



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Sıçanlarda Oleik Asit ile Oluşturulan Akciğer Hasarında
Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı
Eksozomların Olası Rejeneratif Etkisi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF ÖNSÖZ

KÖK HÜCRE VE REJENERATİF TIP

ANABİLİM DALI

**MERSİN
MART-2023**

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Sıçanlarda Oleik Asit ile Oluşturulan Akciğer Hasarında
Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı
Eksozomların Olası Rejeneratif Etkisi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF ÖNSÖZ
ORCID ID: 0000-0001-5665-8985

DANIŞMAN
PROF. DR. KANSU BÜYÜKAFŞAR

KÖK HÜCRE VE REJENERATİF TIP
ANABİLİM DALI

MERSİN
MART- 2023

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

22 /03/ 2023

İmza / Signature

Elif ÖNSÖZ

ÖZET

Sıçanlarda Oleik Asit ile Oluşturulan Akciğer Hasarında Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Olası Rejeneratif Etkisi

Akut akciğer hasarı ve onun ilerlemiş formu olan Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS), tedavisi zor ve yüksek mortalite oranına sahip önemli solunum yolu komplikasyonlarıdır. ARDS'ye yoğun bakım ünitelerinde sıklıkla karşılaşılmamasına rağmen oluşan nötrofilik bir alveolit, hyalen membran birikimi ve mikrotrombüs formasyonu gibi patolojik bulguları tedavi eden bir madde veya ilaç geliştirilememiştir. Bu projede, yıllardır hücre ve doku düzeyinde rejenerasyon sağladığı bilinen kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre ve yeni bir terapötik tedavi yöntemi olarak araştırılan kök hücrelere kaynaklı eksozomların akut akciğer hasarlanmasında rejenerasyon sonuçları gösterildi. Sıçanlara kuyruk veninden uygulanan 60 mg/kg dozunda uygulanan oleik asit, şekil 3'te gösterildiği gibi belirgin akciğer harabiyeti oluşturmuştur. Histopatolojik analiz yapıldığında oleik asit akciğer parankim dokusunda belirgin kanama, infiltrasyon, ödem ve hiperplazi meydana getirmiştir. Histopatolojik görüntünün skorlandırılmasına göre, oleik asit grubunda kontrole göre 3 kat daha yoğun hasar parametreleri elde edilmiştir. Akut akciğer hasarından 2 saat sonra kuyruk veninden verilen 1×10^6 sayısında kemik iliği kök hücreler, oleik asit uygulamasıyla meydana gelen kanama, infiltrasyon, ödem ve hiperplazi parametrelerinde dramatik iyileşme sağlamıştır. Sıçanlarda oleik asit (60 mg/kg) ile indüklenmiş akut akciğer hasarında 1×10^6 sayıda kemik iliği mezenkimal kök hücrelerden salınan eksozom uygulamasıyla serum toplam antioksidan kapasite düzeyleri değerlendirildi. Oleik asit toplam antioksidan kapasiteyi beklendiği gibi süprese ederken eksozom uygulaması bu süpresyonu tersine çevirmemiştir.

İstatistiksel analiz için ANOVA ve post-hoc test için Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi istatistik değerlendirmesinde oleik asit hasarı kontrol grubuna göre (***) , kemik iliği kök hücre grubu oleik asit grubuna göre (&), kemik iliği kök hücre eksozom grubu oleik asit grubu hasarına göre (#), ve kemik iliği kök hücre grubu KİKH-eksozom grubuna göre (a) anlamlı bulunmuştur. ***, &, #, $p < 0.0001$. a, $p < 0.05$ sonucunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut solunum sıkıntısı sendromu, Akut akciğer hasarı, Eksozom, Mezenkimal kök hücre, Rejeneratif tıp

ABSTRACT

Possible Regenerative Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Oleic Acid-Induced Lung Injury in Rats

Acute lung injury and its advanced form, Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), are important respiratory complications that are difficult to treat and have a high mortality rate. Although ARDS is frequently encountered in intensive care units, no substance or drug has been developed to treat pathological findings such as a neutrophilic alveolitis, hyaline membrane deposition and microthrombus formation. In this project, regeneration results of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, which have been known to provide cell and tissue regeneration for years, and stem cells-derived exosomes, which are investigated as a new therapeutic treatment method, in acute lung injury were demonstrated. Oleic acid administered to rats at a dose of 60 mg/kg administered via the tail vein produced significant lung damage as shown in figure 3. When histopathological analysis was performed, oleic acid caused significant bleeding, infiltration, edema and hyperplasia in the lung parenchyma tissue. According to the scoring of the histopathological image, damage parameters were 3 times more intense in the oleic acid group than in the control. Bone marrow stem cells in 1×10^6 numbers given from the tail vein 2 hours after acute lung injury resulted in a dramatic improvement in the parameters of bleeding, infiltration, edema and hyperplasia caused by oleic acid application. Serum total antioxidant capacity levels were evaluated by administering 1×10^6 number of exosomes released from bone marrow mesenchymal stem cells in acute lung injury induced by oleic acid (60 mg/kg) in rats. While oleic acid suppressed total antioxidant capacity as expected, exosome administration did not reverse this suppression.

ANOVA was used for statistical analysis and Dunn-Sidak multiple comparison test was used for post-hoc test. In Dunn-Sidak multiple comparison test statistical evaluation, oleic acid damage compared to control group (***) , bone marrow stem cell group compared to oleic acid group (&), bone marrow stem cell exosome group according to oleic acid group damage (#), and bone marrow stem cell group according to oleic acid group damage (#), The marrow stem cell group was found to be significant compared to the MSC-exosome group (a). ***, &, #, $p < 0.0001$. a shows the result of $p < 0.05$.

Keywords: Acute Respiratory Distress Syndrome, Acute lung injury, Exosome, Mesenchymal stem cell, Regenerative medicine

TEŞEKKÜR

Danışmanım Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a sabrı, rehberliği ve desteği için teşekkür ederim. Onun zengin bilgi birikimi ve titiz düzenlemesi yüksek lisans hayatımı bilgili ve donanımlı tamamlamamı sağladı. Kansu hocamın beni yüksek lisans öğrencisi olarak kabul etmesi ve proje boyunca bana inanmaya devam ettiği için son derece minnettarım. Danışmanımın araştırmaya olan tutkusu ve coşkusu beni akademik kariyer için cesaretlendiriyor. Yüksek lisans tezimin hücre kültürü konusunda her türlü desteğini sunan Dr. Öğr. Üyesi Erkan MAYTALMAN'a çok teşekkür ediyorum. Ayrıca, yüksek lisans tezimde histopatolojik görüntülerde desteğini ve bilgisini esirgemeyen Doç. Dr. Leyla BAHAR'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Mersin Üniversitesi'nde bulunan Biyoloji bölüm başkanı Prof. Dr. Yasemin KAÇAR'a çok teşekkür ederim. Zor zamanlarımda bilimsel ve bunun yanında manevi destekleri sayesinde yüksek lisansımı tamamlayabildim. Kök hücre ve rejeneratif tıp lisansüstü programındaki akademisyenlere yüksek lisans tezime başladığımdan beri bana her konuda yardımcı oldukları için ayrıca teşekkür ederim.

Mersin Üniversitesi ve Kök hücre ve Rejeneratif Tıp yüksek lisans programına beni öğrencisi olarak seçtikleri ve bu projeyi tamamlamam için gerekli mali imkanları sağladığı için teşekkür ederim. Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine yüksek lisans tezimi (Proje No: 2021-2-TP2-4522) maddi olarak destekledikleri için teşekkür ederim.

Ve son olarak, bu uzun süreci benimle birlikte atlatan, her zaman destek ve sevgilerini sunan ebeveynlerime, sevgili kız kardeşime ve çok sayıda arkadaşşıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2021-2-TP2-4522

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-----------|
| İÇ KAPAK | i |
| ONAY | ii |
| ETİK BEYAN | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| KISALTMALAR ve SİMGELER | x |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI | 2 |
| 2.1. Akut Akciğer Hasarı ve ARDS | 2 |
| 2.2. Mezenkimal Kök Hücre | 4 |
| 2.2.1 Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre | 7 |
| 2.3. Eksozom | 8 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 12 |
| 3.1 Sıçanlarda Oleik Asit ile ARDS Modelinin Oluşturulması | 12 |
| 3.2. Kemik İliğinden Kök Hücre Eldesi | 12 |
| 3.3. MKH Kültür Ortamından Total Eksozom İzolasyonu | 13 |
| 3.4. Eksozom İzolasyonu | 14 |
| 3.5. Eksozom Analizi | 14 |
| 3.6. Kan ve Doku Örneklerin Alınması | 14 |
| 3.7. Histolojik İnceleme | 15 |
| 3.8. Total TAS/TOS Düzeylerinin Ölçümü | 16 |
| 3.9. İstatistiksel Analiz | 16 |
| 4. BULGULAR | 17 |
| 4.1. Kemik İliği Kök Hücre Eldesi ve Karakterizasyonu | 17 |
| 4.2. Eksozom Eldesi ve Karakterizasyonu | 19 |
| 4.3. Akut Akciğer Hasarında Hasar Skorlaması | 20 |
| 4.4. Oleik Asit ve Kemik İliği Kök Hücre Uygulaması Sonrasında Serum TAS Bulguları | 26 |
| 4.5. Oleik Asit ve Kemik İliği Kök Hücre Uygulaması Sonrasında Serum TOS Bulguları | 27 |
| 4.6. Kemik İliği Kök Hücrelerden Salınan Eksozom Uygulamasında TAS Sonuçları | 28 |
| | vii |

| | Sayfa |
|---|--------------|
| 4.7 . Kemik İliği Kök Hücrelerden Salınan Eksozom Uygulamasında TOS Sonuçları | 29 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 30 |
| KAYNAKLAR | 34 |
| EKLER | 37 |
| ÖZGEÇMİŞ | 40 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 1. Kemik iliği kökenli MKH elde etme yöntemleri | 13 |
| Şekil 2. Kemik iliği kök hücrelerin ışık mikroskop görüntüleri | 18 |
| Şekil 3. Kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların flow sitometri analizleri | 19 |
| Şekil 4. Oleik aside maruz kalan akciğer dokusunda kemik iliği kaynaklı MKH uygulanması ile oluşan "Total hasar skoru" değerlerinde histomorfolojik düzelme bulguları. | 20 |
| Şekil 5. Kemik iliği kök hücrelerin oleik asit ile oluşturulmuş akut akciğer hasarında terapötik etkisi. | 21 |
| Şekil 6. Oleik aside maruz kalan akciğer dokusunda kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozom uygulanması ile oluşan "Total hasar skoru" değerlerinde histomorfolojik düzelme bulguları | 22 |
| Şekil 7. Kemik iliği kök hücrelerin oleik asit ile oluşturulmuş akut akciğer hasarında terapötik etkisi. | 23 |
| Şekil 8. Oleik aside maruz kalan akciğer dokusunda Kemik iliği mezenkimal kök hücre ve kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozom uygulanması ile oluşan "Total hasar skoru" değerlerinde histomorfolojik düzelme bulgularının karşılaştırılması. | 24 |
| Şekil 9. Kemik iliği kök hücrelerin ve kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların oleik asit ile oluşturulmuş akut akciğer hasarında terapötik etkisi. | 25 |
| Şekil 10. Sıçanlarda oleik asit ve sonrasında kemik iliği kök hücre uygulamasının serum antioksidan kapasite üzerine etkisi. | 26 |
| Şekil 11. Sıçanlarda oleik asit ve sonrasında kemik iliği kök hücre uygulamasının serum antioksidan kapasite üzerine etkisi. | 27 |
| Şekil 12. Kemik iliği kök hücre kökenli eksozomların sıçanlarda total antioksidan kapasiteye etkisi. | 28 |
| Şekil 13. Sıçanlarda oleik asit ve sonrasında kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozom uygulamasının serum antioksidan kapasite üzerine etkisi. | 29 |

