5 hücrelerinden elde edilen eksozomların boyutları 139 ± 6 nm olarak ölçülmüş ve TEM analizi ile eksozomun ana morfolojik özelliği olan kap şekli gözlemlenmiştir [344]. Başka bir çalışmada, fetal dermal mezenkimal kök hücrelerden eksozomlar elde edilmiş ve elde edilen eksozomların boyutları 100 nm olarak belirlenmiştir [345]. Sokolova ve arkadaşlarının 2011 yılında 3 farklı hücre hattından elde ettikleri eksozomların karakterizasyon analizlerini yaptıkları çalışmada NTA analizi ve SEM sonuçları karşılaştırılmıştır. Embriyonik böbrek hücre hattı HEK 293T, primer insan mezenkimal kök/stroma ve primer endotel koloni oluşturan hücreler (ECFC)'den elde ettikleri eksozomlar kullanılmıştır. NTA analizinden elde edilen sonuçlara göre eksozomların boyutu, HEK eksozomları için yaklaşık 120 nm, ECFC eksozomları için 110 nm ve MKH eksozomları için 110 nm olarak tespit edilmiştir. SEM analizi ile tüm hücre hatlarından elde edilen eksozomların cup-shape modeline sahip oldukları kanıtlanmıştır [346]. Eksozom karakterizasyonu için çalışmamız sonucunda elde edilen SEM ve NTA analizleri literatürde elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir [347].

Gelişmekte olan ülkelerde patojenik mikroorganizmalar, mantar ve bakteri suşları, bağışıklığı baskılanmış hastalarda mortalite ve morbiditeye yol açan yaşamı tehdit eden enfeksiyonların ana nedenidir [348]. Piyasada bu mikropları öldürebilen veya bu mikropların büyümesini engelleyebilen ve patojenik mikroorganizmaların kontrolünü sağlayan birçok antibiyotik ve antimikrobiyal ajan mevcuttur. Ama

sorun şu ki, birçok mikrop birden fazla ilaca dirençli olmasına rağmen bu mikroplar ilaçlara karşı her geçen gün daha dirençli hale gelmektedir. Bu nedenle, hastalığa neden olan ve çoklu ilaca dirençli mikropların çeşitli antibiyotiklerle tedavisi, halk sağlığı üzerinde çok büyük bir tehdit oluşturmaktadır [349, 350]. Patojenlerin öldürülmesiyle birlikte bu ilaçlar da çeşitli yan etkilere neden olabilir. Bu nedenle, doğal, daha güvenli ve daha ucuz antifungal ve antibakteriyel ajan kaynaklarına ihtiyaç vardır.

Aloe-emodin ve aloe vera'nın yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini topikal uygulama ile analiz eden çalışmalar olmasına rağmen KL vakalarındaki etkileri araştırılmamıştır. Ancak mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlar, kök hücrelerin izolasyon yöntemlerinin zor olması ve sınırlı tedarik sorunları nedeniyle aynı çalışmalarda etkin bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. İzole edildikleri hücrelerin kökenlerine ve özelliklerine göre belirli özelliklere sahip olan eksozomlar, yara iyileştirme çalışmalarında da kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarda MSC'lerin farklı hastalıklardan kaynaklanan kronik cilt yaralarının iyileşmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiş ve ayrıca MSC'lerin hasarlı ciltlerin onarımı ve yenilenmesinde umut verici kaynaklar olduğu kök hücre çalışmalarının artmasıyla daha fazla kanıtlanmıştır. Dokular. Kutanöz yara iyileşmesi, inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma basamaklarını içeren fizyolojik süreçleri içerir. Hücreler arası etkileşimleri artırarak cilt bütünlüğünün yeniden sağlanması amaçlanır [351].

Leishmaniasis, Leishmania cinsi protozoan parazitlerinin neden olduğu ve flebotomin tatarcık tarafından bulaşan vektör kaynaklı bir hastalıktır [352]. Bazı çalışmalarda virüs, mantar ve bakteri gibi birçok mikroorganizma üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca antikanser aktivite özelliği ile nöroektodermal tümörler ve hepatom üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [353]. Dalimi ve ark. 2015 yılında, aloe-emodin enfekte makrofajlarındaki amastigot parazitlerinin sayısının artan doz ve zamanla azaldığını bulmuşlardır [308]. Bazı çalışmalarda aleo-emodin kaynağı olan aleovera'nın konak hücre makrofajlarını aktive ederek antileishmanial etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organlardaki parazit oranının %90 oranında azaldığı belirlendi [354]. Çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda eksozom ve aloe emodin antileishmanial

etkileri ayrı ayrı ve kombinasyon halinde incelenmiştir. Antipromastigot ve antiamastigot etkileri ayrı ayrı analiz edildiğinde, her iki durumda da eksozom ve aloe-emodin konsantrasyonlarının artan doz ve zamanla parazit sayısında önemli bir azalmaya ve makrofajlarda amastigot form parazitlerinin sayısında önemli bir azalmaya neden olduğu kanıtlanmıştır.

Salisilik asit, bir monohidroksibenzoik asit, bir tür fenolik asit ve bir beta hidroksi asittir. Salisin metabolizmasından elde edilir. Aspirinin aktif bileşenine (asetilsalisilik asit) kimyasal olarak benzer ancak aynı olmayan bir bileşik olmasının yanı sıra, muhtemelen en iyi akne tedavisinde kullanımı ile bilinir. Salisilik asidin tuzları ve esterleri salisilatlardır. Kimyasal olarak salisilik asit, bir hidroksil grubu veya fonksiyonel türevleri ile aromatik bir halkaya sahip çeşitli bitki fenolikleri grubuna aittir. Serbest salisilik asit, 157-159°C'de eriyen kristal bir tozdur. Suda orta derecede çözünür, ancak polar organik çözücüler içinde oldukça iyi çözünmektedir. Salisilik asit, bitkilerde doğal olarak bulunan bir sinyal molekülüdür ve çeşitli patojenlerin neden olduğu enfeksiyona karşı savunma görevi görür. Salisilik asit içeren bitki ham özleri, insanlar için bir çeşit tıbbi ajan olarak kullanılmıştır. Literatürde salisilik asit ve türevleri ile ilgili çeşitli patentler bulunmaktadır. Patentlerin çoğunda romatizmal ateş, grip veya diğer viral enfeksiyonlarla bağlantılı semptomlar, soğuk algınlığı, bel ve boyun ağrısı, baş ağrısı, diş ağrısı, burkulma ve incinmeler, miyozit, nevralji, sinovit, artrit, bursit, yanıklar, cerrahi sonrası yaralanmalar gibi birçok prosedürde etkili olduğunu göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda da salisilik bileşiklerin kozmetik veya dermatolojik aktif ajanların aktivitesini güçlendirmeyi de mümkün kıldığı belirtilmektedir.

Bir sonraki adımda, toksik olmayan salisilik asit ve eksozom konsantrasyonları birleştirildi ve *L. majör* promastigotlar ve amastigotlar üzerine uygulandı. Daha önce salisilik asidin antileishmanial etkileri çok sayıda klinik öncesi ve klinik çalışmada sergilendi. Nahrevanian ve ark. 2012 yılında, *L. major* ile enfekte olmuş farelerin tedavisi için asetil salisilik asit (ASA) oral yoldan uygulandı. Çalışmanın temel amacı, ASA'nın farelerde NO üretimi üzerine etkisini, *L. majör* lezyonunu değiştirme kapasitesini, amastigot oluşumu ve proliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemektir. Amastigotları saptamak için karaciğer, dalak ve lenf düğümleri kullanıldı. Çalışma

sonucunda kontrol grubuna göre ASA verilen farelerde plazmadaki NO miktarının arttığı ve makrofajlardaki amastigotların azaldığı belirlendi. Ayrıca histolojik çalışmalar sonucunda hepato/splenomegali ve lezyon boyutlarını azalttığı belirlenmiştir [355]. Nilforoushzadeh ve arkadaşlarının çalışmasında, akut kutanöz leishmaniasisli 75 hasta üzerinde glukantim hem tek başına hem de kombine bir tedavi olarak (glikolik asit %70 ve salisilik %20) kullanılmıştır. Tedavi 8 hafta süreyle uygulandı ve süre sonunda glukantimin tek başına uygulandığı grupta iyileşme oranı %37,3 iken, glukantim ve glikolik asit ve salisilik verildiği grupta iyileşme oranı %42,7 oldu [356]. 2019 yılında yapılan bir başka çalışmada KL olgularında lezyon bölgelerine ASA pedleri ile birlikte metrinadazol solüsyonu uygulanmıştır. 2-18 yaş arası 85 hasta ile yapılan çalışmanın sonuçları incelendiğinde en yüksek iyileşmenin 6-10 yaş arası çocuklarda olduğu belirlendi [357]. Bu sonuçlar, salisilik asidin başka bir biyoaktif molekül ile birlikte uygulandığında üstün anti-leishmanial performans sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada da benzer şekilde salisilik asit ve eksozom kombinasyonlarının, bu ajanların tek başına kullanımına kıyasla *L. majör* promastigotlar ve amastigotlar üzerinde çok daha fazla inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Nahrevanian ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada yukarıda özetlenen bilgilere ek olarak NO analizi yapılmış ve ASA uygulaması yapılan farelerde NO üretiminin arttığı tespit edilmiştir [355]. Yapılan bu çalışmada, salisilik asitin makrofaj ve enfekte makrofaj hücrelerinde NO üretimine etkisi analiz edilmiş fakat iki farklı hücre hattında da tüm dozlarda anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Fakat, salisilik asit ve aleo-emodin eksozom ile kombin olarak uygulandığı dozlarda NO üretimini anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonunda, yara iyileştirme konusunda başarısı kanıtlanmış salisilik asit ve aleo-emodin eksozom ile kombin uygulanması sonucunda üretilen NO miktarı, bu maddelerin tek başına uygulanarak üretilmesini sağladığı NO miktarından daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Kutanöz rejenerasyon, hasarlı bir bölgedeki epidermal hücreler, dermal hücreler, büyüme faktörleri, hücre dışı matris (ECM), sinirler ve kan damarlarını içeren bir dizi koordineli etkileşim gerektiren dinamik ve karmaşık bir süreçtir. İyileşmenin dört aşaması vardır: hemostaz, iltihaplanma, çoğalma ve yeniden şekillenme. Hemostaz sırasında kanama, vazokonstriksiyon ve inflamatuvar aşamasında gelen

bağımsızlık hücreleri için bir iskele görevi gören bir fibrin pıhtısı oluşumu yoluyla durdurulur. Normal iyileşen yaralarla karşılaştırıldığında, kronik yaralar artmış proinflatuar sitokinler, proteazlar, reaktif oksijen türleri (ROS) ve yaşlanmış hücreler ve azalmış bir kök hücre popülasyonu sergiler [358]. Yara iyileşmesini desteklemek için kök hücre tedavilerinin kullanılmasına büyük ilgi vardır. Kök hücreler, kendi kendini yenileme yetenekleri ve çok yönlülükleri veya birden fazla hücre tipine farklılaşma yetenekleri ile tanımlanır. İmmünomodülasyon ve rejenerasyonda yer alan sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgıladıkları gösterilmiştir, bu da onları kronik yaralarda gözlenen altta yatan biyolojik eksiklikleri düzeltmek için umut verici bir ajan yapar [359]. Anjiyogenezi, immünomodülasyonu ve endojen doku kök/progenitör hücrelerinin fonksiyon görmesi, farklılaşmayı destekleyen faktörlerin salınımı gibi parakrin sinyalleme, MKH'lerin pozitif yara iyileştirici etkilerinin altında yatan olası mekanizmalar olarak tanımlanmıştır [360,361]. Mevcut MKH kaynaklarından farklı olarak göbek kordonu, MKH'leri izole etmek için uygun maliyetli, üretken, uygulanabilir, kabul edilen ve evrensel bir kaynağı temsil etmektedir. Kemik iliği kaynaklı MKH ve yağdan türetilen MKH'ler ile karşılaştırıldığında avantajlı olarak kabul edilir. Keçilerden izole edilen WJ-MKH'lerin aynı türden hayvanlarda yara kapanmasını hızlandırırken granülasyon dokusunu ve iltihabı en aza indirdiği gösterilmiştir [362]. Çıplak farelerde 5 mm çapında tam kalınlıkta cilt kusurlarının yara bölgelerine doğrudan göbek kordonu kanı kökenli-MKH ve WJ-MKH'leri enjekte ettikten sonra zamanla yaraların kapandığını kaydetti. Makroskopik incelemeler sonucunda, yaralar 7. günde neredeyse tamamen kapanmıştır ve tedaviden 14 gün sonra yara dokusu olarak görünmektedir. 14 günlük takip süresi boyunca gruplar arasında yara kapanma hızında belirgin bir fark görülmemiştir. Kantitatif analiz, ölçülen yara alanının, 1. ve 3. günlerde kontrol tedavisi alan farelerle karşılaştırıldığında, göbek kordonu kanı kaynaklı MKH veya WJ-MKH uygulanan farelerde biraz daha küçük olduğunu göstermiştir, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ayrıca tedaviden 14 gün sonra skar alanının görsel analizleri sonucu, gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir [363].