KISALTMALAR ve SİMGELER

| Kısaltma/Simge | Tanım |
|-----------------------|--|
| AAH | Akut Akciğer Hasarı |
| ARDS | Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu |
| iPSC | indüklenmiş Pluripotent Kök Hücre |
| KİKH | Kemik İliği Kök Hücre |
| KİKH-Exo | Kemik İliği Kök Hücre-Eksozom |
| TGF- β 1 | Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta-1 |
| TGF- β 3 | Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta-3 |
| IGF-1 | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 |
| FGF-2 | Temel Fibroblast Büyüme Faktörü-2 |
| BMP-2 | Kemik Morfogenetik Protein-2 |
| MKH | Mezenkimal Kök Hücre |
| Bcl-2 | B hücreleri lenfoma-2 |
| Bax | Bcl-2 proteini ile bağlı X proteini |
| IL-1 β | İnterlökin-1 Beta |
| IL-6 | İnterlökin-6 |
| IL-4 | İnterlökin-4 |
| IL-10 | İnterlökin-10 |
| TNF- α | Tümör Nekroz Faktör alfa |
| mRNA | Mesajcı RNA |
| miRNA | MikroRNA |
| siRNA | Susturucu RNA |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| LPS | Lipopolisakkarit |
| RT-PCR | Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| SM | Kükürt Mustard gazı |
| hBMSC | insan Kemik İliği Kök Hücresi |
| TLR4 | Toll benzeri reseptör 4 |
| i.v. | İntravenöz |

1. GİRİŞ

Akut Akciğer Hasarı (AAH) ve ilerlemiş formu olan Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS) tedavisi olmayan ve ölüm oranı %45'lere kadar ulaşan tehlikeli hastalıklardır. ARDS ile yoğun bakım ünitelerinde sıklıkla karşılaşılmasına rağmen oluşan nötrofilik bir alveolit, hyalen membran birikimi ve mikrotrombüs formasyonu gibi patolojik bulguları tedavi eden bir madde veya ilaç geliştirilememiştir. Akut solunum sıkıntısı sendromunu bu kadar tehlikeli yapan başka bir durum ise başka hastalıkların önce akut akciğer hasarına sebep olması ve ilerleyerek ARDS oluşturmasıdır. ARDS'nin yaygın nedenleri olarak travmayı takiben şiddetli pulmoner veya sistemik enfeksiyonlar, ciddi yanıklar, pankreatit, aspirasyon olayları, ilaç reaksiyonları, çoklu kan nakli, inhalasyon yaralanmaları, enfeksiyon örnek gösterilebilir. Akut solunum sıkıntısı sendromu oluşumunun esas nedeni akciğerlerdeki kılcal damarlardan alveollere sıvı sızmasıdır. Bu noktada ilaçlar etkili olmaz çünkü aktif hasar almış yara dokusunun yenilenmesi gerekmektedir.

Bu yüksek lisans tezinde amacım sıçanlarda oleik asit ile oluşturulan akut akciğer hasarı modelinde, kemik iliği ve kemik iliği kökenli eksozomların akciğer dokusunda oluşturduğu olası rejeneratif etkisini test etmektir. Bu amaçla, Wistar sıçanlarında oleik asit ile indüklenen akciğer harabiyeti geliştikten sonra kemik iliği mezenkimal kök hücre ve bu hücrelerden izole edilen eksozomların terapötik etkisi gerek akciğer dokusunda histopatolojik olarak gerekse serumdaki oksidan/antioksidan kapasiteler kolorimetrik olarak değerlendirildi. Bu çalışmanın hedeflerinden biri, hücre kültürü ile elde edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) nakli ile ARDS'ye bağlı gelişen akciğer hasarının hücresel ve dokusal düzeyde giderilmesine etkisini analiz edilmesi olarak belirlendi. Bununla beraber kök hücrelerden salınan eksozomların ise yara dokusunda rejenerasyonu desteklediği, küçük miktarlarda etkin sonuç verdiği ve neredeyse her hücre tipinden salgılandığı bilinmektedir. Bu nedenle ikinci bir hedef olarak projede kemik iliği kök hücrelerinden salınan eksozomların rejeneratif etkinliği de analiz edildi.

Oleik asit ile indüklenmiş akut akciğer hasarı oluşturulmuş sıçanlara uygulamadan 2 saat sonra kemik iliği mezenkimal kök hücre ve kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomlar kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Kemik iliği kök hücre ve kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozom uygulamasından 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Sıçanların sağ akciğerinden alınan kesitten histolojik inceleme ile hasar skorları belirlendi. Akciğer hasar skorlaması kanama, infiltrasyon, ödem ve hiperplazi olmak üzere 4 farklı grupta değerlendirildi. Kardiyak kanından elde edilen serumdan ise TAS-TOS değerlerine değerlendirildi. TAS değeri hücrede içerisindeki toplam antioksidan kapasiteyi ölçerken TOS değeri hücre içerisinde oksidatif strese neden olan oksidan seviyesini ifade eder.

Elde edilen sonuçlara göre, oleik asit ile oluşturulmuş akut akciğer hasarı modelinde kanama, infiltrasyon, ödem ve hiperplazi parametrelerinin hepsinde ciddi artış gözlemlenmiştir. İlk grup olan kemik iliği kök hücre uygulamasında, oleik asit ile akut akciğer hasarı oluşturulduktan 2 saat sonra 1×10^6 kemik iliği kök hücre 500 µl PBS içerisinde çözdürülerek intravenöz şekilde uygulanmıştır. Oleik asit uygulaması beklenildiği gibi kontrol grubuna (40µl %70 etil alkol+ 260µl salin çözeltisi) kıyasla bütün parametrelerde artış sağlamıştır. Kemik iliği kök hücre uygulaması 4 parametrede de belirgin düzeyde iyileşme sağlamıştır ($p < 0.0001$). Kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozom grubunda ise eksozomlar 1×10^6 sayıda kök hücreden elde edilecek şekilde ayarlanmıştır. Kemik iliği kök hücre ve kemik iliği kaynaklı eksozomların akciğer hasarı kıyaslandığında hem kemik iliği kök hücre ve hem de kemik iliği kök hücreden salınan eksozomların ödem, infiltrasyon, hiperplazi ve kanama parametrelerini azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak, birbirlerine karşı rejeneratif etkileri kıyaslandığında kemik iliği kök hücre grubunun ortalama akciğer hasar skorunu belirgin şekilde düzelttiği gösterilmiştir. ($p=0.02$) Kemik iliği kök hücre grubunda TAS ve TOS değerlerinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak, oleik asit uygulaması toplam antioksidan kapasiteyi süprese etmiştir ($p=0.02$). Kemik iliği kaynaklı eksozomlar bu süpresyonu tersine çevirememiştir. Kemik iliği kaynaklı eksozom uygulamasında toplam oksidan seviyesinde ise belirgin pozitif sonuç gözlemlenmemiştir. Sonuçlarımız akut akciğer hasarı modelinde kemik iliği kök hücre ve kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların rejeneratif etkisini akciğer dokusunda histopatolojik olarak incelemiş çalışmalarla akciğer hasar skorlaması sonuçlarında paralellik göstermiştir. Özellikle, kemik iliği kök hücre ve kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların rejeneratif etkisini LPS ile indüklenmiş ARDS modelinde araştıran bir çalışmada olduğu gibi kemik iliği kök hücrelerin hasar parametrelerini daha fazla düzelttiği gözlemlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Akut Akciğer Hasarı ve ARDS

Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) pek çok hastalığa bağlı olarak gelişebilen akut akciğer hasarının ilerlemiş hali olup sonucunda akciğer iltihabı, alveolar hasar ve pulmoner ödem gözlemlenir. İlk akciğer hasarının nedenine bağlı olmadan, ARDS aşamasına gelmiş hastalar ikincil akciğer enfeksiyonu (ventilatörle ilişkili pnömoni) geliştirmeye eğilimlidir. İlk olarak 1967 yılında Ashbaugh ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan akut akciğer hasarı (AAH) ve “*acute respiratory distress syndrome*” sendromu (ARDS) yüksek ölüm oranı ile bilinmektedir. AAH/ARDS, doğrudan akciğer hasarı veya sistemik inflamatuvar sonucunda oluşur. Hastalığın bilinen semptomları diffüz alveolar hasar, alveolar-kapiller membran bariyerinin artan geçirgenliği sayılabilir. Akut akciğer hasarının hücresel boyutta gözlemlenen semptomları; alveolar-kılcal membran bütünlüğünün kaybını, aşırı trans-epitelyal nötrofil göçünü ve proinflamatuvar sitotoksik mediatörlerin salınımını içerir. Alveollerde sıvı arttığında dışa doğru hareket devam eder ve alveolar boşlukları doldurur. Bu sıvının alveol boşluklarına yayılması solunum sıkıntısına yol açar, ölümcüldür ve tedavisi yoktur. Farmakolojik denemeler, terapötik olarak etkili bir strateji sağlamamıştır. Mevcut araştırma, öncelikle biyolojik biyobelirteçlerin ARDS ve mezenkimal kök hücre tedavisi için erken terapötik veya önleyici yaklaşımlardaki rolüne odaklanmıştır ve bu alanda yer alan hücre yenilenmesi, ölüm oranı azaltılması, hasarlı dokunun hızla iyileşmesi gibi çalışmalar hızlandırılmıştır (1, 2, 4).

ARDS bu derece yüksek ölüm oranlarına sahip olması nedeniyle, hayvan modelleri oluşturularak ilaç tedavisi geliştirmek amaçlandı. ARDS ile hayvan modeli oluştururken, İnsandaki AAH ve ARDS'nin 3 önemli özelliğini (nötrofilik bir alveolit, hyalen membran birikimi ve mikrotrombüs formasyonu) tedavi etmek için yola çıkılmıştır. En iyi hayvan modelinin tüm patolojik özellikleri gösterse bile insanda oluşan ARDS patolojisine tam uygun bir model oluşturulamamıştır. Bu yüzden en uygun modellerden biri olan oleik asit modeli uygun görüldü. Oleik asit, AAH/ARDS mekanizmalarının incelenmesi için deneysel AAH hayvan modeli oluşturup akciğer epitelinde ve endotelde hasara yol açtığı bilinmektedir (9, 10, 19).

Oleik asit ile indüklenmiş akciğer hasarında, erken bir nekroz ve mikrovasküler tromboz fazı oluşur. Daha sonra subplevral alanlarda tip II hücrelerin ve fibrotik odakların proliferasyonu ile bir onarım fazı başlar. Mikroskobik olarak yaralanma, küçük ödem alanlarından fibrin birikimi ile hemorajik infiltrasyona odaklı bir akciğer hasarı modeli meydana gelir. Bu yağ asidi ile oluşturulan akciğer hasarı, sıvının ekstrasvasküler boşluğa ekstrasvazyonunu ve azalmış sıvı reabsorpsiyonunu tetikleyerek ekstrasvasküler akciğerde sıvı

birikmesine neden olur. Pulmoner mikrovasküler geçirgenlik, akciğerde ekstravasküler sıvı birikmesi ve proteinden zengin sıvının hava boşluklarına sızması ile belirgin olarak artar (11, 12).

Oleik asitin intravenöz uygulamasından sonra yaklaşık %85 oranında hedef organ olan akciğerde tutulur. İlk lezyonlar uygulamadan 5 dakika sonra ortaya çıkar ve en az 24 saat sürer. Akciğere ulaşan oleik asit, nötrofil birikimini indükler. TNF- α ve IL-8 seviyelerinin artış ve bunun yanı sıra IL-6, IL-1 β ve kemokin MIP-1 α seviyelerinde yükselme görülür. Sonuç olarak, oleik asit klinik ARDS'de yer alan ana inflamatuvar mediatörlerin sentezini indüklemiş olur. Diğer taraftan bu yağ asidi Na-K-ATPazı ve ayrıca akciğerde bir sodyum (Na⁺) kanalını inhibe eder. Na-K-ATPazın inhibisyonu endotelial permeabilite artışının ana sebebi olarak görünmektedir. Ayrıca oleik asit, akciğer hücrelerinin ölümüyle sonuçlanan hücre içi yolakları tetikler. Hem antiapoptotik bir belirteç olan Bcl-2'de bir azalma ve hem de proapoptotik bir belirteç olan Bad'da da belirgin bir artış yapar ve bu sayede hücre apoptozunu tetikler. Apoptoz artışına oleik asidin ayrıca kaspaz 3 ve 6'yı aktive etmesi ve buna bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırması ve lökositlerde mitokondriyal depolarizasyon stimüle etmesi de aracılık eder. Ayrıca oleik asidin gerek in vivo sıçan modelinde ve gerekse in vitro A549 epitelyal akciğer hücrelerinde hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinazı 1 ve 2'yi (ERK 1,2) inhibe ettiği gösterilmiştir (11,12).

2.2. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücre araştırmaları, 1970'lerden bu yana büyük ölçüde genişlemiştir. Tedavisi ilaçla mümkün olmayan veya hücresel boyutta yenilenme gerektiren hastalıklarda, büyük ölçüde hasara ve enfeksiyona uğramış doku yaralanmasının onarılmasında olumlu sonuçlar vermesi nedeniyle kullanımları artış göstermiştir.

Mezenkimal kök hücre (MKH), yağ dokuda, kemik iliğinde, kordon kanında bulunan, kendilerini yenileme, farklılaşma ve özellikle doku onarım kapasiteleri oldukça yüksek olan kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler birçok klinik denemesinde kullanılır. Bunun nedeni ise mezenkimal kök hücrelerin önce yaralı dokuların salgıladığı proinflamatuvar sitokinleri baskılaması daha sonra ise hasarlı dokuların yerini alan hücrelere farklılaşması hipotezine dayandırılmıştır (3).

Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışma, hücresel tedavinin hem in vitro hem de in vivo araştırmalarda büyük gelişme göstermiştir. Doku rejenerasyonu için embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler) gibi yetişkin ve pluripotent kök hücrelerin birden fazla kök hücre kaynağını kullanılmıştır. Bu yüzden mezenkimal kök hücrelerin kendini

yenileme için yüksek bir potansiyeli vardır. Pluripotent kök hücreler hastalıkların tedavisi için önemli bir seçenek haline gelmiştir. Yakın zamanda yapılan araştırmalar sonucunda, klinik öncesi ortamda iPSC'lerin rejeneratif yeteneğini ve moleküler bozulma ile ilişkisi araştırıldı (8, 23, 26). Çeşitli araştırmalar sonucunda iPSC'lerin ve diğer mezenkimal kök hücre tedavilerinin, kök hücre farklılaşması ve yeni belirli hücrelerin üretimi yoluyla kemik onarımı, yara dokusunda, minber ve iskemik kalp dokusu dahil olmak üzere yaralı organları in vivo olarak yenileyebileceğini ve onarabileceğini bildirmiştir. Ayrıca, bazı araştırmalar, hücre kültürü ortamında büyütülmüş yetişkin kök hücrelerin, rejenerasyonu uyaran anti apoptotik, bağışıklık düzenleyici, anjiyojenik ve kemoattarktan özelliklere sahip birçok moleküler faktörü saldığını göstermiştir. MKH'lerin tipik özelliklerinden biri, bu kök hücrelerin in vitro olarak bir dizi dokuya farklılaşabildikleri çok yönlü kapasiteleridir. MKH'lerin in vitro kondrojenik farklılaşması, yaygın olarak bunların TGF- β 1 veya TGF- β 3, IGF-1, FGF-2 veya BMP-2 varlığında hücre kültürü yapılması yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir. Kondroblastlara MKH farklılaşması, kollajen tip II, IX, agrekan ve kondroblast hücre morfolojisinin proliferasyonu gibi çeşitli genlerin artması ile karakterize edildiği bildirilmiştir. Kondrojenez süreci sırasında, FGF-2, TGF- β 1 veya TGF- β 3 ve/veya IGF-1 ile indüklenen MKH'leri destekledi. Literatür çalışmalarına göre, hedgehog, Wnt/ β -katenin, TGF- β s, BMPs ve FGFs gibi çeşitli moleküler yolları düzenleyebildiği gösterilmiştir.

MKH'lerin, makrofajları etkileyerek inflamasyon yanıtını düzenler. MKH'ler hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık sistemleri için bağışıklık modülatörleri görevi görür. Mezenkimal kök hücreler inflamatuvar makrofajların (M1 makrofajları) onarıcı, terapötik makrofaj fenotipe olan M2 makrofajlarına diferansiye olmasını sağlar. Daha önce yayınlanmış bir çalışmada, MKH'lerin akciğer infiltrasyonunu ve pulmoner ödemin çözülmesini baskıladığı bulunmuştur. MKH'ler multipotent, rejeneratif ve kendi kendini yenileyebilir ve immün yanıtı baskılama ve in vitro tip II alveolar epitel hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (28, 33).

MKH'ler, progenitör hücreleri ve hasarlı hücrelerin iyileşmesini uyarmak ve matris yeniden şekillenmesini indükleyen çoklu trofik faktörleri ile indükleyebildikleri bildirilmiştir. MKH'ler bu yolla (trofik fak..vb.) miyofibroblastları azaltabildikleri ve yaralı dokuların fibrotik aktivitesini tersine çevirebildikleri gösterilmiştir. Bu hücreler, doku fonksiyonunun iyileşmesine katılan VEGF, IGF-1 ve anti-inflamatuvar faktörleri içeren pro-anjiyojenik faktörleri salarak fare kalp hastalığı modelinde VEGF aracılığıyla iskemik miyokardın neovaskülarizasyonunu artırabilme ve ayrıca IGF-1, kardiyomiyositlerin hayatta kalması ve çoğalması gibi pozitif bir etki gösterebilmektedirler (40).

AAH ve ARDS'li hastaları inceleyen bir faz 2 klinik çalışmada, MKH'lerin anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (39). Bu ön çalışma sonucuna dayanarak, MKH'ler ARDS'yi hafifletebileceği ve ayrıca kronik solunum fonksiyon bozukluğu ve akciğer fibrozunun rejenerasyonu sağlayabildiği gözlemlenmiştir. Mezenkimal kök hücreler akciğer fibrozisinin tedavisi için tercih edilen terapötik bir yaklaşımdır. En çok tercih edilen yaklaşım olması şu nedenlerden dolayı olasıdır: kolay izole edilmesi; immün yanıt oluşturmaması, antiinflamatuar ve onarıcı özellikleri birlikte bulundurmaları sayılabilmektedir. Klinik deneyler ile akciğer fibrozunda doku onarımı sırasında mezenkimal kök hücrelerin etki bölgesine göç ettiği etmesi ve onarım sürecinde büyük ölçüde kendi salgıladıkları hücre dışı veziküllerinin aracılık ettiği gösterilmiştir. Veziküllerden epitelyal ve endotelyal geçirgenliği düzenleyen ve inflamasyonun azalmasına neden olan çoklu parakrin faktörlerini serbest bırakıldığı bulunmuştur. Yapılan bir klinik çalışmada ARDS hastalarına mezenkimal kök hücreler uygulandıktan 12 saat sonra TNF- α ve IL-6 değerlerinde azalma gözlemlenmiş ve devam çalışması olan faz 2 deneyinde ise klinik bulguların ilerleme göstermediği sonucuna ulaşılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin etki mekanizmasını inceleyen araştırmada ise kolinerjik anti-inflamatuar yolağını inhibe ederek inflammatuar yanıtı baskıladığı ortaya konulmuştur. Kolinerjik anti-inflamatuar yolak, nöronlar yanında alveolar epitelyal de bulunan $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptör ($\alpha 7nAChR$) aktivasyonunu sağlayarak antiinflamatuar sitokinlerin salınmasını arttırmıştır (46).

LPS ile indüklenen ARDS modelinde mezenkimal kök hücreler *in vitro* model olarak A549 epitel hücrelerinde uygulandıktan sonra TNF- α seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Çalışmanın *in vivo* kısmında, inflammatuar CXCL12'nin (stromal hücre kaynaklı faktör 1) upregüle olduğu ve mezenkimal kök hücre uygulamasından sonra tersine döndüğü gösterilmiştir. MKH uygulaması, ayrıca apoptozda rol aldığı bilinen Bax/Bcl-2 ve kaspaz 3, 8, 9 proteinlerinin aktivitesini de azalmıştır. Ayrıca CXCL12 antagonisti gibi fonksiyon gören CXCR4 (kemokin reseptörü tip 4) de upregüle olarak antiinflamatuar yanıtı arttırmıştır (16).