İnsan kemik iliği MKH-eksozomlarının ve çene kemiği iliği MKH-eksozomlarının kutanöz yara iyileşmesini desteklediği ve makrofaj M2 polarizasyonu yoluyla bronkopulmoner displazi (BPD) iyileştirdiği [364] bildirilmiştir. Ayrıca, çeşitli

MKH'lerden türetilen eksozomlar, kutanöz yaraların yanı sıra diğer inflamatuvar hastalıklarda M2 makrofajlarının aktivasyonunu teşvik etmede de önemli bir rol oynar. Fare kemik iliği kökenli MKH'lerden elde edilen eksozomların, *in vivo* makrofaj M2 polarizasyonu yoluyla aterosklerozdaki iltihabı hafiflettiği bulunmuştur [365]. MKH-eksozomları ayrıca T hücrelerinin fonksiyonlarını veya aktivitelerini de modüle eder. Kemik iliği kökenli MKH'lerden elde edilen eksozomların Th1'i Th2'ye dönüştürdüğü ve PBMC'lerde Th17 farklılaşmasını azalttığı bildirildi [366]. İnsan kemik iliği kökenli MKH'lerden elde edilen eksozomların, deri yaşlanmasını önlemeye ve tedavi etmeye yardımcı olabilecek farelerde fotoyaşlanmayı ve iltihabı azalttığı bildirildi [367]. Birlikte ele alındığında, MKH-eksozomları, anti-inflamatuvar özelliklere sahip makrofaj M2 polarizasyonunu teşvik ederek ve M1 makrofajlar ve inflamatuvar dendritik epidermal hücreler (IDEC'ler) gibi pro-inflamatuvar sitokin salan hücreleri azaltarak cilt yenilenmesinde kilit oyuncularındır. Doi ve ark. 2016 yılında göbek kordon kanı ve wharton jelinden mezenkimal kök hücreler elde edilmiş ve bu hücrelerin yara iyileşmesine etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Farelerin 5 mm tam kalınlıkta yarası olan bölgelerine aynı miktarda göbek kordonu-MKH ve WJ-MKH uygulanmış ve yara iyileşme potansiyelleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre tedavi gruplarında yara alanı yüzdesi karşılaştırıldığında, WJ-MKH grubunda iyileşme görüldü ancak bu fark anlamlı bulunmadı. [324]. MKH'lerin cilt yaraları üzerindeki etkisini gösteren başka bir çalışmada, MKH tarafından salgılanan sitokinler ve büyüme faktörlerinin enjeksiyon ve topikal uygulama sonucunda yara iyileşmesi için yeterli olduğu gösterilmiştir [183]. Nie et al. sıçan yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin EGF-A, HGF ve fibroblast büyüme faktörü-2 eksprese ettiğini ve bu hücrelerin yara iyileşmesinde etkili olduğunu göstermiştir [368].

Bir çalışmada 3 farklı mezenkimal kök hücre kaynağından (göbek kordonu, kemik iliği ve yağ dokusu) elde edilen eksozomların hücre göçü üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Dermal fibroblast ve keratinosit hücreleri, farklı eksozom konsantrasyonları ile tedavi edildi. Göbek kordonundan izole edilen MKH'lerden elde edilen 20 µg uygulanan eksozom dozunun, fibroblast göçü üzerinde kemik iliği kökenli MKH'lerden elde edilen 10 ve 20 µg eksozom dozlarından daha yüksek indüksiyon sergilediğini bulmuşlardır. Bununla birlikte, göbek kordonu MKH'lerden gelen eksozomların keratinosit göçünde diğer eksozomlardan daha etkili olduğunu

bulmuşlardır [369]. Başka bir çalışmada, insan mikrovasküler endotel hücreleri ile yapılan yaralarda eksozom partiküllerinin etkisi araştırılmıştır. Göbek kordonundan elde edilen 2 farklı eksozom dozu incelendiğinde partikül sayısı arttıkça hücre göçü artmış ve yara bölgesi kapanmıştır [370]. Başka bir çalışmada, birincil insan dermal fibroblastlarında oluşturulan yara bölgesindeki kapatma etkinliğini incelemek için adipoz dokudan elde edilen 0, 25, 50, 100 µg/ml dozlarında eksozomlar kullanıldı. Fibroblast hücre göçünün 12. ve 24. saatlerde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi [371].

Bin Zhao et al. 2017 yılında insan amniyotik epitel hücrelerinden türetilen eksozomların yara iyileştirme kapasitesini inceledi. 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL'lik eksozom örnekleri, toplam hacim 100 µL olan PBS içinde hazırlandı ve yaranın çevresine deri altından enjekte edildi. Sonuçlara göre eksozom grubunda yaralanma sonrası 14. günde yara PBS grubuna göre önemli ölçüde kapandı. Ek olarak, yüksek konsantrasyonlu eksozom tedavisi de daha yüksek oranda yara kapanması göstermiştir. Hızlandırılmış yara kapanması ve azaltılmış skar oluşumu yara iyileşmesinin kalitesini değerlendiren parametrelerdir [343]. Li Hu et al. 2016 yılında insan yağ dokusundan izole edilen MKH'lerden elde edilen eksozomlarla farelerde yara iyileştirme kapasitesini inceledi. 200 µg eksozom, 200 µl PBS içinde seyreltildi ve subkutan ve intravenöz olarak iki ayrı uygulama grubu üzerinde çalışıldı. İntravenöz eksozom enjeksiyonu, yaradan sonraki 7. günde %50 kapanma ile sonuçlandı. Yara kapanması 14. günde ~ %75 ve 21. günde ~ %90 düzeyinde tespit edildi [371]. Xiao Wang et al. 2019 yılında fetal dermal kök hücrelerden eksozomlar elde edilmiş ve kutanöz yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamıştır. Fareleri 2 gruba ayırarak ve 200 µl PBS içinde seyrelterek yara bölgelerine deri altından 200 µg eksozom enjekte ettiler. Eksozomla tedavi edilen grupta yaraların kontrol gruplarına göre daha hızlı iyileştiği bulundu. Histolojik boyama sonuçlarına göre, eksozom ile tedavi edilen grubun hücre dışı matriste daha fazla hücreye sahip olduğu ve hücre dışı matris proteinlerinin tedaviden 7 gün ve 14 gün sonra daha kalın bir kollajen tabakası ile kontrol grubuna göre daha düzenli ve yoğun olduğu gösterildi [345]. Yin Hu ve ark. 2018 yılında 12 haftalık erkek C57BL / 6 fareyi (26-30 gr) tıraş ettikten sonra sırtta iki tam kalınlıkta (12 mm çapında) eksizyonel cilt yarası oluşturuldu. Yirmi fare rastgele iki tedavi grubuna ayrıldı; göbek kordonundan türetilen eksozomlar (200 ug 100 uL PBS içinde çözölmüş)

veya eşit hacimde PBS ile deri altından enjekte edildi. Bu çalışmanın sonucunda, eksozomlarla tedavi edilen farelerin yaraları hızla kapatıldı ve PBS ile tedavi edilen kontrol grubuna kıyasla yaralanmadan 2, 5 ve 8 gün sonra daha küçük yara alanları ölçüldü [337]. 2015 yılında Jieyuan Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçanlar tıraş edildikten sonra sırt derisinde 18 mm çapında 3 yara oluşturuldu. Sıçanlar rastgele 3 farklı tedavi grubuna ayrıldı ve yaralı bölgelere PBS (tedavi edilmeyen grup), MesenGro hMSC ortamı (kontrol grubu) veya hiPSCMSC-Exos (deney grubu) ile deri altından enjekte edildi. Elde edilen sonuçlara göre, yara oluşturulduktan sonra 4., 7. ve 14. günlerde kontrol edildiğinde hiPSC-MSC-Exos ile tedavi edilen sıçan grubunun kontrol ve tedavi edilmeyen gruplara göre daha fazla yara kapanması gösterdiği bulundu. [372]. Adolf Geiger ve ark. 2015 yılında genetik olarak diyabetik B6. Leprdb / db fareler (11 ila 12 haftalık) ile yara kapatma çalıştı. Bir biyopsi zımbası kullanılarak dorsal orta hattın her iki tarafında yaralar yapılmıştır. Uyarılmış insan fibrositleri tarafından salgılanan eksozomlar, yara bölgelerine 0,5 veya 50 ug ile 200ul PBS içinde enjekte edildi ve yara kapanma potansiyeli incelendi ve eksozomlarla tedavi edilen gruplarda konsantrasyona bağlı olarak artan yara kapanması bulundu. Eksozomla tedavi edilen yaralarda fare endotelyal antijen (MECA-32) içeriğinde doza bağlı güçlü bir artış gösterilmiştir. Ayrıca doza bağlı olarak tip 1 kollajen ve α -SMA proteinlerinin arttığı bulundu [338]. Xiacong Li ve ark. 2016 yılında eksozomların yara iyileşmesi üzerindeki etkisini belirlemek için sıçanlarda tıraş sonrası 2,0 cm uzunluğunda ve 0,2 cm derinliğinde bir eksizyon yarası oluşturulmuştur. Sıçanlar rastgele 2 farklı tedavi grubuna ayrıldı ve bir gruba 100 μ L PBS (kontrol grubu) ve diğer gruba endotel progenitör hücrelerden elde edilen eksozomlar (EPC-Exos) (100 μ g) enjekte edildi. Tip 1 diyabetli bir hayvan modelinde yara iyileşme potansiyelinin incelenmesiyle elde edilen sonuçlar, EPC-Exos ile tedavi edilen sıçanların kontrol gruplarına kıyasla 7. ve 14. günlerde daha yüksek oranda yara iyileşmesi sağladığını göstermektedir. Tip 1 diyabetli bir hayvan modelinde yara iyileşme potansiyelinin incelenmesiyle elde edilen sonuçlar, EPC-Exos ile tedavi edilen sıçanların kontrol gruplarına kıyasla 7. ve 14. günlerde daha yüksek yara iyileşmesi oranına sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara ek olarak, eksozom grubunda yara uzunluklarının kontrol grubuna göre önemli ölçüde kısaldığı belirlendi. Bu sonuçlarla eksozomun diyabetik yaraların tedavisinde tedavi edici bir araç olarak kullanılabileceği

gösterilmiştir [373]. Eksozomun yara iyileşmesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise sıçanların sırtlarında 1.5 cm çapında yuvarlak, tam kat deri yaraları oluşturuldu. Yaraların oluşturulduğu gün (0. gün), diyabetik yara bölgelerine 1 ml PBS, 1 ml düşük konsantrasyonlu Exos, yüksek konsantrasyonlu Exos ve LPS (10µg/mL) kombinasyonu subkutan enjeksiyon ile enjekte edildi ve günlerde yara iyileşmesi analiz edildi. 7, 14 ve 21. Diyabetik yara azalma oranı sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 7 gün sonunda yüksek konsantrasyonlarda 1 mg/mL eksozom için PBS için %18, eksozom için %64 ve %81 olarak bulundu. Tedavinin 14. gününde hem düşük hem de yüksek eksozom grubundaki yaralar tamamen iyileşti; her iki grupta da yara boyutundaki azalma %94'ün üzerindeydi. Elde edilen sonuçlar, eksozomun yara boyutunu küçültmede ve iyileşme sürecinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir [374]. Chen ve arkadaşlarının 2018 yılında insan idrarından elde ettikleri eksozomlarla yaptıkları çalışmada in vitro yara iyileşme kapasitesi ve diyabetik fare modelleri üzerinde in vivo yara iyileşmesi üzerine deneyler yapmışlardır. In vitro çalışmada endotelial hücreler ile yapılan yaralar üzerinde idrardan elde edilmiş eksozomların etkinliği 6-12 saat boyunca incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, eksozom grubunda elde edilen yara kapanma alanı kontrol grubuna kıyaslandığında anlamlı bir fark tespit edilmiş ve eksozom uygulanan gruplarda yara alanının daha iyi kapandığı tespit edilmiştir [375]. Gao ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada insan amniyon mezenkimal kök hücrelerinden elde ettikleri eksozomal miR-135a'nın yara iyileşmesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. SD sıçanlar ile yapılan in vivo yara iyileşmesi çalışmalarında insan amniyon mezenkimal kök hücrelerini düşük-orta ve yüksek yoğunluk olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda yara bölgesine enjekte ederek 15 gün boyunca takip etmişlerdir. Ayrıca, 2. deney programında MiR-135a'yı aşırı eksprese eden eksozomlar doğrudan yara bölgesine enjekte edilmiş ve 15 gün boyunca takip edildikten sonra yara bölgeleri histolojik çalışmalar için fikse edilmiştir. Deneylere ek olarak, miR-135a'nın aşırı ekspresyonu veya ekspresyonun engellendiği durumlarda hücre göçünün nasıl etkilendiği analiz edildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, hücre yoğunluğunun fazla olduğu deney grubundaki iyileşme oranı kontrol grubu ile kıyaslandığında hücrelerin iyileşmeyi önemli derecede etkilediği tespit edilmiştir. Ek olarak, miR-135a'nın ekspresyonunun

engellenmesi ile, eksozomların hücre göçü üzerindeki teşvik edici etkisini etkili bir şekilde azalttığı belirlenmiştir

Bu çalışmada, *in vitro* koşullar altında farklı eksozom, aleo-emodin ve salisilik asit konsantrasyonlarının yara iyileştirme potansiyeli de araştırıldı. Daha önceki çalışmalarda detaylı olarak bahsedilen eksozom çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde, eksozomun hem tek başına hem de cilt bakımında uzun yıllardır kullanılan aleo-emodin ve salisilik asit ile birlikte kullanıldığında yara iyileşmesinde önemli bir artış gözlemlendi. Eksozomun aleo-emodin ve salisilik asit ile birlikte kullanılmasıyla daha etkili bir iyileşme oranı elde edildi. Elde edilen bu veriler sonucunda KL sonucu ciltte oluşan yaraların tedavisinde eksozom ve kombin formülasyonların alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında;

- Bu çalışma hem salisilik asit ve aleo-emodin hem de WJ kökenli eksozomların anti-leishmanial etki gösterdiğini kanıtlamıştır.
- Bununla birlikte, birlikte kullanıldıklarında etkinliklerinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir.
- Eksozom-salisilik asit kombinasyonlarının antileishmanial etkinliğinin daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır.
- Her iki kombinasyonun da yara iyileştirici özelliklerinin son derece yüksek olduğu tespit edilmiştir.
- Eksozomların yara onarım performansları göz önüne alındığında, bu kombinasyonların sadece yaralardaki parazitleri inhibe etmekle kalmayacağı, aynı zamanda defektli dokuların rejenerasyonunu da artıracığı tarafımızca düşünülmektedir.
- Bu kombinasyonun Kutanöz Leishmaniasis tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirileceğini umut ediyoruz.

- [1] F.J. Andrade-Narváez, et al. "Clinical picture of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol.96, 163-167, 2001.
- [2] M. Kashif, P Manna, P., Y. Akhter, M. Alaidarous, and A. Rub, "Screening of novel inhibitors against *Leishmania donovani* calcium ion channel to fight leishmaniasis," *Infectious Disorders-Drug Target, (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)* vol.17.2, 120-129, 2017.
- [3] C.L. Hoyos, S.P. Cajal, M. Juarez, J.D. Marco, A.M. Alberti D'Amato, M. Cayo, I. Torrejón, R.O. Cimino, P. Diosque, A.J. Krolewiecki, and J.R. Nasser, "Epidemiology of American tegumentary leishmaniasis and *Trypanosoma cruzi* infection in the Northwestern Argentina," *BioMed research international*, 2016.
- [4] E. Torres-Guerrero M.R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud and R. Arenas, "Leishmaniasis: a review," *F1000Research* vol. 6, 2017.
- [5] D. Corbeil, L. Aurelio, "Exosomes, microvesicles, and their friends in solid tumors." *Exosomes*. Academic Press, 39-80, 2020.
- [6] A.M. DeLeo, I. Tsuneya, "Extracellular vesicle biology in Alzheimer's disease and related tauopathy," *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, vol. 13.3, 292-308, 2018.
- [7] M.M. Kamal, H. K. Dina, "Therapeutic potential of Wharton's jelly mesenchymal stem cells for diabetes: achievements and challenges." *Frontiers in cell and developmental biology*, vol. 8, 16, 2020.
- [8] C. Seongwon, C. Myung-Hee, "A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects," *Seminars in Integrative Medicine*, vol.1.1, 53-62. 2003.
- [9] T. Reynolds, A.C. Dweck, "Aloe vera leaf gel: a review update," *J Ethnopharmacol*, vol.68, 3-37, 1999.
- [10] J.E. Dunphy, "Modern biochemical concepts on the healing of wounds: Wound healing," Baltimore, MD, Williams and Wilkins, pp 22-31, 1974.
- [11] R.H. Davis, G.J. Stewart, P.J. Bregman, "Aloe vera and the inflamed synovial pouch model," *J Am Podiatr Med Assoc*, 82:140-148, 1992.
- [12] R.H. Davis, J.J. DiDonato, R.W. Johnson, C.B. Stewart, "Aloe vera, hydrocortisone, and sterol influence on wound tensile strength and anti-inflammation," *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 84(12), pp.614-621, 1994.

- [13] P. Chithra, G.B. Sajithlal, G. Chandrakasan, "Influence of Aloe vera on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats," *Indian Journal of Experimental Biology*, 36(9), pp.896-901, 1998.
- [14] J.E. Thompson, "Topical use of aloe vera derived allantoin gel in otolaryngology," *Ear, nose, & throat journal*, 70(2), pp.119-119, 1991.
- [15] P. Chithra, G.B. Sajithlal, G. Chandrakasan, "Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats," *Mol Cell Biochem*, vol. 181, 71-76, 1998.
- [16] P. Chithra, G.B. Sajithlal, G. Chandrakasan, "Influence of Aloe vera on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats." *J Ethnopharmacol*, vol. 59, 179-186, 1998.
- [17] R.H. Davis, K.Y. Rosenthal, L.R. Cesario and G.A. Rouw, "Processed Aloe vera administered topically inhibits inflammation," *Journal of the American Podiatric Medical Association*, vol. 79(8), pp.395-397, 1989.
- [18] M. Rodriguez-Bigas, N.I. Cruz, A. Suarez, "Comparative evaluation of Aloe vera in the management of burn wounds in guinea pigs," *Plast Reconstr Surg*, vol. 81, 386-389, 1988.
- [19] J.P. Heggers, R.P. Pelley, D.P. Hill, et al: Wound healing with aloe substances. *Academic/Industry Joint Conference*, p 41, 1992.
- [20] D. Ekinçi, M. Sentürk, Ö.İ. Küfrevioğlu, "Salicylic acid derivatives: synthesis, features and usage as therapeutic tools," *Expert opinion on therapeutic patents*, vol.21(12), pp.1831-1841, 2011.
- [21] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M.D. Boer, and WHO Leishmaniasis Control Team, "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence," *PloS one*, 7(5), p.e35671. 2012.
- [22] P.J. Hotez, J.H. Remme, P. Buss, G. Alleyne, C. Morel, J.G. Breman, "Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project," *Clinical infectious diseases*, vol.38(6), pp.871-878, 2004.
- [23] J. Alvar, S. Yactayo, and C. Bern, "Leishmaniasis and poverty," *Trends in parasitology*, vol. 22(12), pp.552-557, 2006.
- [24] S.E. Randolph, "To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases?" *Veterinary parasitology*, 167(2-4), pp.92-94, 2010.
- [25] K. Senior, "Vector-borne diseases threaten Europe," *Lancet Infect Dis*, vol.8(9), 531-2, 2008.

- [26] P. Desjeux, "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide," *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, vol. 95(3), pp.239-243, 2001.
- [27] P. Desjeux, "Leishmaniasis: current situation and new perspectives," *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, vol. 27(5), pp.305-318, 2004.
- [28] H.W. Murray, J.D. Berman, C.R. Davies, and N.G. Saravia, "Advances in leishmaniasis," *The Lancet*, 366(9496), pp.1561-1577, 2005.
- [29] J.H. Remme, E. Blas, L. Chitsulo, P.M. Desjeux, H.D. Engers, T.P. Kanyok, J.F.K. Kayondo, D.W. Kioy, V. Kumaraswami, J.K. Lazdins, and P.P. Nunn, "Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective," *Trends in parasitology*, vol. 18(10), pp.421-426, 2002.
- [30] M.C., De Almeida, V. Vilhena, A. Barral, and M. Barral-Netto, "Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 98(7), pp.861-870, 2003.
- [31] E.N. Loría-Cervera, F.J. Andrade-Narváez, "Animal models for the study of leishmaniasis immunology," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 56, pp.1-11, 2014.
- [32] H. Çetin, Y. Özbel, "Kum sinekleri (Yakarca, Tatarcık) ve kontrol yöntemleri," *Türkiye Parazitoloj Derg*, vol.41,102-113, 2017.
- [33] R. Mosayeb, H.M. Niknam, "Leishmania tropica: What we know from its experimental models." *Advances in parasitology*, vol.104, 1-38, 2019.
- [34] M. Abbasi, D. Pal, D. Mondal, B. Anu Varghese, R. Paul, S. Singh, R. Datta, "Carbonic Anhydrase in Acid Acclimatization of Leishmania", 2018.
- [35] G. Cohen-Freue, T.R. Holzer, J.D. Forney, W.R. McMaster, "Global gene expression in Leishmania," *International journal for parasitology*, vol.37(10), pp.1077-1086, 2007.
- [36] N. Peters, D. Sacks, "Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. *Immunological reviews*, vol. 213(1), pp.159-179, 2006.
- [37] T. Lang, H. Lecoœur, E. Prina, "Imaging Leishmania development in their host cells," *Trends in Parasitology*, 25(10), pp.464-473, 2009.
- [38] N. Maspi, A. Abdoli, F. Ghaffarifar, "Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review," *Pathogens and global health*, vol.110(6), pp.247-260, 2016.
- [39] P. Kaye, P. Scott, "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface," *Nat Rev Microbiol*, vol.9(8), 604–15, 2011.

- [40] D. Sacks, S. Kamhawi, "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annual reviews in microbiology, vol. 55(1), pp.453-483, 2001.
- [41] P. Scott, F.O. Novais, "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis," *Nature Reviews Immunology*, vol. 16(9), pp.581-592, 2016.
- [42] M.S. Bailey, D.N. Lockwood, "Cutaneous leishmaniasis," *Clinics in dermatology*, 25(2), pp.203-211, 2007.
- [43] L. Basmaciyan, M. Casanova, "Cell death in Leishmania," *Parasite*, 26, 2019.
- [44] M.S. Gurel, B. Tekin, S. Uzun, "Cutaneous leishmaniasis: A great imitator," *Clinics in dermatology*, vol. 38(2), pp.140-151, 2020.
- [45] S. Sasidharan, P. Saudagar, "Leishmaniasis: where are we and where are we heading?" *Parasitology Research*, pp.1-14, 2021.
- [46] M. Karakuş, M.A. Öktem, M. Sözen, F. Matur, F. Çolak, M. Nalçacı, Y. Özbel, S. Töz, "First molecular detection and identification of Leishmania species in small wild rodents from Turkey," *Parasitology*, vol. 147(10), pp.1088-1093, 2020.
- [47] M.A. Ghatee, W.R. Taylor, M. Karamian, "The geographical distribution of cutaneous leishmaniasis causative agents in Iran and its neighboring countries, a review," *Frontiers in public health*, 8, p.11, 2020.
- [48] F. Norouzinezhad, F. Ghaffari, A. Norouzinejad, F. Kaveh, and M.M. Gouya, "Cutaneous leishmaniasis in Iran: results from an epidemiological study in urban and rural provinces," *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, vol. 6(7), pp.614-619, 2016.
- [49] C. Karimkhani, V. Wanga, L.E. Coffeng, P. Naghavi, R.P. Dellavalle, and M. Naghavi, "Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013," *The Lancet Infectious Diseases*, 16(5), pp.584-591, 2016.
- [50] A. Özbilgin, S. Töz, M. Harman, S.G. Topal, S. Uzun, F. Okudan, D. Güngör, A. Erat, H. Ertabaklar, S. Ertuğ, and C. Gündüz, 2019, "The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey," *Acta tropica*, 190, pp.59-67, 2019.
- [51] N.Y. Doni, G. Gurses, R. Dikme, M. Aksoy, F.Y. Zeyrek, Z. Simsek, A.R. Satoskar, S. Varikutu, and Y. Yesilova, "Cutaneous leishmaniasis due to three Leishmania species among Syrian refugees in Sanliurfa, Southeastern Turkey," *Acta Parasitologica*, 65(4), pp.936-948, 2020.
- [52] N., Maspi, A. Abdoli, and F. Ghaffarifar, "Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review," *Pathogens and global health*, vol.110(6), pp.247-260, 2016.

- [53] N. Aronson, "Cutaneous leishmaniasis: Clinical manifestations and diagnosis," *Revista Up To Date. USA*. 2017.
- [54] S. Joshi, B.L. Bajracharya, and M.R. Baral, "Kala-azar (visceral Leishmaniasis) from Khotang," *Kathmandu University medical journal (KUMJ)*, 4(2), pp.232-234. 2006.
- [55] B.S. Mcgwire, and A.R. Satoskar, "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment," *QJM: An International Journal of Medicine*, vol.107(1), pp.7-14, 2014.
- [56] M. Calvopina, R.X. Armijos, and Y. Hashiguchi, "Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge-a review," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, pp.663-672, 2004.
- [57] C.I. Brodskyn, and C.I., de Oliveira, "The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection" *Frontiers in immunology*, vol. 3, p.145. 2012.
- [58] M.A. Al-Kamel, "Impact of leishmaniasis in women: a practical review with an update on my ISD-supported initiative to combat leishmaniasis in Yemen (ELYP)", *International journal of women's dermatology*, vol. 2(3), pp.93-101, 2016.
- [59] E.E. Zijlstra, A.M. Musa, E.A.G. Khalil, I.M. El Hassan, and A.M. El-Hassan, "Post-kala-azar dermal leishmaniasis," *The Lancet infectious diseases*, vol. 3(2), pp.87-98, 2003.
- [60] Zijlstra, E.E., "Biomarkers in post-kala-azar dermal leishmaniasis," *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, p.228, 2019.
- [61] WHO, *Control of the Leishmaniases*, WHO Technical Report Series, WHO, Geneva, Switzerland, 2010.
- [62] P. Trouiller, P. Olliaro, E. Torreele, J. Orbinski, R. Laing, and N. Ford, "Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure," *The Lancet*, 359(9324), pp.2188-2194, 2002.
- [63] A.R. Renslo, and J.H. McKerrow, "Drug discovery and development for neglected parasitic diseases," *Nature chemical biology*, 2(12), pp.701-710, 2006.
- [64] V.S. Amato, F.F. Tuon, H.A. Bacha, V.A. Neto and A.C. Nicodemo, "Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment," *Acta tropica*, vol.105(1), pp.1-9, 2008.
- [65] J. van Griensven, M. Balasegaram, F. Meheus, J. Alvar, L. Lynen, and M. Boelaert, "Combination therapy for visceral leishmaniasis," *The Lancet infectious diseases*, 10(3), pp.184-194, 2010.
- [66] P. L. Olliaro and A. D. M. Bryceson, "Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis," *Parasitology Today*, vol.9, no.9, pp.323-328, 1993.