Bundan başka MKH'lerin, ARDS gelişmiş hastalarda, aşırı bağışıklık tepkilerini hafifletmek için T hücrelerinin aktivasyonu tetiklenmesinde rol oynadıkları bulunmuştur. Veziküllerden epitelyal ve endotelyal geçirgenliği düzenleyen ve inflamasyonun azalmasına neden olan çoklu parakrin faktörlerini serbest bırakılmasıdır. Bundan başka MKH'lerin, ARDS gelişmiş hastalarda, aşırı bağışıklık tepkilerini hafifletmek için T hücrelerinin aktivasyonu tetiklenmesinde rol oynadıkları bulunmuştur.

Akciğerlerle ilişkili spesifik yaralanmalara yanıt olarak homeostazın sağlanması ve rejenerasyonun desteklenmesi için eksozomların taşıdığı sitokinlerin salınımının sayesinde inflamasyonun azaltılmasının farklı yollarla iyileşmeyi desteklediği belirtilmiştir. Bu eksozomlar, akciğerlerde onarıcı, terapötik ve rejeneratif işlevleri tetiklemek başlatmak için

mRNA, mikroRNA, DNA, proteinler ve çeşitli metabolitlerin sağlanmasını yönlendirdiklerini düşünülmektedir [32].

2.2.1 Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre

Kemik iliği kök hücrelerin rejeneratif potansiyeli son yıllarda büyük bir atılım yaşanmasına yol açmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin içerdiği bazı makro ve mikromoleküllerin, örneğin mRNA ve daha küçük boyutlarda olan miRNA, siRNA ve ekzozom bileşenleri sayesinde hücresel düzeyde yenilenmeyi tetiklediği ortaya konulmuştur. Kemik iliğinde bulunan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), farklı hücre türlerine (kondrositler, miyoblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve nörositler) farklılaşma yeteneğini korur ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptir. Hücre temelli tedaviler ve potansiyel klinik kullanım için mezenkimal kök hücrelerin biyolojisini anlamaya artan bir ilgi vardır. Son in vivo ve in vitro çalışmalar, multipotent özellikte olan mezenkimal kök hücrelerin AAH/ARDS üzerinde de terapötik etkileri olabileceğini göstermektedir (25, 26, 30).

Önemli bir akciğer patolojisi olan, yüksek mortalite ile seyreden ve literatürde ARDS olarak bilinen akut solunumsal sıkıntı sendromu, hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3 farklı sınıfa ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma PaO₂/FiO₂ oranına bağlıdır. PaO₂/FiO₂ oranı normalde 300-500 mmHg olan ve 200 mmHg altına düştüğünde ciddi hipoksemiye gösteren klinik bir bulgudur. PaO₂ arteriyel oksijen basıncını ve FiO₂ ise solunan havada oksijen molekül sayısını gösterir. Orta dereceli basamak akut akciğer hasarı olarak da bilinir. Mezenkimal kök hücrelerin en önemli yeteneklerinden biri, antifibrotik aktivitedir. Bu hücreler hem in vivo hem de in vitro olarak hepatositler gibi çeşitli hücre soylarına farklılaşabilir. Bu nedenle ARDS çalışmalarında mezenkimal kök hücreler ve çoğunlukla kemik iliği mezenkimal kök hücreler kullanılmaktadır. Kemik iliği kök hücrelerin ARDS modelinde iyileşme etkisini göstermek için yapılan başka bir çalışmada, LPS ile oluşturulmuş ARDS kullanılmıştır. Kemik iliği kök hücreler apoptoz ile ilgili p-GSK-3β ve Bax regülasyonunu azaltmıştır. Bcl-2 regülasyonu ise artarak apoptozu inhibe etmiştir. Bu proteinlerin ise Wnt/ β-katenin yolağını düzenleyerek apoptozu azalttığı literatüre eklenmiştir (22, 26).

LPS ile indüklenmiş ARDS modelinde kemik iliği HOXB4 gen ekspresyonu artırıldığında dışarıdan uygulanan kemik iliği kök hücrelerin hem rejenerasyonu sağladığı hem de kemik iliği rezervini artırdığı bildirilmiştir. Dahası, gerek sadece kemik iliği kök hücre ve gerekse HOXB4 upregülasyonu yapılmış kemik iliği kök hücre uygulamasının inflamatuvar ve katastrofik sitokinler olan IL-1β, IL-6 ve TNF-α değerleri azalttığı da gösterilmiştir. Buna karşılık, anti-inflamatuvar faktörler olan IL-4 ve IL-10 değerlerinin arttığı gözlemlenmiştir (16). İlginç olarak,

bir insan faz 1 çalışmasında, 9 orta seviye ARDS hastasına üç farklı dozda kemik iliği kök hücreler verilerek yapılan bir klinik çalışmada düşük (1×10^6) ve orta (5×10^6) doz KİKH uygulanmasıyla mortalite oranı %22 iken yüksek dozda (1×10^7) hiç mortalite görülmemiştir (41).

Kemik iliği kök hücre uygulaması, sadece akciğer hasar modellerinde değil bunun yanında pek çok nörolojik hastalıkların tedavisinde umut verici terapötik sonuçlar göstermiştir. Motor nöron hastalığı olarak da bilinen amyotrofik lateral skleroz (ALS) modeli oluşturulan çalışmada ALS'li 26 hastaya intratekal olarak $15 \pm 4.5 \times 10^6$ kemik iliği kök hücre enjekte edilmiştir. Sonuç olarak ALS fonksiyonel derecelendirme ölçeği (ALSFRS) önemli ölçüde azalmıştır. Kemik iliği kök hücreler farklı yaralanma modellerinde de rejeneratif etkisi gösterilmiştir (37). Örnek olarak; omurilik yaralanması (SCI) modelinde, omuriliğe verilen hasarın yol açtığı motor, duyu ve otonomik rollerinde 1×10^7 hücre/ml kemik iliği kök hücre enjeksiyonu omurilik hasarının semptomlarını anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür (28). Tüm katılımcıların dokusal hassasiyette ve motor fonksiyonel kazanımlarını iyileştirdiğini ortaya koydu. Diğer bir nörolojik hastalık olan Parkinson hastalığı (PD), temel olarak dopaminerjik nigrostriatal sistemin bozulmasına bağlı olarak motor aktivitelerin bozulmasıyla karakterize nörolojik bir hastalıktır. Yapılan klinik bir çalışmada, ilerleyici supranükleer felçten mustarip hastalara intra-arteriyel enjeksiyon yoluyla otolog kemik iliği kök hücreler uygulandığında hastalığın ilerlemesini azalttığını gösterilmiştir. 2019 yılında yürütülen bir çalışmada, subakut inmeli 31 hastaya kemik iliği kök hücreleri intravenöz enjeksiyonu yapılmıştır ve bölgesel olarak motor nöronlarda iyileşme gösterdiği görülmüştür (27). Kemik iliği kök hücrelerin hepatosit benzeri hücreler gibi endodermal kökene farklılaşma potansiyeli sayesinde karaciğer hastalıklarının tedavisinde de kullanılmışlardır. Karaciğer sirozu hastalarına kemik iliği kök hücresi verilerek klinik bir faz II uygulamasında alkolik sirozda doku fibrozunu inhibe ettiğini ve karaciğer fonksiyonunu iyileştirdiğini gösterilmiştir.

2.3. Eksozom

Son 10 yılda eksozomların çok yönlü işlevlerinin belirlenmesi ile birlikte ve terapötik kullanımına dair araştırmalar hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Eksozomların rejenerasyondaki rollerinin öneminin anlaşılmasıyla klinik çalışmada da artarak yer aldığı görülmektedir.

Bugüne kadar araştırmalar sonucu Eksozomların genel özelliklerinin şu şekilde özetlenebilmektedir: yaklaşık olarak 40-100 nanometre çapında, mRNA, miRNA, siRNA, kodlanmamış RNA, DNA parçaları ve daha küçük bileşenleri içeren hücre zarından oluşan ve hücreden salınan yapılardır. Eksozomlar iç zar içeren hücre tiplerinden salınırlar bu yüzden

sitoplazmik hücre zarı ile çevrilidirler. Sitoplazmik hücre zarında bulunan eksozoma özgü yüzey belirteçleri bulunur. Deneyleerde eksozomları tanımlamak için bu markerlara bakılır (15, 20).

Literatürde bilinen öncü eksozom deneyleerinden biri olan Harding et al., 1983 makalesinde bahsedildiği gibi ilk olarak kültüre edilmiş koyun eritrosit süpernatantında keşfedilmiştir. Eksozomların isimlendirilmesi ise 1987 yılını bulmuştur. Eksozom araştırmalarında gözlenen hızlı geometrik artışın sebepleri şu şekilde sıralanabilir; öncelikle araştırmacılar eksozomların hücreler arası iletişime kanıt olduğunu ve makro moleküllerin taşınmasında önemli sistematik etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Buna ek olarak, eksozomların sadece taşımada değil aynı zamanda protein, yağ molekülleri, mRNA, miRNA ve DNA gibi hücrelerin yaşam döngüsüne katkıda bulunan moleküllerin salınmasını da sağladığını kanıtlamışlardır. Son olarak, bilim insanları eksozomların morfolojik özellikleri sayesinde ilaç taşıma ve iletme sisteminde küçük kesecikler olarak kullanılmasının immün yanıt sorununu çözeceğine, bununla birlikte sentetik ilaçlardan daha etkili bir şekilde vücutta taşınacaklarını ön görmektedirler. Salgılanan eksozomlar hücre sel sıvılar ve dolaşım sistemi yardımıyla hedef hücreye ulaşırlar. Eksozomların vücuttaki dolaşımı hormonlara benzerlik göstermektedir. Parakrin etkiler ile hedef hücreyi uyararak hedef hücrede biyolojik süreci etkilerler. Eksozomlar hedef hücre tarafından endositoz ile hücre içine alındıktan sonra eksozomların taşıdığı miRNA'lar hücrede transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarını ikincil mesajcı olarak etkiler. Hücrelerden salgılanan eksozomların farklı koşullarda farklı CD tipleri bulundururlar ve taşıdıkları proinflatuar ve antiinflatuar ile sitokinlerin faaliyetlerini düzenlediği gözlemlenmiştir. Hücrelerin salgıladığı eksozom miktarlar değişse de en fazla bağışıklık sisteminin B hücreleri, dendritik hücreler ve bağışıklık sisteminde bulunan ve homeostaziye katkıda mast hücrelerinden salgılanır. Yapısal olarak eksozomları salgılamasının yanı sıra, bu hücreler ayrıca hücre sel etkileşimlerle eksozom salgılamak üzere uyarılabilir. Eksozomların taşıdığı miRNA, siRNA, DNA ve mRNA ile transkripsiyonun ve translasyonun düzenlenmesi, sitokin faaliyetlerinin düzenlenmesi hücre sel ve dokusal rejenerasyonu desteklemesi için kullanılmaktadır (15, 20, 24).