- [67] J. D. Berman, "Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 24, no. 4, pp. 684–703, 1997.
- [68] L. H. Freitas-Junior, E. Chatelain, H. A. Kim, and J. L. Siqueira-Neto, "Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?" *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, vol.2, pp.11–19, 2012.
- [69] T. S. Tiuman, A. O. Santos, T. Ueda-Nakamura, B. P. D. Filho, and C. V. Nakamura, "Recent advances in leishmaniasis treatment," *International Journal of Infectious Diseases*, vol.15, no. 8, pp. e525–e532, 2011.
- [70] S.L. Croft and V. Yardley, "Chemotherapy of leishmaniasis," *Current Pharmaceutical Design*, vol.8, no.4, pp.319–342, 2002.
- [71] S. L. Croft and G. H. Coombs, "Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs," *Trends in Parasitology*, vol.19, no.11, pp.502–508, 2003.
- [72]. Y. Melaku, S. M. Collin, K. Keus, F. Gatluak, K. Ritmeijer, and R.N. Davidson, "Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.77, no.1, pp.89–94, 2007.
- [73] C.P. Thakur, S. Narayan, and A. Ranjan, "Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India," *Indian Journal of Medical Research*, vol.120, no.3, pp.166–172, 2004.
- [74] F. Frezard, C. Demicheli, and R.R. Ribeiro, "Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs," *Molecules*, vol.14, no.7, pp.2317–2336, 2009.
- [75] S. Sundar, "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis," *Tropical Medicine and International Health*, vol.6, no.11, pp.849–854, 2001.
- [76] S. L. Croft, K. Seifert, and V. Yardley, "Current scenario of drug development for leishmaniasis," *Indian Journal of Medical Research*, vol.123, no.3, pp.399–410, 2006.
- [77] S.L. Croft and P. Olliaro, "Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities," *Clinical Microbiology and Infection*, vol.17, no.10, pp.1478–1483, 2011.
- [78] F. Meheus, M. Balasegaram, P. Olliaro et al., "Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.4, no.9, article e818, 2010.
- [79] N. Singh, M. Kumar, and R. K. Singh, "Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets," *Asian BioMed Research International Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol.5, no.6, pp.485–497, 2012.

- [80] P.G. Bray, M.P. Barrett, S.A. Ward, and H.P. DeKoning, "Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future," *Trends in Parasitology*, vol.19, no.5, pp. 232–239, 2003.
- [81] K. Jain and N. K. Jain, "Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis," *Drug Discovery Today*, vol.18, no.23-24, pp.1272–1281, 2013.
- [82] D. Fong, M.M. Y. Chan, R. Rodriguez, L.J. Gately, J.D. Berman, and M. Grog, "Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 51, no. 6, pp. 758–766, 1994.
- [83] A. Jhingran, B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett, and R. Madhubala, "Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol.164, no.2, pp. 111–117, 2009.
- [84] S. Hendrickx, R.A.I. da Luz, V. Bhandari et al., "Experimental induction of paromomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: outcome dependent on in vitro selection protocol," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.6, no.5, Article ID e1664, 2012.
- [85] H. Sindermann, S. L. Croft, K. R. Engel et al., "Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis," *Medical Microbiology and Immunology*, vol.193, no.4, pp.173–180, 2004.
- [86] V. Yeo-Gamarra, C. Rodriguez-Ulhoa, C. Diaz-Velez et al., "Sa1914 sequential versus triple standard therapy for *Helicobacter pylori* eradication," *Gastroenterology*, vol.144, no.5, p.S-333, 2013.
- [87] S. Sundar and P. L. Olliaro, "Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management," *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol.3, no. 5, pp. 733–740, 2007.
- [88] E. Kandil, "Treatment of cutaneous leishmaniasis with trimethoprim sulfamethoxazole combination," *Dermatologica*, vol. 146, no. 5, pp. 303–309, 1973.
- [89] Z. Even-Paz, L. Weinrauch, R. Livshin, J. El-On, and C. L. Greenblatt, "Rifampicin treatment of cutaneous leishmaniasis," *International Journal of Dermatology*, vol.21, no.2, pp.110–112, 1982.
- [90] M.Z. Hossain, "Combination therapy (momomycine and methyluracil) in leishmaniasis cutis," *International Journal of Dermatology*, vol. 27, no. 10, pp. 720–722, 1988.
- [91] P.D. Marsden, C.C. Cuba, A.C. Barreto, R.N. Sampaio, and R.A.A. Rocha, "Nifurtimox in the treatment of South American leishmaniasis," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.73, no.4, pp.391–394, 1979.

- [92] A. Masmoudi, A. Dammak, H. Chaaben, N. Maalej, F. Akrouit, and H. Turki, "Doxycycline for the treatment of cutaneous leishmaniasis," *Dermatology Online Journal*, vol.14, no.8, p.22, 2008.
- [93] D.C. Miguel, J.K.U. Yokoyama-Yasunaka, and S.R.B. Uliana, "Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazo-nensis* infections in mice," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.2, no.6, article e249, 2008.
- [94] D.C. Miguel, R.C. Zauli-Nascimento, J.K.U. Yokoyama-Yasunaka, S. Katz, C.L. Barbieri, and S.R.B. Uliana, "Tamoxifenas a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol.63, no.2, pp.365–368, 2009.
- [95] J. Alvar, S. Croft, and P. Olliaro, "Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis," *Advances in Parasitology*, vol.61, pp. 223–274, 2006.
- [96] F. Astelbauer and J. Walochnik, "Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 38, no. 2, pp. 118–124, 2011.
- [97] D.C. Miguel, J.K.U. Yokoyama-Yasunaka, W.K. Andreoli, R. A. Mortara, and S.R.B. Uliana, "Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* amastigotes," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 60, no. 3, pp. 526–534, 2007.
- [98]. J.V. Richard and K.A. Werbovetz, "New antileishmanial candidates and lead compounds," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol.14, no.4, pp.447–455, 2010.
- [99] M. Hamidi, A. Azadi, and P. Rafiei, "Hydrogel nanoparticles in drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.60, no.15, pp.1638–1649, 2008.
- [100] M. Petitti, M. Vanni, and A. A. Barresi, "Controlled release of drug encapsulated as a solid core: theoretical model and sensitivity analysis," *Chemical Engineering Research and Design*, vol.86, no.11, pp.1294–1300, 2008.
- [101] S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski et al., "The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis," *Science Translational Medicine*, vol.4, no. 119, Article ID 119re1, 2012.
- [102] E.R. Sharlow, D. Close, T. Shun et al., "Identification of potent chemotypes targeting *Leishmania* major using a high-throughput, low-stringency, computationally enhanced, small molecule screen," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.3, no.11, article e540, 2009.
- [103] J. L. Siqueira-Neto, O.-R. Song, H. Oh et al., "Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.4, no.5, article e675, 2010.

- [104] Y. Osorio, B.L. Travi, A.R. Renslo, A.G. Peniche, and P.C. Melby, "Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel ex vivo splenic explant model system," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol.5, no.2, article e962, 2011.
- [105] B.M. Roatt, J.M. de Oliveira Cardoso, R.C.F. De Brito, W. Coura-Vital, R.D. de Oliveira Aguiar-Soares, A.B. Reis, "Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment," *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp.1-13, 2020.
- [106] Y. Taslimi, F. Zahedifard, and S. Rafati, "Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches," *Parasitology*, 145(4), pp.497-507, 2018.
- [107] X. Wang, "Stem cells in tissues, organoids, and cancers," *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(20), pp.4043-4070, 2019.
- [108] M. Denham, B. Conley, F. Olsson, T.J. Cole, and R. Mollard, "Stem cells: an overview" *Current Protocols in Cell Biology*, 28(1), pp.23-1. 2005.
- [109] A. Vats, R.C. Bielby, N.S. Tolley, R. Nerem, J.M. Polak, "Stem cells," *Lancet*, 366:592-602. 2005.
- [110] L.G. Lajtha, "Stem cells and their properties" *Proc Can Cancer Conf* 7:31-39. 1967.
- [111] H.E. Shenghui, D. Nakada, and S.J. Morrison, "Mechanisms of stem cell self-renewal," *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, pp.377-406. 2009.
- [112] V. Falanga, "Stem cells in tissue repair and regeneration," *Journal of Investigative Dermatology*, 132(6), pp.1538-1541, 2012.
- [113] S. Lane, H.J. Rippon, and A.E. Bishop, "Stem cells in lung repair and regeneration," 407-415, 2007.
- [114] N. Fausto, "Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells," *Hepatology*, 39(6), pp.1477-1487, 2004.
- [115] A. Shaker, D.C. Rubin, "Stem cells: one step closer to gut repair," *Nature*, 485:181-182, 2012.
- [116] W. Han, Y. Yu, and X.Y. Liu, "Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration," *Cell research*, 16(2), pp.189-195, 2006.
- [117] A. Angelini, C. Castellani, G. Vescovo, and G. Thiene, "Pathological evidence of stem cell regeneration in the heart," *International journal of cardiology*, 96(3), pp.499-504, 2004.
- [118] M. Mirotsov, T.M. Jayawardena, J. Schmeckpeper, M. Gnechchi, and V.J. Dzau, "Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart," *Journal of molecular and cellular cardiology*, 50(2), pp.280-289, 2011.

- [119] F.C. Mansergh, M.A. Wride, and D.E. Rancourt, "Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair," *Biochemistry and Cell Biology*, 78(5), pp.613-628, 2000.
- [120] L. Bouwens, "Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas," *Microscopy research and technique*, 43(4), pp.332-336. 1998.
- [121] D. Lodi, T. Iannitti, and B. Palmieri, "Stem cells in clinical practice: applications and warnings," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), pp.1-20. 2011.
- [122] G. Kolios, and Y. Moodley, "Introduction to stem cells and regenerative medicine" *Respiration*, 85(1), pp.3-10, 2013.
- [123] J. Rossant, "Stem cells from the mammalian blastocyst," *Stem cells*, 19(6), pp.477-482, 2001.
- [124] M.P. De Miguel, S. Fuentes-Julián, and Y. Alcaina, "Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction," *Stem Cell Reviews & Reports*, 6 (4). 2010.
- [125] M.J. Evans, and M.H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos," *Nature*, 292(5819), pp.154-156, 1981.
- [126] K. Takahashi, and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *Cell*, 126(4), pp.663-676, 2006.
- [127] M.Z. Ratajczak, E. Zuba-Surma, M. Kucia, A. Poniewierska, M. Suszynska and J. Ratajczak, "Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues," *Advances in medical sciences*, 57(1), pp.1-17, 2012.
- [128] A. Augello, T.B. Kurth, and C. De Bari, "Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches," *Eur Cell Mater*, 20(121), p.e33, 2010.
- [129] S.P. Bruder, N. Jaiswal, S.E. Haynesworth, "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation," *J Cell Biochem*, vol.64, 278-294 1997.
- [130] D.J. Prockop, "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues," *Science*, 276 (5309), pp.71-74, 1997.
- [131] A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhjan, and K. Lalykina, "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells," *Cell Proliferation*, 3(4), pp.393-403, 1970.
- [132] R. Barzilay, E. Melamed, D. Offen, "Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible," *Stem Cells*; vol.27: 2509- 2515, 2009.

- [133] F. Majo, A. Rochat, M. Nicolas, G. Abou Jaoudé, and Y. Barrandon, "Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface," *Nature*, 456(7219), pp.250-254, 2008.
- [134] M. Marone, D.D. Ritis, G. Bonanno, S. Mozzetti, S. Rutella, G. Scambia, and L. Pierelli, "Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation," *Leukemia & lymphoma*, 43(3), pp.493-501, 2002.
- [135] K. Overturf, M. Al-Dhalimy, C.N. Ou, M. Finegold, and M. Grompe, "Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes," *The American journal of pathology*, vol.151(5), p.1273, 1997.
- [136] D.G. De Rooij, and J.A. Grootegoed, "Spermatogonial stem cells," *Current opinion in cell biology*, vol.10(6), pp.694-701, 1998.
- [137] C.F. Bentzinger, Y.X. Wang, J. von Maltzahn, and M.A. Rudnicki, "The emerging biology of muscle stem cells: Implications for cell-based therapies," *Bioessays*, 35(3), pp. 231-241, 2013.
- [138] B. Beck, C. Blanpain, "Mechanisms regulating epidermal stem cells," *EMBO J*; vol.31: pp. 2067– 2075, 2012.
- [139] Maharaj Institute of Immune Regenerative Medicine, <https://www.stemcellimmuneregenerative.com/>. 04.02.2022
- [140] D. Ilic, and J.M. Polak, "Stem cells in regenerative medicine: introduction," *British medical bulletin*, vol. 98(1), pp.117-126, 2011.
- [141] A. Bongso, and M. Richards, "History and perspective of stem cell research," *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, vol.18(6), pp.827-842, 2004.
- [142] S. Yao, S. Chen, J. Clark, E. Hao, G.M. Beattie, A. Hayek, and S. Ding, "Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(18), pp.6907-6912, 2006.
- [143] A. Bongso, "Blastocyst culture for deriving human embryonic stem cells," *Human Embryonic Stem Cell Protocols*, Humana Press, 13-22, 2006.
- [144] F. Hambiliki, S. Ström, P. Zhang, and A. Stavreus-Evers, "Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells," *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(10), pp.1021-1028, 2012.
- [145] Z. Wang, E. Oron, B. Nelson, S. Razis, and N. Ivanova, "Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells," *Cell stem cell*, 10(4), pp.440-454, 2012.
- [146] J. Liang, M. Wan, Y. Zhang, P. Gu, H. Xin, S.Y. Jung, J. Qin, J. Wong, A.J. Cooney, D. Liu, and Z. Songyang, "Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional

repression complexes in embryonic stem cells," *Nature cell biology*, 10(6), pp.731-739, 2008.

- [147] H. Baharvand, S.K. Ashtiani, M.R. Valojerdi, A. Shahverdi, A. Taei, and D. Sabour, "Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst," *Differentiation*, 72(5), pp.224-229, 2004.
- [148] T.C. Doetschman, H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kemler, "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium," 27-45, 1985.
- [149] T. Hamazaki, Y. Iiboshi, M. Oka, P.J. Papst, A.M. Meacham, L.I. Zon, and N. Terada, "Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro," *FEBS letters*, 497(1), pp.15-19, 2001.
- [150] E.C. Thoma, K. Maurus, T.U. Wagner, and M. Scharl, "Parallel differentiation of embryonic stem cells into different cell types by a single gene-based differentiation system," *Cellular Reprogramming Formerly Cloning and Stem Cells*, 14(2), pp.106-111, 2012.
- [151] A. Shiroi, S. Ueda, Y. Ougi, K. Saito, K. Moriya, Y. Sugie, H. Fukui, S. Ishizaka, and M. Yoshikawa, "Differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells promoted by Nkx2. 2 gene transfer," *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(27), p.4161, 2005.
- [152] S. Heydarkhan-Hagvall, J.M. Gluck, C. Delman, M. Jung, N. Ehsani, S. Full, and R.J. Shemin, "The effect of vitronectin on the differentiation of embryonic stem cells in a 3D culture system," *Biomaterials*, 33(7), pp.2032-2040, 2012.
- [153] Y. Moodley, S. Ilancheran, C. Samuel, V. Vaghjiani, D. Atienza, E.D. Williams, G. Jenkin, E. Wallace, A. Trounson, and U. Manuelpillai, "Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair," *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(5), pp.643-651, 2010.
- [154] S. Ilancheran, Y. Moodley, and U. Manuelpillai, "Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?" *Placenta*, 30(1), pp.2-10, 2009.
- [155] M. Körbling, and Z. Estrov, "Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept?" *New England Journal of Medicine*, vol. 349(6), pp.570-582, 2003.
- [156] M. Chimutengwende-Gordon, and W., S Khan, "Advances in the use of stem cells and tissue engineering applications in bone repair," *Current stem cell research & therapy*, 7(2), pp.122-126, 2012.
- [157] S. Obradović, S. Rusović, B. Balint, A. Ristić-Andelkov, R. Romanović, B. Baškot, D. Vojvodić, and B. Gligić, "Autologous bone marrow-derived progenitor cell transplantation for myocardial regeneration after acute infarction," *Vojnosanitetski pregled*, 61(5), pp.519-529, 2004.

- [158] P. Menasché, O. Alfieri, S. Janssens, W. McKenna, H. Reichenspurner, L. Trinquart, J.T. Vilquin, J.P. Marolleau, B. Seymour, J. Larghero, and S. Lake, "The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation," *Circulation*, vol.117(9), pp.1189-1200, 2008.
- [159] N.B. Nardi, "Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells," *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, vol.14, pp.4281-4298, 2009.
- [160] T.Y. Yeung, K.L. Seeberger, T. Kin, A. Adesida, N. Jomha, A.J. Shapiro, and G.S. Korbitt, "Human mesenchymal stem cells protect human islets from pro-inflammatory cytokines," *PloS one*, vol. 7(5), p.e38189, 2012.
- [161] R. Passier, and C. Mummery, "Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair," *Cardiovascular research*, vol.58(2), pp.324-335, 2003.
- [162] N. Smart, and P.R. Riley, "The stem cell movement," *Circulation research*, vol.102(10), pp.1155-1168, 2008.
- [163] J. Voog, and D.L. Jones, "Stem cells and the niche: a dynamic duo," *Cell stem cell*, 6(2), pp.103-115, 2010.
- [164] R.A. Neumüller, and J.A. Knoblich, "Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer," *Genes & development*, 23(23), pp.2675-2699, 2009.
- [165] H.R. Horvitz, and I. Herskowitz, "Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question," *Cell*, 68(2), pp.237-255, 1992.
- [166] J.A. Knoblich, "Mechanisms of asymmetric stem cell division," *Cell*, vol.132(4), pp.583-597, 2008.
- [167] J. Rossant, "Stem cells and early lineage development," *Cell*, vol.132(4), pp.527-531, 2008.
- [168] K. Takahashi, and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *Cell*, 126(4), pp.663-676, 2006.
- [169] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors," *Cell*, 131(5), pp.861-872, 2007.
- [170] M. Wernig, A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B.E. Bernstein, and R. Jaenisch, "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state," *Nature*, vol. 448(7151), pp.318-324, 2007.
- [171] J.L. Spees, R.H. Lee, and C.A. Gregory, "Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function," *Stem cell research & therapy*, 7(1), pp.1-13, 2016.

- [172] R.C. Lai, R.W.Y. Yeo, and S.K., Lim, "Mesenchymal stem cell exosomes," In *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 40, pp. 82-88, Academic Press. 2015.
- [173] A. Sudulaguntla, S. Gurung, B.K. Nanjwade, and J.K. Tamang, "A review: Stem cells and classification of stem cells based on their origin," *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 15(1), pp.105-112, 2016.
- [174] N. Kosaric, H. Kiwanuka, and G.C. Gurtner, "Stem cell therapies for wound healing," *Expert opinion on biological therapy*, vol. 19(6), pp.575-585, 2019.
- [175] S.E. Haynesworth, M.A. Baber, and A.I. Caplan, "Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 α ," *Journal of cellular physiology*, vol. 166(3), pp.585-592, 1996.
- [176] T. Kinnaird, E. Stabile, M.S. Burnett, and S.E. Epstein, "Bone marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences," *Circulation research*, vol. 95(4), pp.354-363, 2004.
- [177] D. Patschan, M. Plotkin, and M.S. Goligorsky, "Therapeutic use of stem and endothelial progenitor cells in acute renal injury: ca ira," *Current opinion in pharmacology*, vol. 6(2), pp.176-183, 2006.
- [178] Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, and S. Sano, "Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction," *Nature medicine*, vol. 12(4), pp.459-465, 2006.
- [179] J.Y. Min, M.F. Sullivan, Y. Yang, J.P. Zhang, K.L. Converso, J.P. Morgan, and Y.F. Xiao, "Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs," *The Annals of thoracic surgery*, 74(5), pp.1568-1575, 2002.
- [180] T. Kinnaird, E. Stabile, M.S. Burnett, C.W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, and S.E. Epstein, "Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms," *Circulation research*, vol. 94(5), pp.678-685, 2004.
- [181] W.S. Kim, B.S. Park, J.H. Sung, J.M. Yang, S.B. Park, S.J. Kwak, and J.S. Park, "Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts," *Journal of dermatological science*, vol. 48(1), pp.15-24, 2007.
- [182] D.S. Kwon, X. Gao, Y.B. Liu, D.S. Dulchavsky, A.L. Danyluk, M. Bansal, M. Chopp, K. McIntosh, A.S. Arbab, S.A. Dulchavsky, and S.C. Gautam, "Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats," *International wound journal*, vol. 5(3), pp.453-463, 2008.

- [183] L. Chen, E.E. Tredget, P.Y. Wu, and Y. Wu, "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing," *PloS one*, 3(4), p.e1886, 2008.
- [184] S.W. Kim, H.Z. Zhang, L. Guo, J.M. Kim, and M.H. Kim, "Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities," *PloS one*, 7(7), p.e41105, 2012.
- [185] C.W. Houchen, R.J. George, M.A. Sturmoski, and S.M. Cohn, "FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury," *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 276(1), pp. G249-G258, 1999.
- [186] P., Wu B, Zhang, H. Shi, H. Qian, and W. Xu, "MSC-exosome: a novel cell-free therapy for cutaneous regeneration," *Cytotherapy*, vol. 20(3), pp.291-301, 2018.
- [187] J.E. Davies, J.T. Walker, and A. Keating, "Concise review: Wharton's jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells," *Stem cells translational medicine*, vol. 6(7), pp.1620-1630, 2017.
- [188] K.D. Mcelreavey, A.I. Irvine, K.T. Ennis, and W.I McLean, "Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord," 29S-29S, 1991.
- [189] H. Abbaszadeh, F. Ghorbani, M. Derakhshani, A.A. Movassaghpour, M. Yousefi, M. Talebi, and K. Shamsasenjan, "Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 235(12), pp.9230-9240, 2020.
- [190] R. Hooke, "On the schematisme or texture of cork, and of the cells and pores of some other such frothy bodies," *Gabriel ML, Fogel S*. 1955.
- [191] K.D. Mcelreavey, A.I. IRVINE, K.T. Ennis, and W.I McLean, "Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord," 29S-29S, 1991.
- [192]. K. Takechi, Y. Kuwabara, and M. Mizuno, "Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells," *Placenta*, vol.14(2), pp.235-245, 1993.
- [193]. S.M. Richardson, G. Kalamegam, P.N. Pushparaj, C. Matta, A. Memic, A. Khademhosseini, R. Mobasheri, F.L. Poletti, J.A. Hoyland, and A. Mobasheri, "Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration" *Methods*, vol. 99, pp.69-80, 2016.
- [194] I. Kalaszczynska, and K. Ferdyn, "Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance," *BioMed research international*, 2015.

- [195] L.L. Liao, B.H.I. Ruzsyzmah, M.H. Ng, and J.X. Law, "Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells," *Current research in translational medicine*, vol. 68(1), pp.5-16, 2020.
- [196] L. Marino, M.A. Castaldi, R. Rosamilio, E. Ragni, R. Vitolo, C. Fulgione, S.G. Castaldi, B. Serio, R. Bianco, M. Guida, and C. Selleri, "Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord: biological properties and therapeutic potential," *International journal of stem cells*, vol. 12(2), p.218, 2019.
- [197] M.L. Weiss, S. Medicetty, A.R. Bledsoe, R.S. Rachakatla, M. Choi, S. Merchav, Y. Luo, M.S. Rao, G. Velagaleti, and D. Troyer, "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease," *Stem cells*, vol. 24(3), pp.781-792, 2006.
- [198] D.G. Phinney, and M.F. Pittenger, "Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy," *Stem cells*, vol. 35(4), pp.851-858, 2017.
- [199] H. Abbaszadeh, F. Ghorbani, M. Derakhshani, A.A. Movassaghpour, M. Yousefi, M. Talebi, and K. Shamsasenjan, "Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 235(12), pp.9230-9240, 2020.
- [200] D.W. Kim, M. Staples, K. Shinozuka, P. Pantcheva, S.D. Kang, and C.V Borlongan, "Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications," *International journal of molecular sciences*, vol. 14(6), pp.11692-11712, 2013.
- [201] O. V Semenov, and C. Breyman, "Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly and their potential for cardio-vascular tissue engineering," *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 4(1), 2011.
- [202] J.E. Mayer Jr, "Uses of homograft conduits for right ventricle to pulmonary artery connections in the neonatal period. In *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*, Vol. 7(3), pp. 130-132, 1995.
- [203] F.J. Schoen, and R.J. Levy, "Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives," *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 47(4), pp.439-465, 1999.
- [204] D.W. Kim, M. Staples, K. Shinozuka, P. Pantcheva, S.D. Kang, and C.V Borlongan, "Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications," *International journal of molecular sciences*, vol. 14(6), pp.11692-11712, 2013.
- [205] M. Lo Iacono, R. Anzalone, S. Corrao, M. Giuffrè, A. Di Stefano, P. Giannuzzi, F. Cappello, F. Farina, and G. La Rocca, "Perinatal and wharton's jelly-derived

mesenchymal stem cells in cartilage regenerative medicine and tissue engineering strategies,” *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 4(1), 2011.

- [206] M.C. Arufe, A. De la Fuente, J. Mateos, I. Fuentes, F.J. De Toro, and F.J. Blanco, “Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma,” *Stem cells and development*, vol. 20(7), pp.1199-1212, 2011.
- [207] N. Ishikawa, Y. Suzuki, M. Ohta, H. Cho, S. Suzuki, M. Dezawa, and C. Ide, “Peripheral nerve regeneration through the space formed by a chitosan gel sponge,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 83(1), pp.33-40. 2007.
- [208] M. Ohta, Y. Suzuki, H. Chou, N. Ishikawa, S. Suzuki, M. Tanihara, Y. Suzuki, Y. Mizushima, M. Dezawa, and C. Ide, “Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol.71(4), pp.661-668, 2004.
- [209] S. Hall, “Nerve repair: a neurobiologist's view,” *The Journal of Hand Surgery: British & European Volume*, 26(2), pp.129-136, 2001.
- [210] D. Matsuse, M. Kitada, M. Kohama, K. Nishikawa, H. Makinoshima, S. Wakao, Y. Fujiyoshi, T. Heike, T. Nakahata, H. Akutsu, and A. Umezawa, “Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration,” *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 69(9), pp.973-985, 2010.
- [211] Y. Kuroda, M. Kitada, S. Wakao, and M. Dezawa, “Mesenchymal stem cells and umbilical cord as sources for schwann cell differentiation: their potential in peripheral nerve repair,” *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, vol. 4(1), 2011.
- [212] J. Peng, Y. Wang, L. Zhang, B. Zhao, Z. Zhao, J. Chen, Q. Guo, S. Liu, X. Sui, W. Xu, and S. Lu, “Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro,” *Brain research bulletin*, vol. 84(3), pp.235-243, 2011.
- [213] Q. Xu, H.T. Zhang, K. Liu, J.H. Rao, X.M. Liu, L. Wu, and B.N. Xu, “In vitro and in vivo magnetic resonance tracking of sinerem-labeled human umbilical mesenchymal stromal cell-derived schwann cells,” *Cellular and molecular neurobiology*, vol. 31(3), pp.365-375, 2011.
- [214] M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, “Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles,” *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 30, pp.255-289, 2014.