ARDS ve akut akciğer hasarında pek çok eksozom çalışması yapılmıştır. Eksozomların ARDS hastalığındaki rolünü araştırmak için önce inflamasyonu yüksek olan akciğer hasar modelleri üzerinde denenmiştir. LPS ile oluşturulan ARDS modelinde, inflamatuar sitokinler TNF- α , interleukin-1 β değerleri yükselmiş ve mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların bu değerlerin seviyesini azalttığı ve inflamasyon yanıtını düzenlediği gösterilmiştir. Devam çalışmasında ise kemik iliği kök hücrelerden salınan eksozomlar LPS ile indüklenmiş ARDS modelinde sıçan alveoller makrofajları 20 μ g/ml eksozom içeren ve sadece 20 μ g/ml kemik iliği kök hücre içeren ortam koşullarına bırakılmıştır. Rejenerasyona katkı sağlayan miR-384-5p

seviyesinin yükselmiştir ve eksozom miktarı arttıkça miR-384-5p alveol makrofajlarda bulunan miktarı artmıştır (26). Sıçanlarla yapılan yaşam süresi deneyinde ise LPS ile oluşturulmuş ARDS modelinde LPS stimülasyonundan sonra, akciğer dokusunda yaygın lökosit infiltratları, yaygın interstisyel ve alveolar ödem, belirgin interalveolar septal kalınlaşma, akciğer kanaması, alveolar boşlukta hiyalin membran oluşumu ve alveoler kollaps patolojisi eksozomların uygulanması sonrası hafiflemiştir.

Mustard gazı ile oluşturulmuş akut akciğer hasarı araştırmasında kemik iliği kök hücre eksozomların terapötik etkisi test edilmiştir. Farelere 30 mg/kg SM enjekte edilmiş ve 5 gün sonra kemik iliği kök hücre eksozom (KİKH-Exo) 20 µg/kg in 200 µL PBS içerisinde çözdürülerek intravenöz şekilde verilmiştir. Farklı miktarlarda verilen kemik iliği kök hücre eksozomlar (10, 20, 40 µg) akciğer ödemeine karşı koruyucu etki sağlamış ve eksozom miktarı arttıkça rejenerasyon etkisi arttığı gözlemlenmiştir (29).

Literatürde en çok bilinen eksozom ve rejeneratif tıp uygulaması kapsamında; nöron rejenerasyonu, kalp dokusu rejenerasyonu, deri ve kas rejenerasyonları çalışılmıştır (35, 36, 37, 41). Glutamatla uyarılan oligodendrositten türetilen eksozomların oksijen ve glikozdan yoksun nöronları hayatta kalmaya teşvik ettikleri gözlemlenmiştir. Xin ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışmada kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların miRNA-133b bulduklarını ve miRNA-133b'nin nöronlarda gelişmeyi tetiklediğini göstermiştir (44). Hücre kültürü ortamına KİKH-eksozom verilerek, nöronların dallanma sayısının ve akson uzunluğunun arttığı gözlemlenmiştir. Mezenkimal kök hücreler ile beyin parankimal hücreleri arasında iletişimin gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Travmatik beyin hasarı alan farelere insan kemik iliği kök hücresi (hBMSCs) enjekte edilmiştir. Sonuç olarak, hBMSC'ler tarafından salınan eksozomların, travmatik beyin hasarından sonra sıçanlarda fonksiyonel iyileşmeyi önemli ölçüde iyileştirdiğini gösterdi. miR-17-92 kümesine sahip özel eksozomlar aksonal büyümeyi artırdığı ve akson büyüme hızını arttırdığı gösterildi. Kalıcı sinir hasarlarından olan omurilik zedelenmelerinde de eksozomlar kullanılmıştır. Sinir sisteminde akson yenilenmesi Schwann hücreleri (SC) tarafından desteklenir. Yeniden düzenlenen Schwann hücrelerinden alınan eksozomların akson rejenerasyonunu arttırdığı ve sinir yenilenmesini desteklediği gösterilmiştir. Lopez- Verrilli 'nin yaptığı eksozom çalışmasında omurilik rejenerasyonu deneyindeki sonuçlarda yaralanmalardan sonra 4 gün boyunca eksozom bulunan ortamda hücre kültürü yapılmış ve aksonal rejenerasyon eksozom desteğiyle daha hızlı yenilenme sağlanmıştır (46)

Kalp dokusu yenilenmesi alanında yapılan çalışmada kalp dokusundan alınan Kardiyosferler (CS'ler), kalp krizi geçiren 6 aylık erkek farelerde kalp krizinin sebep olduğu kalp doku ve damar hasarını azaltmıştır (38). Yanmış doku hasarı yenilenmesi için 2016 yılında

yapılan araştırmada ise kordon kök hücrelerinin kullanılmıştır. Yanık doku bağışıklık sisteminin aşırı tepki vermesine olur ve inflamasyon sitokinlerini olan TLR4, TNF- α ve interleukin-1 β salınımını arttırır. Rejenerasyon ile bağışıklık sistemi arasında negatif bir ilişki olduğu için kordon kök hücrelerden salınan eksozomların miR-181; TLR4, TNF- α ve interleukin-1 β üretimini baskıladığı gözlemlenmiştir. Doku yenilenmelerindeki sorunlardan biri de yara izi problemidir. Yara izi olmadan yenilenme karmaşık ve tıp dünyasında en çok uğraşılan konulardan biridir. İnsan amniyotik epitel hücrelerinden salınan eksozomlar kullanılarak yapılan deneyde farklı miktarlarda eksozom konsantrasyonlarının yara izlerine etkisi gözlemlenmiştir. Farelerde 4 farklı yara alanına farklı konsantrasyonlarda eksozom enjekte edilerek iyileşme takip edilmiştir. Maksimum değer olan 100 μ g/mL'nin yara izini tamamen geçirdiği sonuçlarda yayınlanmıştır (45). Buna göre eksozom miktarı arttığında daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Özetle, Eksozomlar salındıkları organa, yapıya ve hasara göre farklı içeriklerle sentezlenirler. Bulundurdukları miR çeşitleri farklıdır ve hücre içi bir yapı olması nedeni ile bağışıklık sistemini uyarır ve vücuda toksik etkisi yoktur. Farklı yollar kullanarak rejenerasyonu desteklerler bu yüzde pek çok organ ve yapıda eksozom rejenerasyonu kullanılabilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Deney Hayvanları: Projede 27 adet (3-4 aylık) erişkin erkek Wistar Albino sıçanları (220-270 g) kullanıldı. Sıçanlar, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminden temin edildi. Sıçanlardan 3 tanesi kemik iliği izolasyonu ve kemik iliği kök hücre kültürü yapılması amacıyla kafaya darbe (Anestezik maddelerin dokularda neden olabileceği fizyolojik değişiklikleri ekarte etmek amacıyla) ile sakrifiye edildi. Geriye kalan 24 sıçan aşağıdaki deney gruplarına göre ayrıldı;

- I. Grup 1 (n=6): Kontrol grubu oleik asidin çözücüsü alkol+salin solüsyonu 40µl %70 etil alkol+ 260µl salin çözeltisi kuyruktan i.v. injekte edilerek oluşturuldu.
- II. Grup 2 (n=6): Alkol+salin içinde çözüldürülmüş oleik asit, kuyruk veninden kısıtlayıcı aparat (restrainer) kullanılarak 60mg/kg dozunda uygulandı.
- III. Grup 3 (n=6): Oleik asit (60 mg/kg, i.v.) uygulamasından 2 saat sonra kemik iliği kök hücre (1×10^6 , 500 µl PBS içerisinde çözdürülerek) i.v. yoldan uygulandı.
- IV. Grup 4 (n=6): Oleik asit (60 mg/kg, i.v.) uygulamasından 2 saat sonra kemik iliği kök hücrelerden elde edilen eksozomlar (5-10 µg 500 µl PBS içerisinde çözdürülerek) yine i.v. yoldan uygulandı.

3.1. Sıçanlarda Oleik Asit ile ARDS Modelinin Oluşturulması

Akut akciğer hasarı, 60 mg/kg oleik asidin (cis-9-oktadekanoik asit) intravenöz uygulamasıyla modellendi. Oleik asit başlangıçta etanol içinde çözüldürülüp daha sonra salin ile 60 mg/ml nihai konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı (23).

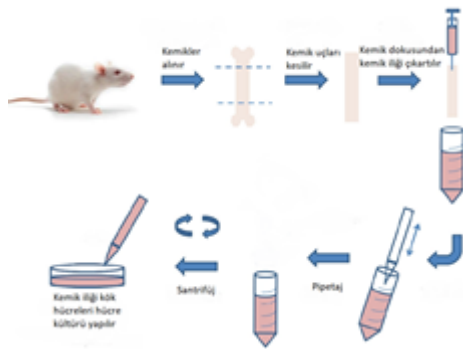
3.2. Kemik İliğinden Kök Hücre Eldesi

MKH üretimi için sakrifiye edilen sıçanların femur ve tibia kemikleri steril ortamda çıkarıldı. Kemik iliği elde edilmesi ve hücre kültüründe kullanılmak üzere %10 FBS (Fetal Sığır Serum) ile penisilin ve streptomisin (100 U/mL ve 0,1 mg/mL) içeren AlphaMEM (Modification of Eagles Medium-Alpha) besiyeri hazırlandı. Femur ve tibiaların uçları kesilerek bu uçlardan besiyeri enjeksiyonu ile kemik iliklerinin steril bir falkon tüpe toplanması sağlandı. Toplanan kemik iliği, ficoll kullanılarak 400 g hızda 30 dakika santrifüj edildi. Mononükleer

hücreler alındıktan sonra yıkamak amacıyla bir defa %2 FBS (fetal bovin serum) içeren PBS (phosphat buffer saline) ile süspansiyon edilerek 400 g hızda 10 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası süpernatant atılarak hücreler besiyeri ile süspansiyon edildi. Hücre sayım kamerasında (Thoma lamı) hücre sayımı ve Trypan blue ile canlılık testi yapıldı. Bu aşamadan sonra her bir T25 flask içerisinde 1 milyon / ml hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.

Mezenkimal kök hücreler yüzeye tutunurlar ve bu sayede hematopoetik kök hücreden ayrışırlar. Yapışmayan hücreler 48 saat sonra medyum ile atıldı (Şekil 2) (25).