- [215] G. Raposo, and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends," *Journal of Cell Biology*, vol. 200(4), pp.373-383, 2013.
- [216] J. Meldolesi, "Exosomes and ectosomes in intercellular communication," *Current Biology*, vol. 28(8), pp. R435-R444, 2018.
- [217] A. L Isola, and S. Chen, "Exosomes: the messengers of health and disease," *Current neuropharmacology*, vol. 15(1), pp.157-165, 2017.
- [218] C. Arenaccio, and M. Federico, "The multifaceted functions of exosomes in health and disease: an overview," *Exosomes in Cardiovascular Diseases*, pp.3-19, 2017.
- [219] L. Urbanelli, A. Magini, S. Buratta, A. Brozzi, K. Sagini, A. Polchi, B. Tancini, and C. Emiliani, "Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate," *Genes*, vol. 4(2), pp.152-170, 2013.
- [220] M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, and C. Théry, "Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication," *Nature cell biology*, vol. 21(1), pp.9-17, 2019.
- [221] S. Raimondo, G. Giavaresi, A. Lorico, and R. Alessandro, "Extracellular vesicles as biological shuttles for targeted therapies," *International journal of molecular sciences*, vol. 20(8), p.1848, 2019.
- [222] C. Harding, J. Heuser, and P. Stahl, "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes," *Journal of cell biology*, vol. 97(2), pp.329-339, 1983.
- [223] R.M. Johnstone, M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide, "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262(19), pp.9412-9420, 1987.
- [224] J.H. Kim, J. Lee, J. Park, and Y.S. Gho, "Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles," In *Seminars in cell & developmental biology*, Vol. 40, pp. 97-104, Academic Press. 2015.
- [225] A. Casado-Díaz, J.M. Quesada-Gómez, and G. Dorado, "Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells (MSC) in regenerative medicine: applications in skin wound healing," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 8, p.146. 2020.
- [226] J. Xu, S. Bai, Y. Cao, L. Liu, Y. Fang, J. Du, L. Luo, M. Chen, B. Shen, and Q. Zhang, "miRNA-221-3p in endothelial progenitor cell-derived exosomes accelerates skin wound healing in diabetic mice," *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, vol. 13, p.1259, 2020.

- [227] H. Qiu, S. Liu, K. Wu, R. Zhao, L. Cao, and H. Wang, "Prospective application of exosomes derived from adipose-derived stem cells in skin wound healing: A review," *Journal of cosmetic dermatology*, vol. 19(3), pp.574-581, 2020.
- [228] A.D.F. Ferreira, and D.A. Gomes, "Stem cell extracellular vesicles in skin repair," *Bioengineering*, vol. 6(1), p.4, 2019.
- [229] M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, "Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 30, pp.255-289, 2014.
- [230] D.S. Choi, D.K. Kim, Y.K. Kim, and Y.S. Gho, "Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes," *Proteomics*, 13(10-11), pp.1554-1571, 2013.
- [231] J. Ratajczak, K. Miekus, M. Kucia, J. Zhang, R. Reca, P. Dvorak, and M.Z. Ratajczak, "Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery," *Leukemia*, 20(5), pp.847-856, 2006.
- [232] C. Han, X. Sun, L. Liu, H. Jiang, Y. Shen, X. Xu, J. Li, G. Zhang, J. Huang, Z. Lin, and N. Xiong, "Exosomes and their therapeutic potentials of stem cells," *Stem cells international*, 2016.
- [233] G. Lou, Z. Chen, M. Zheng, and Y. Liu, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases," *Experimental & molecular medicine*, vol. 49(6), pp. e346-e346, 2017.
- [234] B.S. Cho, J.O. Kim, D.H. Ha, and Y.W. Yi, "Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis," *Stem cell research & therapy*, vol. 9(1), pp.1-5, 2018.
- [235] V.T. Nooshabadi, S. Mardpour, A. Yousefi-Ahmadipour, A. Allahverdi, M. Izadpanah, F. Daneshimehr, J. Ai, H.R. Banafshe, and S. Ebrahimi-Barough, "The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine," *Journal of cellular biochemistry*, vol.119(10), pp.8048-8073, 2018.
- [236] M. Mendt, K. Rezvani, and E. Shpall, "Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use," *Bone marrow transplantation*, vol. 54(2), pp.789-792, 2019.
- [237] F.M. Elahi, D.G. Farwell, J.A. Nolta, and J.D. Anderson, "Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells," *Stem cells*, vol. 38(1), pp.15-21, 2020.
- [238] K. Pachler, T. Lener, D. Streif, Z.A. Dunai, A. Desgeorges, M. Feichtner, M. Öller, K. Schallmoser, E. Rohde, and M. Gimona, "A Good Manufacturing Practice-grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles," *Cytotherapy*, vol.19(4), pp.458-472, 2017.

- [239] G. Andriolo, E. Provasi, V. Lo Cicero, A. Brambilla, S. Soncin, T. Torre, G. Milano, V. Biemmi, G. Vassalli, L. Turchetto, and L. Barile, "Exosomes from human cardiac progenitor cells for therapeutic applications: development of a GMP-grade manufacturing method," *Frontiers in physiology*, vol. 9, p.1169, 2018.
- [240] E.H. Koritzinsky, J.M. Street, R.A. Star, and P.S. Yuen, "Quantification of exosomes," *Journal of cellular physiology*, vol. 232(7), pp.1587-1590, 2017.
- [241] L.M. Sanchez, and V.A. Alvarez, "Advances in magnetic noble metal/iron-based oxide hybrid nanoparticles as biomedical devices," *Bioengineering*, vol. 6(3), p.75, 2019.
- [242] M.I Ramirez, M.G. Amorim, C. Gadelha, I. Milic, J.A. Welsh, V.M. Freitas, M. Nawaz, N. Akbar, Y. Couch, L. Makin, and F. Cooke, "Technical challenges of working with extracellular vesicles," *Nanoscale*, 10(3), pp.881-906, 2018.
- [243] X. Li, A.L. Corbett, E. Taatizadeh, N. Tasnim, J.P. Little, C. Garnis, M. Daugaard, E. Guns, M. Hoorfar, and I.T. Li, "Challenges and opportunities in exosome research—Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy," *APL bioengineering*, 3(1), p.011503, 2019.
- [244] D. Bachurski, M. Schuldner, P.H. Nguyen, A. Malz, K.S. Reiners, P.C. Grenzi, F. Babatz, A.C. Schauss, H.P. Hansen, M. Hallek, and E. Pogge von Strandmann, "Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis—An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView," *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), p.1596016, 2019.
- [245] E. Van der Pol, F.A.W. Coumans, A.E. Grootemaat, C. Gardiner, I.L. Sargent, P. Harrison, A. Sturk, T.G. Van Leeuwen, and R. Nieuwland, "Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(7), pp.1182-1192, 2014.
- [246] P. Carnell-Morris, D. Tannetta, A. Siupa, P. Hole, and R. Dragovic, "Analysis of extracellular vesicles using fluorescence nanoparticle tracking analysis," In *Extracellular Vesicles*, Humana Press, New York, NY. pp. 153-173. 2017.
- [247] S. Stuffers, C. Sem Wegner, H. Stenmark, and A. Brech, "Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs," *Traffic*, 10(7), pp.925-937, 2009.
- [248] J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J.P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, and C. Théry, "Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), pp. E968-E977, 2016.
- [249] Y. Lee, S. El Andaloussi, and M.J. Wood, "Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy," *Human molecular genetics*, 21(R1), pp. R125-R134, 2012.

- [250] T.A. Butler, J.W. Paul, E.C. Chan, R. Smith, and J.M. Tolosa, "Misleading westerns: common quantification mistakes in western blot densitometry and proposed corrective measures," *BioMed research international*, 2019.
- [251] B.D. Chan, W.Y. Wong, M.M.L. Lee, W.C.S. Cho, B.K. Yee, Y.W. Kwan, and W.C.S. Tai, "Exosomes in inflammation and inflammatory disease," *Proteomics*, 19(8), p.1800149, 2019.
- [252] M. Yáñez-Mó, P.R.M. Siljander, Z. Andreu, A. Bedina Zavec, F.E. Borràs, E.I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, and E. Colás, "Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions," *Journal of extracellular vesicles*, 4(1), p.27066, 2015.
- [253] S.E. Andaloussi, I. Mäger, X.O. Breakefield, and M.J. Wood, "Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities," *Nature reviews Drug discovery*, 12(5), pp.347-357, 2013.
- [254] M. Yi, Y. Wu, J. Long, F. Liu, Z. Liu, Y.H. Zhang, X.P. Sun, Z.X. Fan, J. Gao, J. Si, and X.B. Zuo, "Exosomes secreted from osteocalcin-overexpressing endothelial progenitor cells promote endothelial cell angiogenesis," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 317(5), pp.C932-C941, 2019.
- [255] J. Xiao, Y. Pan, X.H. Li, X.Y. Yang, Y.L. Feng, H.H. Tan, L. Jiang, J. Feng, and X.Y. Yu, "Cardiac progenitor cell-derived exosomes prevent cardiomyocytes apoptosis through exosomal miR-21 by targeting PDCD4," *Cell death & disease*, 7(6), pp. e2277-e2277, 2016.
- [256] S. Gurunathan, M.H. Kang, M. Jeyaraj, M. Qasim, and J.H. Kim, "Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes," *Cells*, 8(4), p.307, 2019.
- [257] F.A. Alzahrani, "Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats," *American journal of translational research*, 11(5), p.2887, 2019.
- [258] B. Wang, H. Jia, B. Zhang, J. Wang, C. Ji, X. Zhu, Y. Yan, L. Yin, J. Yu, H. Qian, and W. Xu, "Pre-incubation with hucMSC-exosomes prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by activating autophagy," *Stem cell research & therapy*, 8(1), pp.1-14, 2017.
- [259] L. Bai, H. Shao, H. Wang, Z. Zhang, C. Su, L. Dong, B. Yu, X. Chen, X. Li, and X. Zhang, "Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental autoimmune uveitis," *Scientific reports*, 7(1), pp.1-11, 2017.
- [260] A. Bier, P. Berenstein, N. Kronfeld, D. Morgoulis, A. Ziv-Av, H. Goldstein, G. Kazimirsky, S. Cazacu, R. Meir, R. Popovtzer, and A. Dori, "Placenta-derived mesenchymal stromal cells and their exosomes exert therapeutic effects in Duchenne muscular dystrophy," *Biomaterials*, 174, pp.67-78, 2018.
- [261] S. Chaubey, S. Thueson, D. Ponnalagu, M.A. Alam, C.P. Gheorghe, Z. Aghai, H. Singh, and V. Bhandari, "Early gestational mesenchymal stem cell secretome

attenuates experimental bronchopulmonary dysplasia in part via exosome-associated factor TSG-6,” *Stem cell research & therapy*, 9(1), pp.1-26, 2018.

- [262] G.H. Cui, H.D. Guo, H. Li, Y. Zhai, Z.B. Gong, J. Wu, J.S. Liu, Y.R. Dong, S.X. Hou, and J.R. Liu, “RVG-modified exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer’s disease,” *Immunity & Ageing*, 16(1), pp.1-12, 2019.
- [263] T.R. Doeppner, J. Herz, A. Görgens, J. Schlechter, A.K. Ludwig, S. Radtke, K. de Miroschedji, P.A. Horn, B. Giebel, and D.M. Hermann, “Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent post ischemic immunosuppression,” *Stem cells translational medicine*, 4(10), pp.1131-1143, 2015.
- [264] B. Fan, C. Li, A. Szalad, L. Wang, W. Pan, R. Zhang, M. Chopp, Z.G. Zhang, and X.S. Liu, “Mesenchymal stromal cell-derived exosomes ameliorate peripheral neuropathy in a mouse model of diabetes,” *Diabetologia*, 63(2), pp.431-443, 2020.
- [265] M. Borghesan, J. Fafián-Labora, O. Eleftheriadou, P. Carpintero-Fernández, M. Paez-Ribes, G. Vizcay-Barrena, A. Swisa, D. Kolodkin-Gal, P. Ximénez-Embún, R. Lowe, and B. Martín-Martín, “Small extracellular vesicles are key regulators of non-cell autonomous intercellular communication in senescence via the interferon protein IFITM3,” *Cell reports*, 27(13), pp.3956-3971, 2019.
- [266] L. Urbanelli, S. Buratta, K. Sagini, B. Tancini, and C. Emiliani, “Extracellular vesicles as new players in cellular senescence,” *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), p.1408, 2016.
- [267] L. Terlecki-Zaniewicz, I. Lämmermann, J. Latreille, M.R. Bobbili, V. Pils, M. Schosserer, R. Weinmüllner, H. Dellago, S. Skalicky, D. Pum, and J.C.H. Almaraz, “Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype,” *Aging (Albany NY)*, 10(5), p.1103, 2018.
- [268] B.D. Lehmann, M.S., Paine, A.M., Brooks, J.A. McCubrey, R.H. Renegar, R. Wang, and D.M. Terrian, “Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells,” *Cancer research*, 68(19), pp.7864-7871, 2008.
- [269] M. Takasugi, R. Okada, A. Takahashi, D.V. Chen, S. Watanabe, and E. Hara, “Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2,” *Nature communications*, 8(1), pp.1-11, 2017.
- [270] E. Eitan, J. Green, M. Bodogai, N.A. Mode, R. Bæk, M.M. Jørgensen, D.W. Freeman, K.W. Witwer, A.B. Zonderman, A. Biragyn, and M.P. Mattson, “Age-related changes in plasma extracellular vesicle characteristics and internalization by leukocytes,” *Scientific reports*, 7(1), pp.1-14, 2017.
- [271] K. Bertoldi, L.R. Cechinel, B. Schallenberger, G.B. Corssac, S. Davies, I.C.K. Gueeiro, A. Belló-Klein, A.S.R. Araujo, and I.R. Siqueira, “Circulating extracellular

vesicles in the aging process: impact of aerobic exercise," *Molecular and cellular biochemistry*, 440(1), pp.115-125, 2018.