Primer hücreler flask tabanının yaklaşık %80'nini kaplayıncaya kadar 72 saatte bir beslenerek 6-8 gün boyunca çoğalması beklendi ve pasaj 0 (P0) olarak tanımlandı. Bu aşamadan sonra P1'e ve yeterli çoğalma sonrası diğer pasajlara geçiş için %0.25 tripsin/EDTA kullanıldı. Çalışmada hem doğrudan hücre hem de ekzozom uygulamasına yetecek miktarda MKH elde etmek için P3'e kadar üretim yapıldı. Bu aşamadan sonra elde edilen P4 hücreler doğrudan hücre uygulanacak deney gruplarında kullanıldı (25).



Şekil 1. Kemik iliği kökenli MKH elde etme yöntemleri (8).

3.3. MKH Kültür Ortamından Total Ekzozom İzolasyonu

Sıçan kemik iliği kaynaklı MKH hücre kültürü ortamlarından ekzozom izolasyonu için, standart FBS ekzozom kontaminasyonuna yol açabileceğinden 3. pasajdan sonra hücre kültür ortamına exosome-depleted FBS eklendi (25). 4. pasaj sonunda yaklaşık 21. günde hücre ortamı hasat edildi ve elde edilen kök hücre kültürü ortamından Invitrogen Total Exosome Isolation kiti (4478359) ile total ekzozom izole edilecek ardından Miltenyi Biotech MACSPlex Exosome kit (130-122-209) kullanılarak flow sitometri ile ekzozom analizi yapıldı.

3.4. Eksozom İzolasyonu

Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların izolasyonu için öncelikle örnekler ön hazırlık aşamasından geçirildi. Eksozom izolasyonu için Invitrogen Total Exosome Isolation (from cell culture media) kit kullanıldı. Ön hazırlık aşamasında hücre kültüründen alınan ortam 2000xg'de 30 dakika santrifüj edilecek ve ardından süpernatant yeni tüpe aktarıldı ve yeni tüpe aktarılan süpernatantın 500 ul Total Eksozom izolasyon reaksiyon bufferı eklendi. Örnekler gece boyunca 2°C ile 8°C arasında inkübasyonda tutuldu. Örnekler 10000 g'de 1 saat boyunca 4°C arasında santrifüj edildi. Bu işlemin sonucunda süpernatant atılıp eksozom içeren pelet tutuldu ve peletin üzerine 100 ul PBS eklendi. Elde edilen eksozomlar 1 haftaya kadar 2°C ile 8°C'de saklandı.

3.5. Eksozom Analizi

İzole edilen eksozomlar 1.5 ml deney tüplerine aktarıldı. 120 µL tampon (boş kontrol) veya 120 µL önceden izole edilmiş eksozomlar PBS'de çözünmüş şekilde eklendi. MACSPlex Exosome Yakalama Boncukları en az 30 saniye vortekslenerek ve yeniden süspanse edilip her tüpe 15 µL aktarıldı. Tüpler gece boyunca ışıktan korunarak oda sıcaklığında bir gece boyunca orbital çalkalayıcı kullanarak 450 rpm'de inkübe edildi. Her tüpe 500 µL MACSPlex Buffer eklenerek ve oda sıcaklığında 3000 g/ 5 dk santrifüj edildi. Tüpte yaklaşık 135 µL bırakarak 500 µL süpernatant dikkatlice aspire edildi ardından, her tüpe toplamda 15 µL olacak şekilde MACSPlex Exosome Detection Reagent CD9, CD63, CD81 beadslerin karışımı eklendi. Tüpleri, sürekli çalıştırmada orbital çalkalayıcıda 450 rpmde üzerinde ışıktan koruyarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Her tüpe 500 µL MACSPlex Buffer eklenecek, oda sıcaklığında 3000 g/ 5 dk santrifüj yapıldı. Tüpte yaklaşık 150 µL bırakarak 500 µL süpernatant dikkatlice aspire edildi ve her tüpe 500 µL MACSPlex Buffer eklendi. Tüpler orbital çalkalayıcıda 450 rpmde üzerinde ışıktan korunarak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Oda sıcaklığında 3000g/ 5 dk santrifüj edildi ve tüpte yaklaşık 150 µL bırakılarak 500 µL süpernatant dikkatlice aspire edildi. Pipetajlama ile MACSPlex Exosome Yakalama Boncukları yeniden süspanse edildi. Aktarılan örnekler flow sitometride okunarak eksozom varlığı gösterildi (14).

3.6. Kan ve Doku Örneklerin Alınması

Oleik asit ile MKH veya MKH kaynaklı eksozomların uygulamasından 24 sonra sıçanlara ketamine/ksilazin uygulandı. Anestezi altında kardiyak kanları alınarak eksanguinasyon yöntemi ile sakrifikasyon gerçekleştirildi. Total oksidatif stres parametreleri için göğüs kafesi açılıp kalbin apeksinden kan örneği alındı. Hemen arkasından akciğerler süratle çıkartılıp histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehid solüsyonuna bırakıldı. (23).

3.7. Histolojik İnceleme

Işık Mikroskopik Doku Takibi: Doku takibi; %10'luk nötral formalin içinde tespit edilmiş dokunun dehidrasyon, şeffaflaştırma ve infiltrasyon işlemleriyle bloklamaya hazır duruma getirilmesi işlemlerini kapsar. Akciğer doku örnekleri nötral tamponlu formalin (%10'luk) solüsyonunda (Karan et al., 2006) tespit edildikten sonra, fiksasyonu tamamlanan dokuların "kapalı sistem doku takip cihazı" içine yerleştirilmesi sağlandı. Kapalı sistem otomatik doku takip cihazlarında doku takibi, cihazın reaksiyon haznesinde gerçekleşir. Doku kasetleri cihazın sepetine dizilerek bu hazneye yerleştirildi. Dokuların bu haznede sabit kalmasıyla, cihaza ait kimyasal saklama haznesinde bulunan 10-12 takip solüsyon kabı ve 3-4 parafin kabı ile sırasıyla ve önceden ayarlanan süreler içerisinde işlemler yapılması sağlandı. Cihazın işleyiş biçiminde, otomatik olarak kimyasal sıvıların reaksiyon haznesine transferi ile doku takibi gerçekleştirildi. Cihazdan çıkarılan parafine gömülü dokulardan kesit alınması için oda ısısında mikrotom yardımıyla, her bir bloktan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen+Eozin boyası ile rutin boyama işlemi yapıldı. Preparatlar, akciğer dokusunun morfolojik yapısının, hücrelerin intakt veya dejenere olması, bağ dokunun morfolojisi, inflamasyon bulguları gibi parametreler dikkate alınarak değerlendirildi. Akciğer hasarının derecesi, alveolar mezenkimaldaki ödem, alveollerdeki ödem, intra-alveolar hücre infiltrasyonu, alveolar kanama ve atelektazi puanlama sistemi kullanılarak, her parametre 0-3 arasında puanlandı. Patolojik skorlar, ilk araştırma gruplamasına kör olan bir araştırmacı tarafından Olympus BX53 ışık mikroskobu ve DP26 kamera sistemi ile fotoğraflandırılmıştır, NIS-Elements Documentation 4.5 görüntü analiz sistemi ile değerlendirilerek fotoğraflanmıştır.

Hematoksilen-Eozin Boyama: Parafin bloklardan lam üzerine 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Parafin kesitler 1 gün 37°C de etüvde bekletildi ve daha sonra 60°C de 3 saat etüvde bekletilen kesitler 45'er dakika olmak üzere iki değişim halinde oda sıcaklığında ksilolde bekletildi. Ardından %96'dan %70'e kadar azalan alkol serilerinden (%90, %80, %70) geçirilerek dehidrate olması sağlandı. Distile suda yıkandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen boya solüsyonu içerisinde bekletildi. Akarsuda 15 dakika yıkama işlemi yapıldıktan sonra suyu süzülüp 2 dakika boyunca eozin boya solüsyonu içerisinde bekletildi. 1'er dakika arayla ve

sırasıyla %70, %80, %90, %96 derişimlerde, artan derişimli etil alkol serilerinden geçirilip sonrasında 3 kez 20 dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıldı ve entellan ile kapatıldı.

Bu kesitlerin Hemotoksilen-Eosin (HE) ile boyanması yapıldıktan sonra ışık mikroskopunda 10X, 20X ve 40X büyütme ile incelendi (Olympus BX53). Tüm analizler, her örneğin çalışma grubu atamasını bilmeyen bir histolog tarafından yapıldı. Her gruptan rastgele toplam 6 preparat seçildi ve her preparattan tanımlayıcı gücü yüksek en az 10 alan seçilerek "Akciğer total hasar skoru" hesaplandı.

Akciğer dokusu hasar bulguları; 1- Alveolar hiperemi-konjesyon, 2- mononükleer/nötrofilik infiltrasyon, 3-perivasküler-interstisyel ödem ve 4-sellüler hiperplazi (alveolar duvar kalınlaşması) parametrelerini içeren "Total hasar skoru" hesaplanmasıyla değerlendirildi. Patolojik bulgular literatürden uyarlanarak 0; normal, 1;hafif, 2;orta, 3;şiddetli olmak üzere 4 aşamada derecelendirildi (23).

3.8. Total TAS/TOS Düzeylerinin Ölçümü

Eksozom ve kök hücre enjeksiyonundan sonraki 24. saatte serumdaki TOS, Erel metodu kullanılarak tespit edildi. TAS, numunelerin antioksidan kapasitesine dayanan bir kolorimetrik tahlil kullanılarak ABTS tarafından tespit edildi. Kromojenik ajan olarak ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit) (Spesifik enzimlerin reaksiyon kinetiğini gözlemlemek için kullanılan kimyasal bileşik) kullanıldı (23).