- [272] F.J. Alibhai, F. Lim, A. Yeganeh, P.V. DiStefano, T. Binesh-Marvasti, A. Belfiore, L. Wlodarek, D. Gustafson, S. Millar, S.H. Li, and R.D. Weisel, "Cellular senescence contributes to age-dependent changes in circulating extracellular vesicle cargo and function," *Aging cell*, 19(3), p.e13103, 2020.
- [273] H. Mobarak, M. Heidarpour, F. Lolicato, M. Nouri, R. Rahbarghazi, and M. Mahdipour, "Physiological impact of extracellular vesicles on female reproductive system; highlights to possible restorative effects on female age-related fertility," *Biofactors*, 45(3), pp.293-303, 2019.
- [274] D.H. Ha, H.K. Kim, J. Lee, H.H. Kwon, G.H. Park, S.H. Yang, J.Y. Jung, H. Choi, J.H. Lee, S. Sung, and Y.W. Yi, "Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration," *Cells*, 9(5), p.1157, 2020.
- [275] H. Qiu, S. Liu, K. Wu, R. Zhao, L. Cao, and H. Wang, "Prospective application of exosomes derived from adipose-derived stem cells in skin wound healing: A review," *Journal of cosmetic dermatology*, 19(3), pp.574-581, 2020.
- [276] A.D.F. Ferreira, and D.A. Gomes, "Stem cell extracellular vesicles in skin repair," *Bioengineering*, 6(1), p.4, 2019.
- [277] A. Kasuya, and Y. Tokura, "Attempts to accelerate wound healing," *Journal of dermatological science*, 76(3), pp.169-172, 2014.
- [278] A. Kawasumi, N. Sagawa, S. Hayashi, H. Yokoyama, and K. Tamura, "Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals," *New Perspectives in Regeneration*, pp.33-49, 2012.
- [279] M.M. Santoro, and G. Gaudino, "Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing," *Experimental cell research*, 304(1), pp.274-286, 2005.
- [280] F. Svolacchia, F. De Francesco, L. Trovato, A. Graziano, and G.A. Ferraro, "An innovative regenerative treatment of scars with dermal micrografts," *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(3), pp.245-253, 2016.
- [281] G. Pelizzo, M.A. Avanzini, A. Icaro Cornaglia, A. De Silvestri, M. Mantelli, P. Travaglino, S. Croce, P. Romano, L. Avolio, G. Iacob, and M. Dominici, "Extracellular vesicles derived from mesenchymal cells: perspective treatment for cutaneous wound healing in pediatrics," *Regenerative medicine*, 13(4), pp.385-394, 2018.
- [282] A.D.F. Ferreira, P.D.S. Cunha, V.M. Carregal, P.D.C.D. Silva, M.C.D. Miranda, M. Kunrath-Lima, M.I.A. de Melo, C.C.F. Faraco, J.L. Barbosa, F. Frezard, and V. Resende, "Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells accelerate migration and activate AKT pathway in human

keratinocytes and fibroblasts independently of miR-205 activity," *Stem cells international*, 2017.

- [283] L.I. Hu, J. Wang, X. Zhou, Z. Xiong, J. Zhao, R. Yu, F. Huang, H. Zhang, and L. Chen, "Exosomes derived from human adipose mensesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts," *Scientific reports*, 6(1), pp.1-11, 2016.
- [284] B. Zhang, M. Wang, A. Gong, X. Zhang, X. Wu, Y. Zhu, H. Shi, L. Wu, W. Zhu, H. Qian, and W. Xu, "HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing," *Stem cells*, 33(7), pp.2158-2168, 2015.
- [285] R.M. Trüeb, "Further clinical evidence for the effect of IGF-1 on hair growth and alopecia," *Skin appendage disorders*, 4(2), pp.90-95, 2018.
- [286] K. Yano, L.F. Brown, and M. Detmar, "Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis," *The Journal of clinical investigation*, 107(4), pp.409-417, 2001.
- [287] J.G. Mahdi, A.J. Mahdi, A.J. Mahdi, and I.D. Bowen, "The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential," *Cell proliferation*, 39(2), pp.147-155, 2006.
- [288] H. Lévesque, and O. Lafont, "L'aspirine à travers les siècles: rappel historique," *La revue de médecine interne*, 21, pp. S8-S17, 2000.
- [289] B.H. Juurlink, H.J. Azouz, A.M. Aldalati, B.M. AlTinawi, and P. Ganguly, "Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system," *Nutrition journal*, 13(1), pp.1-10, 2014.
- [290] I. Raskin, "Salicylate, a new plant hormone," *Plant physiology*, 99(3), p.799, 1992.
- [291] A.G. Mitchell, and J.F. Broadhead, "Hydrolysis of solubilized aspirin," *Journal of pharmaceutical sciences*, 56(10), pp.1261-1266, 1967.
- [292] I. Raskin, H. Skubatz, W. Tang, and B.J. Meeuse, "Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants," *Annals of Botany*, 66(4), pp.369-373, 1990.
- [293] D. Ekinçi, M. Şentürk, and Ö.İ. Küfrevioğlu, "Salicylic acid derivatives: synthesis, features and usage as therapeutic tools," *Expert opinion on therapeutic patents*, 21(12), pp.1831-1841, 2011.
- [294] S.J. Kempiaak, and N. Uebelhoer, "Superficial chemical peels and microdermabrasion for acne vulgaris," In *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, vol. 27(3), pp. 212-220, 2008.
- [295] T. Arif, "Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review," *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 8, p.455, 2015.

- [296] E. Kessler, K. Flanagan, C. Chia, C. Rogers, and D.E.E. ANNA GLASER, "Comparison of α - and β -Hydroxy Acid Chemical Peels in the Treatment of Mild to Moderately Severe Facial Acne Vulgaris," *Dermatologic surgery*, 34(1), pp.45-51, 2008.
- [297] T. Arif, "Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review," *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 8, p.455, 2015.
- [298] K. Degitz, and F. Ochsendorf, "Pharmacotherapy of acne," *Expert opinion on pharmacotherapy*, 9(6), pp.955-971, 2008.
- [299] J.A. Zeichner, "The use of lipohydroxy acid in skin care and acne treatment," *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 9(11), p.40, 2016.
- [300] J. Lu, T. Cong, X. Wen, X. Li, D. Du, G. He, and X. Jiang, "Salicylic acid treats acne vulgaris by suppressing AMPK/SREBP 1 pathway in sebocytes," *Experimental dermatology*, 28(7), pp.786-794, 2019.
- [301] R.K. Madan, and J. Levitt, "A review of toxicity from topical salicylic acid preparations," *Journal of the American Academy of Dermatology*, 70(4), pp.788-792, 2014.
- [302] P. Danish, Q. Ali, M.M. Hafeez, and A. Malik, "Antifungal and antibacterial activity of aloe vera plant extract," *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2020(1), 2020.
- [303] A.V. Subhash, S. Suneela, C. Anuradha, S.N. Bhavani, and M.S.M. Babu, "The role of Aloe vera in various fields of medicine and dentistry," *Journal of Orofacial Sciences*, 6(1), p.5, 2014.
- [304] F. Shireen, S. Manipal, and D. Prabu, "Anti-fungal activity of Aloe vera: In vitro study," *SRM Journal of Research in Dental Sciences*, 6(2), p.92, 2015.
- [305] B. Tian, and Y. Hua, "Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA," *Food Chemistry*, 91(3), pp.413-418, 2005.
- [306] S. Choi, and M.H. Chung, March. "A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects," In *Seminars in integrative medicine*, vol. 1, pp. 53-62, WB Saunders. 2003.
- [307] X. Dong, Y. Zeng, Y. Liu, L. You, X. Yin, J. Fu, and J. Ni, "Aloe-emodin: a review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics," *Phytotherapy Research*, 34(2), pp.270-281, 2020.
- [308] A. Dalimi, M. Delavari, F. Ghaffarifar, and J. Sadraei, "In vitro and in vivo antileishmanial effects of aloe-emodin on *Leishmania major*," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(2), pp.96-99, 2015.
- [309] A.M. Gressner, "Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook," *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 29(5), pp.293-311, 1991.

- [310] B. Arosio, N. Gagliano, L.M.P. Fusaro, L. Parmeggiani, J. Tagliabue, P. Galetti, D. De Castri, C. Moscheni, and G. Annoni, "Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride," *Pharmacology & toxicology*, 87(5), pp.229-233, 2000.
- [311] K.E. Malterud, T.L. Farbrot, A.E. Huse, and R.B. Sund, "Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones," *Pharmacology*, 47(Suppl. 1), pp.77-85, 1993.
- [312] M. del Rayo Camacho, G.C. Kirby, D.C. Warhurst, S.L. Croft, and J.D. Phillipson, "Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities," *Planta medica*, 66(05), pp.478-480, 2000.
- [313] H.H. Wang, J.G. Chung, C.C. Ho, L.T. Wu, and S.H. Chang, "Aloe-emodin effects on arylamine N-acetyltransferase activity in the bacterium *Helicobacter pylori*," *Planta medica*, 64(02), pp.176-178, 1998.
- [314] L.M. Cera, J.P. Heggors, M.C. Robson, and W.J. Hagstrom, "The therapeutic efficacy of Aloe vera cream (Dermaide Aloe) in thermal injuries: two case reports [Dogs]," *Journal American Animal Hospital Association*, 1980.
- [315] Parçacık boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçüm Laboratuvarı (PZL) MERLAB, <https://merlab.metu.edu.tr/tr/system/files/Belgeler/TanitimBrosurleri/PZL.pdf>
- [316] Hacettepe Üniversitesi, <http://www.hunitek.hacettepe.edu.tr/nta>. 04.02.2022
- [317] ATA Scientific Instruments, <https://www.atascientific.com.au/products/malvern-nanosight-ns300/>. 04.02.2022
- [318] N.S. Bryan, and M.B. Grisham, "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples," *Free radical biology and medicine*, 43(5), pp.645-657, 2007.
- [319] World Health Organisation, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/, 2016. 04.02.2022
- [320] K. Jain, and N.K. Jain, "Vaccines for visceral leishmaniasis: A review," *Journal of immunological methods*, 422, pp.1-12, 2015.
- [321] D. Savoia, "Recent updates and perspectives on leishmaniasis," *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(06), pp.588-596, 2015.
- [322] S. Mohapatra, "Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments," *Tropical parasitology*, 4(1), p.4, 2014.
- [323] A.I. Arno, S. Amini-Nik, P.H. Blit, M. Al-Shehab, C. Belo, E. Herer, C.H. Tien, and M.G. Jeschke, "Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin

wound healing through paracrine signaling," *Stem cell research & therapy*, 5(1), pp.1-13, 2014.

- [324] H. Doi, Y. Kitajima, L. C. Luo, S. YanTateishi, Y. Ono, Y. Urata, S. Goto, R. Mori, H. Masuzaki, and I. Shimokawa, "Potency of umbilical cord blood-and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing," *Scientific Reports*, 6, 2016.
- [325] A. Tormin, J.C. Brune, E. Olsson, J. Valcich, U. Neuman, T. Olofsson, S.E. Jacobsen, and S. Scheduling, "Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets," *Cytotherapy*, 11(2), pp.114-128, 2009.
- [326] M. Lennerås, K. Ekström, F. Vazirisani, F.A. Shah, K. Junevik, P. Thomsen, and O. Omar, "Interactions between monocytes, mesenchymal stem cells, and implants evaluated using flow cytometry and gene expression," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(7), pp.1728-174, 2018.
- [327] L. Li, H. Tian, W. Yue, F. Zhu, S. Li, and W. Li, "Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo," *Journal of Cellular Physiology*, 226(7), pp.1860-1867, 2011.
- [328] F.L. Muehlberg, Y.H. Song, A. Krohn, S.P. Pinilla, L.H. Droll, X. Leng, M. Seidensticker, J. Ricke, A.M. Altman, E. Devarajan, and W. Liu, "Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis," *Carcinogenesis*, 30(4), pp.589-597, 2009.
- [329] S.E. Artandi, and R.A. DePinho, "Telomeres and telomerase in cancer," *Carcinogenesis*, 31(1), pp.9-18, 2010.
- [330] B.G. Jeon, B.M. Kumar, E.J. Kang, S.A. Ock, S.L. Lee, D.O. Kwack, J.H. Byun, B.W. Park, and G.J. Rho, "Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins," *Cell and tissue research*, 345(1), pp.149-161, 2011.
- [331] F. GÜZELGÜL, and K. AKSOY, "Telomeraz enziminin tanı ve tedavide kullanım alanı," *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(2), pp.69-88, 2011.
- [332] E. Karaöz, P.C. Demircan, Ö. Sağlam, A. Aksoy, F. Kaymaz, and G. Duruksu, "Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells," *Histochemistry and cell biology*, 136(4), pp.455-473, 2011.
- [333] D.S. Bischoff, N.S. Makhijani, and D.T. Yamaguchi, "Constitutive expression of human telomerase enhances the proliferation potential of human mesenchymal stem cells," *BioResearch open access*, 1(6), pp.273-279, 2012.
- [334] X. Wei, and C.Y. Shen, "Transcriptional regulation of oct4 in human bone marrow mesenchymal stem cells," *Stem cells and development*, 20(3), pp.441-449, 2011.