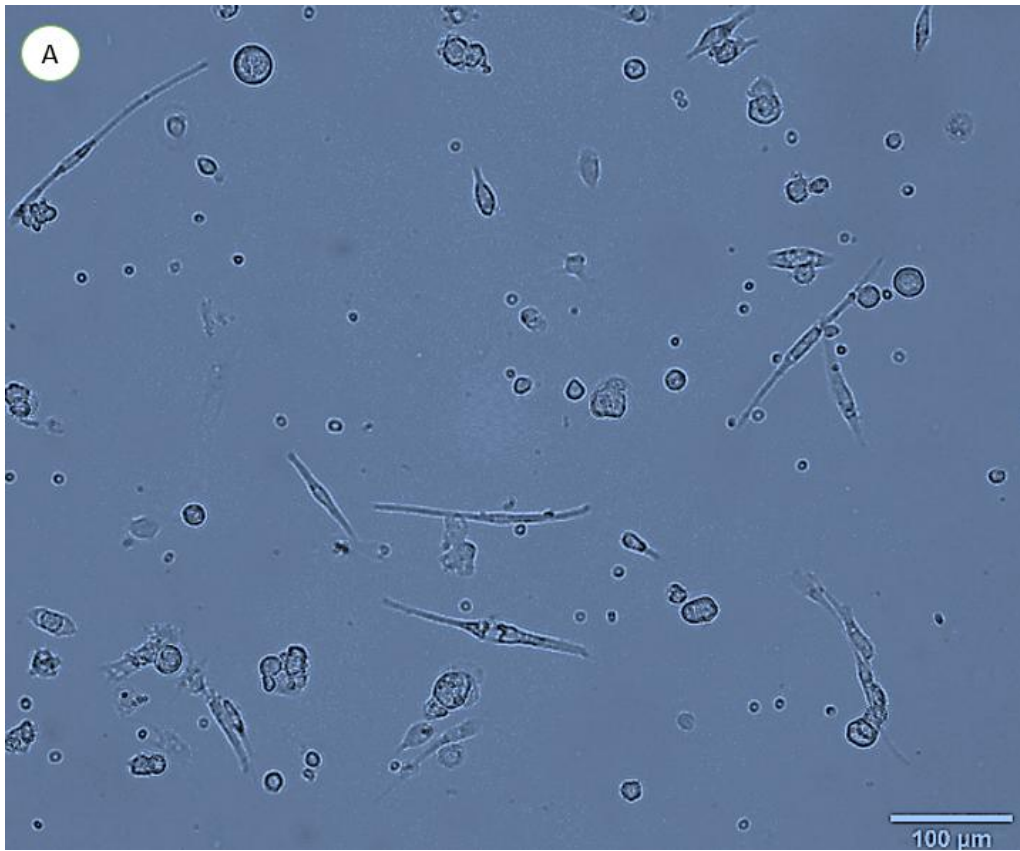
3.9. İstatistiksel Analiz

Veriler, ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme için uygun istatistiksel yöntemler (ANOVA ve Sidak çoklu karşılaştırma testi) kullanıldı. P <0,05 olan veriler anlamlı kabul edildi (23).

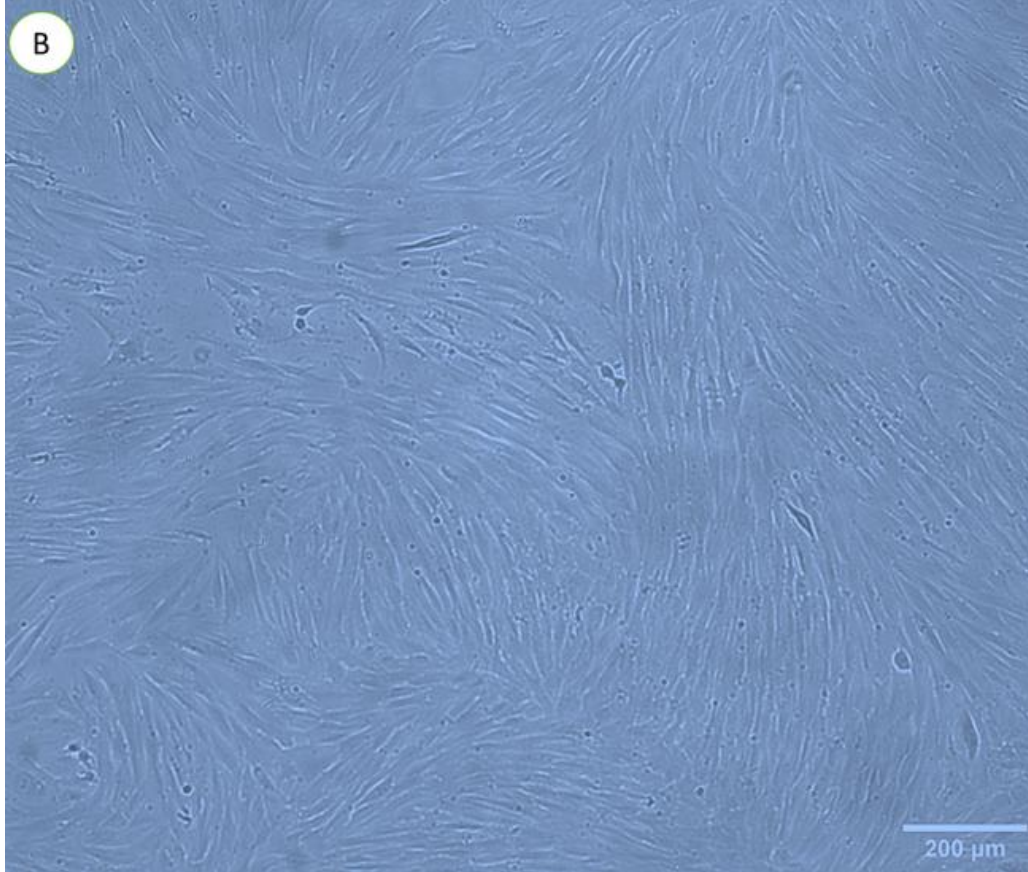
4. BULGULAR

4.1. Kök Hücre Eldesi ve Karakterizasyonu

Sıçanlarının femoral ve tibial kemiklerinden elde edilen hücre kokteyli 25'lik kültür kaplarına (flask) ekildikten sonra ilk 48 saat içinde yüzeye yapışan hücreler mikroskobik olarak görüntülendi. Bu süre sonunda yapışmayan hücreler ve izolasyondan sonra ortamda bulunan hücre kalıntıları uzaklaştırıldı. Şekil 1A'da gösterildiği gibi kemik iliği kök hücreleri dışında hematopoetik kök hücreler, kan hücreleri ve diğer birtakım hücrelerle hücre kalıntı ve artıkları görülmektedir. Kültür kabında tutunan kemik iliği kaynaklı stromal hücreler mezenkimal kök hücre kolonilerini oluşturarak proliferasyon olmuştur.



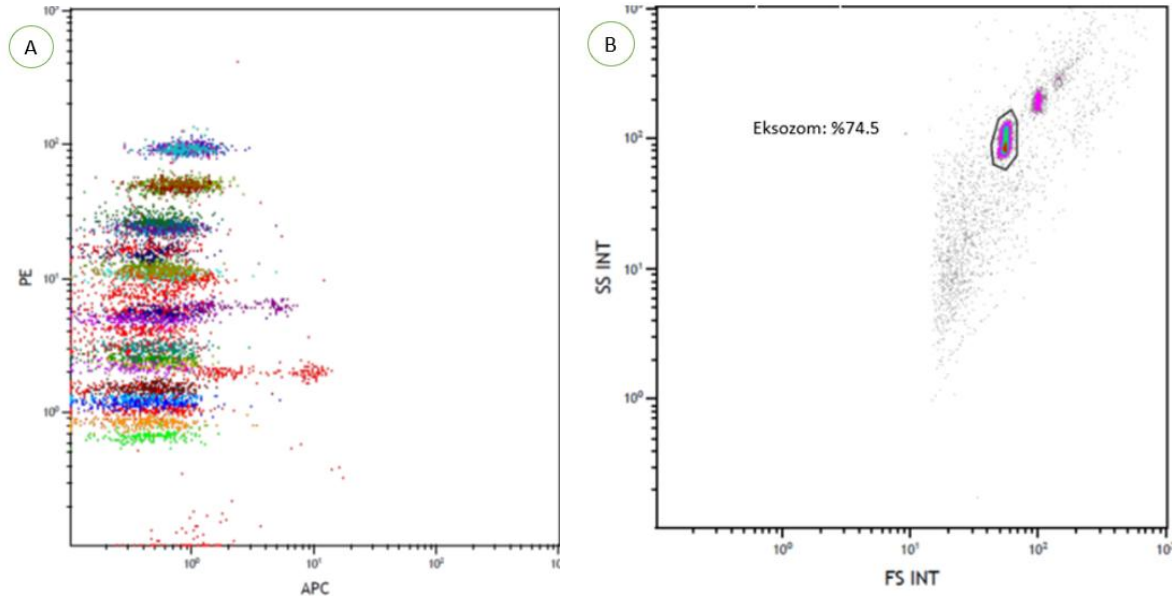
Yüzeye yapışan mezenkimal kök hücreler % 80 konfluensiye ulaştınca yeniden pasajlanarak en son 3. pasaja kadar ulaşıldı ve şekil 1B’de görüldüğü gibi tüm yüzeyi kaplamış kemik iliği mezenkimal kök hücreleri elde edildi.



Şekil 2: Kemik iliği kök hücrelerin ışık mikroskop görüntüleri. 2A’da kemik iliği kök hücre 1. pasajın başında görüntülenmiştir. Şekil 2B ise kemik iliği kök hücre %80’nin üzerinde konfluent olmuş 3. pasaj görüntüsüdür.