- [335] N.E. Gade, M.D. Pratheesh, A. Nath, P.K. Dubey, B. Sharma, G. Saikumar, and G. Taru Sharma, "Molecular and cellular characterization of buffalo bone marrow-derived mesenchymal stem cells," *Reproduction in Domestic Animals*, 48(3), pp.358-367, 2013.
- [336] D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper, V. Weber, and V. Charwat, "Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells," *Cytometry Part A*, 93(1), pp.19-31, 2018.
- [337] Y. Hu, S.S. Rao, Z.X. Wang, J. Cao, Y.J. Tan, J. Luo, H.M. Li, W.S. Zhang, C.Y. Chen, and H. Xie, "Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function," *Theranostics*, 8(1), p.169, 2018.
- [338] A. Geiger, A. Walker, and E. Nissen, "Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice," *Biochemical and biophysical research communications*, 467(2), pp.303-309, 2015.
- [339] B. Zhao, Y. Zhang, S. Han, W. Zhang, Q. Zhou, H. Guan, J. Liu, J. Shi, L. Su, and D. Hu, "Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation," *Journal of molecular histology*, 48(2), pp.121-132, 2017.
- [340] Y. Liu, L. Lin, R. Zou, C. Wen, Z. Wang, and F. Lin, "MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis," *Cell cycle*, 17(21-22), pp.2411-2422, 2018.
- [341] A. Geiger, A. Walker, and E. Nissen, "Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice," *Biochemical and biophysical research communications*, 467(2), pp.303-309, 2015.
- [342] B. Zhang, M. Wang, A. Gong, X. Zhang, X. Wu, Y. Zhu, H. Shi, L. Wu, W. Zhu, H. Qian, and W. Xu, "HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing," *Stem cells*, 33(7), pp.2158-2168, 2015.
- [343] B. Zhao, Y. Zhang, S. Han, W. Zhang, Q. Zhou, H. Guan, J. Liu, J. Shi, L. Su, and D. Hu, "Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation," *Journal of molecular histology*, 48(2), pp.121-132, 2017.
- [344] B.F. Hettich, M. Ben-Yehuda Greenwald, S. Werner, and J.C. Leroux, "Exosomes for wound healing: purification optimization and identification of bioactive components," *Advanced Science*, 7(23), p.2002596, 2020.
- [345] X. Wang Y. Jiao, Y. Pan, L. Zhang, H. Gong, Y. Qi, M. Wang, H. Gong, M. Shao, X. Wang, and D. Jiang, "Fetal dermal mesenchymal stem cell-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing by activating notch signaling," *Stem cells international*, 2019.

- [346] V. Sokolova, A.K. Ludwig, S. Hornung, O. Rotan, P.A. Horn, M. Epple, and B. Giebel, "Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(1), pp.146-150, 2011.
- [347] L. Pascucci, V. Coccè, A. Bonomi, D. Ami, P. Ceccarelli, E. Ciusani, L. Viganò, A. Locatelli, F. Sisto, S.M. Doglia, and E. Parati, "Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery," *Journal of Controlled Release*, 192, pp.262-270, 2014.
- [348] M.A.A. AL BARI, M.A. M.S. Sayeed, Rahman, and M.A. Mossadik, "Characterization and antimicrobial activities of a phenolic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis* a novel specis collected in Bangladesh," 77-81, 2006.
- [349] M.J. Hajipour, K.M. Fromm, A.A. Ashkarran, D.J. de Aberasturi, I.R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W.J. Parak, and M. Mahmoudi, "Antibacterial properties of nanoparticles," *Trends in biotechnology*, 30(10), pp.499-511, 2012.
- [350] J.J. Rojas, V.J. Ochoa, S.A. Ocampo, and J.F. Muñoz, "Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections," *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1), pp.1-6, 2006.
- [351] P. Hu, Q. Yang, Q. Wang, C. Shi, D. Wang, U. Armato, I.D. Prà, and A. Chiarini, "Mesenchymal stromal cells-exosomes: a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration," *Burns & trauma*, 7, 2019.
- [352] M. Balasegaram, K. Ritmeijer, M.A. Lima, S. Burza, G. Ortiz Genovese, B. Milani, S. Gaspani, J. Potet, and F. Chappuis, "Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis," *Expert opinion on emerging drugs*, 17(4), pp.493-510, 2012.
- [353] S.H. Chen, K.Y. Lin, C.C. Chang, C.L. Fang, and C.P. Lin, "Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells," *Food and chemical toxicology*, 45(11), pp.2296-2303, 2007.
- [354] A. Dutta, D. Sarkar, A. Gurib-Fakim, C. Mandal, and M. Chatterjee, "In vitro and in vivo activity of Aloe vera leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis," *Parasitology research*, 102(6), pp.1235-1242, 2008.
- [355] H. Nahrevanian, M. Jalalian, M. Farahmand, M. Assmar, A.E. Rastaghi, and M. Sayyah, "Inhibition of murine systemic leishmaniasis by acetyl salicylic acid via nitric oxide immunomodulation," *Iranian journal of parasitology*, 7(2), p.21, 2012.
- [356] M.A. Nilforoushzadeh, F. Ghazanfarpour, F. Sokhanvari, N. Ansari, A. Heidari, And M. Maham, "A Comparison of The Effects of Topical Injection of Glucantime

Plus Glycolic Acid 70% and Salicylic Acid 20% with Topical Injection of Glucantime Alone in the Treatment of Acute Cutaneous Leishmaniasis," 2017.

- [357] I.N. Shareef, "Evaluation the efficacy in healing from cutaneous leishmaniasis by intraregional injection of metronidazole solution with acetylsalicylic acid topically (pads)," *Tikrit Journal of Pure Science*, 24(5), pp.5-9, 2019.
- [358] I. Pastar, A.A. Khan, O. Stojadinovic, E.A. Lebrun, M.C. Medina, H. Brem, R.S. Kirsner, J.J. Jimenez, C. Leslie, and M. Tomic-Canic, "Induction of specific microRNAs inhibits cutaneous wound healing," *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), pp.29324-29335, 2012.
- [359] J.C. Dumville, S. Deshpande, S. O'Meara, and K. Speak, "Hydrocolloid dressings for healing diabetic foot ulcers," *Contract No. Art. No.: CD009099. DOI, 10*, p.14651858, 2013.
- [360] P. Martin, "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration," *Science*, 276(5309), pp.75-81, 1997.
- [361] D. Shin, and K.W. Minn, "The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar," *Plastic and reconstructive surgery*, 113(2), pp.633-640, 2004.
- [362] K. Le Blanc, and D. Mougiakakos, "Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system," *Nature Reviews Immunology*, 12(5), pp.383-396, 2012.
- [363] H. Doi, Y. Kitajima, L. Luo, C. Yan, S. Tateishi, Y. Ono, Y. Urata, S. Goto, R. Mori, H. Masuzaki, and I. Shimokawa, "Potency of umbilical cord blood-and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing," *Scientific Reports*, 6, 2016.
- [364] G.R. Willis, A. Fernandez-Gonzalez, J. Anastas, S.H. Vitali, X. Liu, M. Ericsson, A. Kwong, S.A. Mitsialis, and S. Kourembanas, "Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation," *American journal of respiratory [and critical care medicine]*, 197(1), pp.104-116, 2018.
- [365] J. Li, H. Xue, T. Li, X. Chu, D. Xin, Y. Xiong, W. Qiu, X. Gao, M. Qian, J. Xu, and Z. Wang, "Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate the progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice via miR-let7 mediated infiltration and polarization of M2 macrophage," *Biochemical and biophysical research communications*, 510(4), pp.565-572, 2019.
- [366] Y.M. Du, Y.X. Zhuansun, R. Chen, L. Lin, Y. Lin, and J.G. Li, "Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma," *Experimental Cell Research*, 363(1), pp.114-120, 2018.
- [367] S. Hu, Z. Li, J. Cores, K. Huang, T. Su, P.U. Dinh, and K. Cheng, "Needle-free injection of exosomes derived from human dermal fibroblast spheroids ameliorates skin photoaging," *ACS nano*, 13(10), pp.11273-11282, 2019.

- [368] C. Nie, D. Yang, J. Xu, Z. Si, X. Jin, and J. Zhang, "Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis," *Cell transplantation*, 20(2), pp.205-216, 2011.
- [369] D.H. Hoang, T.D. Nguyen, H.P. Nguyen, X.H. Nguyen, P.T.X. Do, V.D. Dang, P.T.M. Dam, H.T.H. Bui, M.Q. Trinh, D.M. Vu, and N.T.M. Hoang, "Differential wound healing capacity of mesenchymal stem cell-derived exosomes originated from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord under serum-and xeno-free condition," *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, p.119. 2020.
- [370] J. Zhang, C. Chen, B. Hu, X. Niu, X. Liu, G. Zhang, C. Zhang, Q. Li, and Y. Wang, "Exosomes derived from human endothelial progenitor cells accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis through Erk1/2 signaling," *International journal of biological sciences*, 12(12), p.1472, 2016.
- [371] L.I. Hu, J. Wang, X. Zhou, Z. Xiong, J. Zhao, R. Yu, F. Huang, H. Zhang, and L. Chen, "Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts," *Scientific reports*, 6(1), pp.1-11, 2016.
- [372] J. Zhang, J. Guan, X. Niu, G. Hu, S. Guo, Q. Li, Z. Xie, C. Zhang, and Y. Wang, "Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis," *Journal of translational medicine*, 13(1), pp.1-14. 2015.
- [373] X. Li, C. Jiang, and J. Zhao, "Human endothelial progenitor cells-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function," *Journal of Diabetes and its Complications*, 30(6), pp.986-992, 2016.
- [374] M. Li, T. Wang, H.E. Tian, G. Wei, L. Zhao, and Y. Shi, "Macrophage-derived exosomes accelerate wound healing through their anti-inflammation effects in a diabetic rat model," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), pp.3793-3803. 2019.
- [375] C.Y. Chen, S.S. Rao, L. Ren, X.K. Hu, Y.J. Tan, Y. Hu, J. Luo, Y.W. Liu, H. Yin, J. Huang, and J. Cao, "Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis," *Theranostics*, 8(6), p.1607. 2018.
- [376] S. Gao, T. Chen, Y. Hao, F. Zhang, X. Tang, D. Wang, Z. Wei, and J. Qi, "Exosomal miR-135a derived from human amnion mesenchymal stem cells promotes cutaneous wound healing in rats and fibroblast migration by directly inhibiting LATS2 expression," *Stem cell research & therapy*, 11(1), pp.1-11, 2020.

A ETİK KURULU KARAR FORMLARI

İstinye Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU (2017-KAEK-120)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Leishmaniasis Tedavisinde Ekstrasellüler Veziküller İçeren Formülasyonların Geliştirilmesi ve Etkinliğinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU (2017-KAEK-120)
	AÇIK ADRESİ:	Maltepe Mah., Edirne Çırpıcı Yolu, No.9 Zeytinburnu, İstanbul
	TELEFON	+90 212 481 36 55 dahili:6210
	FAKS	+90 212 481 36 88
	E-POSTA	ka.etikkurul.sekreteryas@istinye.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyomühendislik			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Yıldız Teknik Üniversitesi / Kimya – Metalurji Fakültesi			
VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Erdal KARAÖZ			
DESTEKLEYİCİ	İstinye Üniversitesi Liv Hospital / Rejeneratif Tıp ve Kök Hücre Üretim Merkezi			
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
	Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
	İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
	İlaç dışı klinik araştırma	☒		
	Diğer ise belirtiniz			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

YUSUF SARIOĞLU
Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU
İmza:

Dijital olarak imzalayan
YUSUF SARIOĞLU
Tarih: 2020.08.18
16:10:03 +03'00'

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU (2017-KAEK-120)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Leishmaniasis Tedavisinde Ekstrasellüler Veziküller İçeren Formülasyonların Geliştirilmesi ve Etkinliğinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	29.12.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	29.12.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒ 29.12.2019		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☒ 29.12.2019		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	DİĞER:	☒	Klinik Araştırma Başvuru Dilekçesi, Klinik Araştırma Başvuru Formu, Gizlilik Taahhütnamesi, Helsinki Bildirgesi Taahhütnamesi, Araştırmanın yapılacağı yerden (Hastane) İzin Belgesi, İyi Klinik Uygulamalar Taahhütnamesi, Özgeçmiş Formu, Literatür,,CD	
	Karar No:2/2020.K-021	Tarih:26.02.2020		
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.				

**YUSUF
SARIOĞLU**

Dijital olarak imzalayan
YUSUF SARIOĞLU
Tarih: 2020.08.18
16:10:20 +03'00'

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. G., Yıldırım Köken, E.Ş., Abamor, A., Allahverdiyev, E, Karaöz. "Combined Study of Wharton Jelly-Derived Exosomes and Salicylic Acid in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis," VII. INSAC International Congress on Natural and Engineering Sciences (ICNES-2021), October 21-23, 2021. (Oral Presentation)
2. G., Yıldırım Köken, A., Allahverdiyev, E.Ş., Abamor, E, Karaöz. "Determination of Anti-Promastigote Effect of Extracellular Vesicles Obtained from Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis," International Marmara Sciences Congress (Imascon 2021 Spring) 21-22 May 2021, Kocaeli, Turkey. (Oral Presentation)

Makaleler

1. G., Yıldırım Köken, E.Ş., Abamor, A., Allahverdiyev, E, Karaöz. "Combinations of Wharton Jelly Derived Exosomes and Salicylic Acid; A New Hope for Eradication of Cutaneous Leishmaniasis," Fresenius Environmental Bulletin, (Basım aşamasında)