4.2 Eksozom Eldesi ve Karakterizasyonu

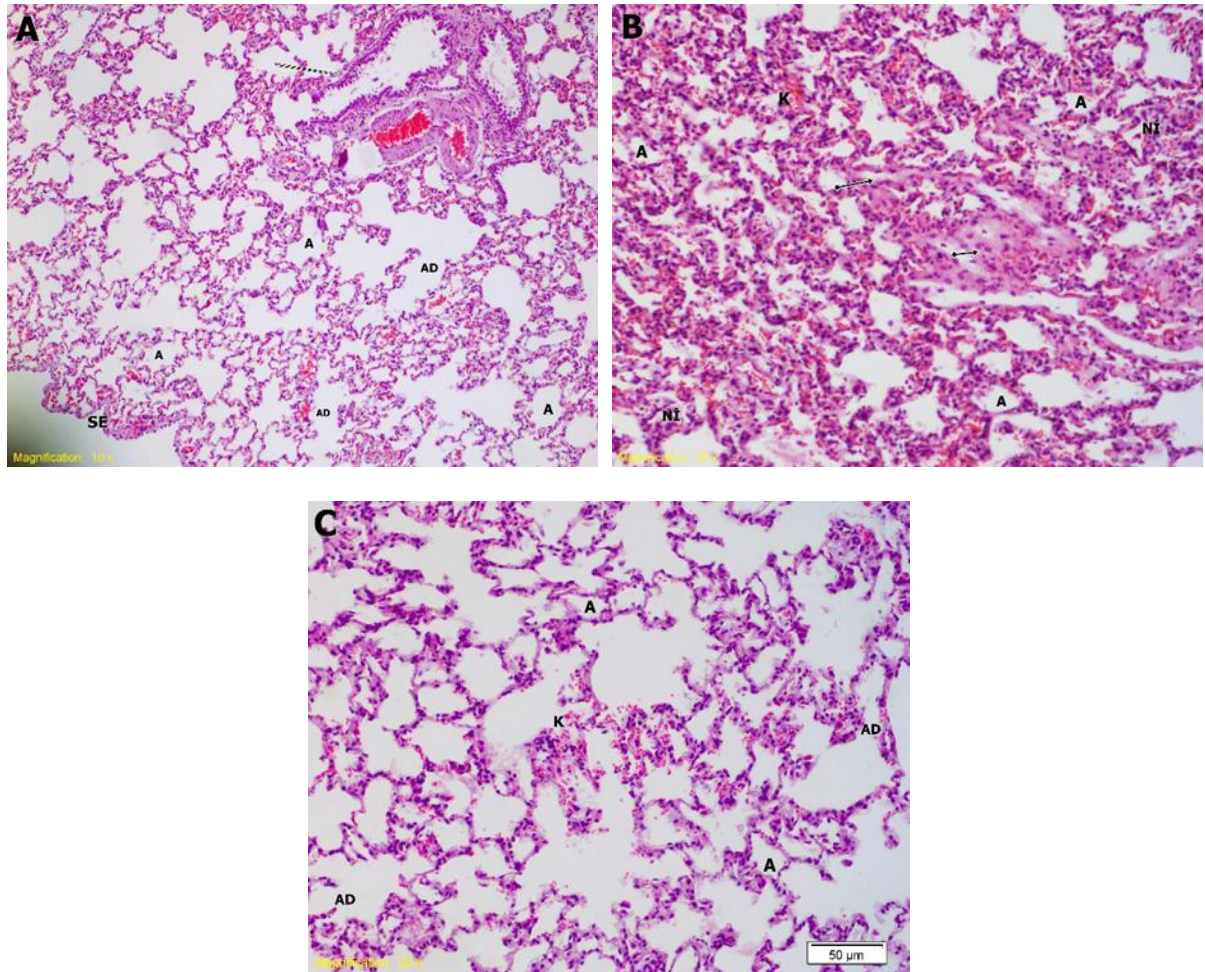
Şekil 1’de sıçanlarının femoral ve tibial kemiklerinden elde edilen kök hücreler Şekil 1B’deki 3. pasaj halinde iken eksozom depleted FBS ile hücre kültürü yapıldı ve eksozom izolasyon kiti ile izole edildi. Şekil 2A’de gösterildiği şekilde eksozom izolasyon kitinde CD 9, CD 63 ve CD 81 belirteçleri ile işaretlenen eksozomlar 10^1 APC alanında sinyal vermiştir. APC 10^0 alanı negatif kontrol olarak kabul edildi. Daha önce yayımlanan kemik iliği kök hücrelerden salıverilen eksozom makalelerinde western blot analizleri ile de kanıtlandığı gibi KİKH-eksozomlar CD 9 ve CD 63 yüzey markerleri bulunmaktadır. Bu yüzden PE / APC grafiğinde gösterilen 2 eksozom alanı CD 9 ve CD 63 yüzey markerlarına aittir (12, 39).



Şekil 3: Kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların flow sitometri analizleri. A) Eksozomlar pozitif ve negatif sinyal alanlarına göre gruplandırılmıştır. B) Eksozomların toplam hücreler arasındaki alanı göstermektedir.

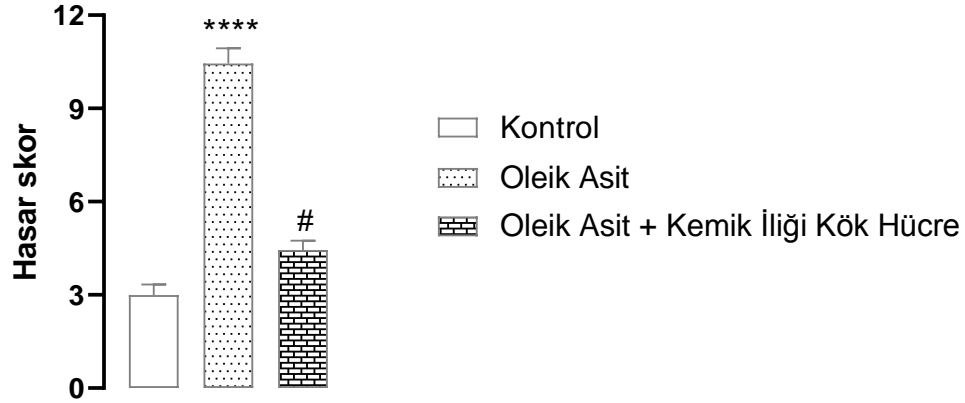
4.3 Akut Akciğer Hasarında Hasar Skorlaması

Sıçanlara kuyruk veninden uygulanan 60 mg/kg dozunda uygulanan oleik asit, şekil 3'te gösterildiği gibi belirgin akciğer harabiyeti oluşturmuştur. Histopatolojik analiz yapıldığında oleik asit akciğer parankim dokusunda belirgin kanama, infiltrasyon, ödem ve hiperplazi meydana getirmiştir. Histopatolojik görüntünün skorlandırılmasına göre, oleik asit grubunda kontrole göre 3 kat daha yoğun hasar parametreleri elde edilmiştir. Akut akciğer hasarından 2 saat sonra kuyruk veninden verilen 1×10^6 sayısında kemik iliği kök hücreler, oleik asit uygulamasıyla meydana gelen kanama, infiltrasyon, ödem ve hiperplazi parametrelerinde dramatik iyileşme sağlamıştır.



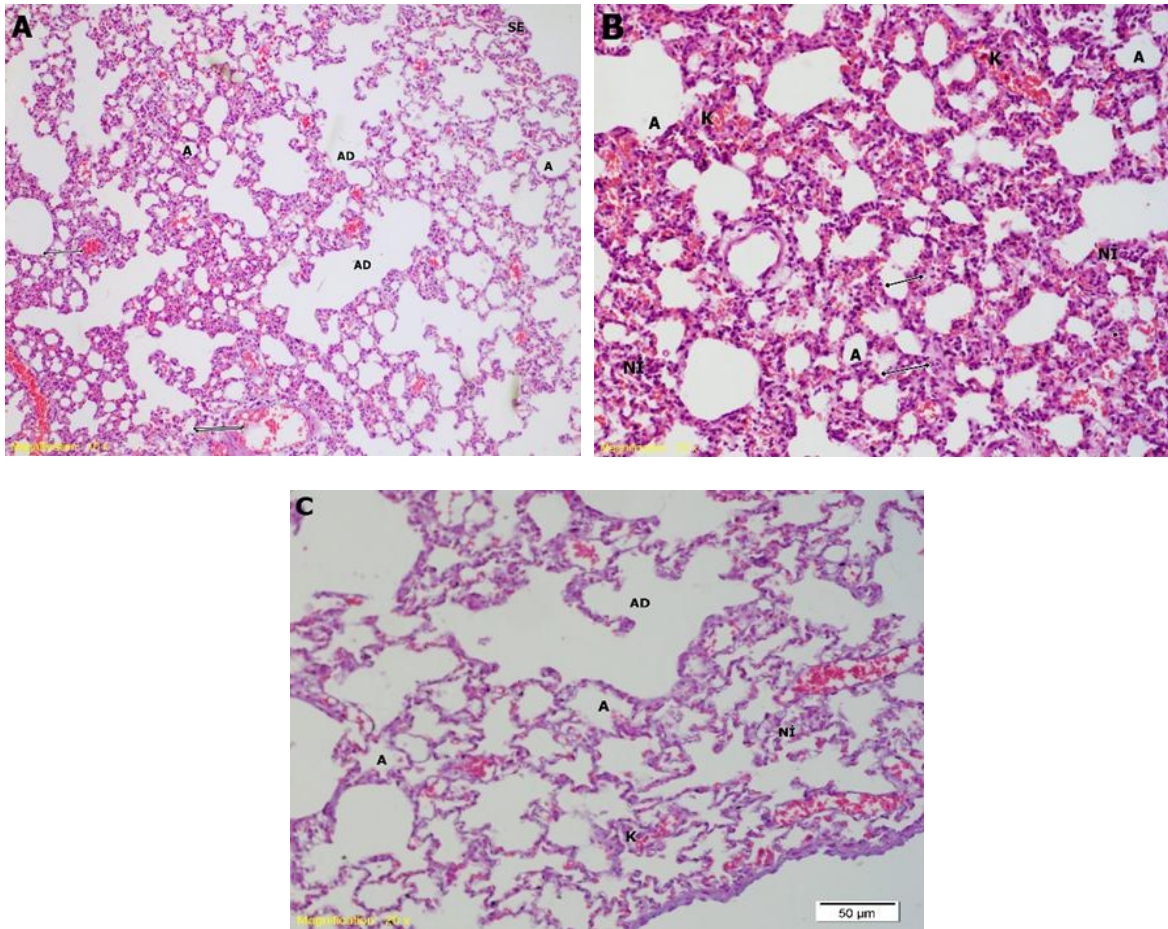
Şekil 4: Oleik asite maruz kalan akciğer dokusunda kemik iliği kaynaklı MKH uygulanması ile oluşan "Total hasar skoru" değerlerinde histomorfolojik düzelleme bulguları. A-Kontrol grubu (10x), B-Oleik Asit grubu (20x) ve C-OA+Kemik iliği kök hücre (20x). Hemotoksilen-Eozin ile boyandı. A: alveol; AD: Alveolar Duktus; K: Kanama; Düz çizgi: Terminal bronşiyol; Çift yönlü ok: Ödem; Nİ: Nötrofil infiltrasyonu

Akciğer Hasarı ve Kemik İliği Kök Hücre



Şekil 5: Kemik iliği kök hücrelerin oleik asit ile oluşturulmuş akut akciğer hasarında terapötik etkisi. 1.000.000 sayıda uygulanan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin sıçanlarda oleik asit (60 mg/kg, i.v.) ile indüklenen akut akciğer hasarında belirgin bir şekilde iyileşme sağladığı görülmüştür. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi istatistik değerlendirmesinde oleik asit hasarı kontrol grubuna göre (****) ve kemik iliği kök hücre grubu oleik asit grubu hasarına göre (#) anlamlı bulunmuştur. **** ve # $p < 0.0001$ değerini göstermektedir.

Bir başka deney serisinde oleik asit ile indüklenene akciğer harabiyetinde bu sefer kemik iliği mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların terapötik etkisi test edilmiştir. Oleik asit uygulamasını takiben 2 saat sonra verilen 1 milyon hücreden elde edilen eksozomlar, oleik asit ile oluşturulan harabiyeti (kanama, ödem, infiltrasyon ve hiperplazi parametreleri açısından) aynı mezenkimal kök hücreler gibi tersine çevirmiştir (Şekil 7). İlginç olarak kemik iliği mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlar, kemik iliği mezenkimal kök hücrelere göre oleik asit harabiyetine karşı daha az iyileştirici etki oluşturmuştur (Şekil 6).

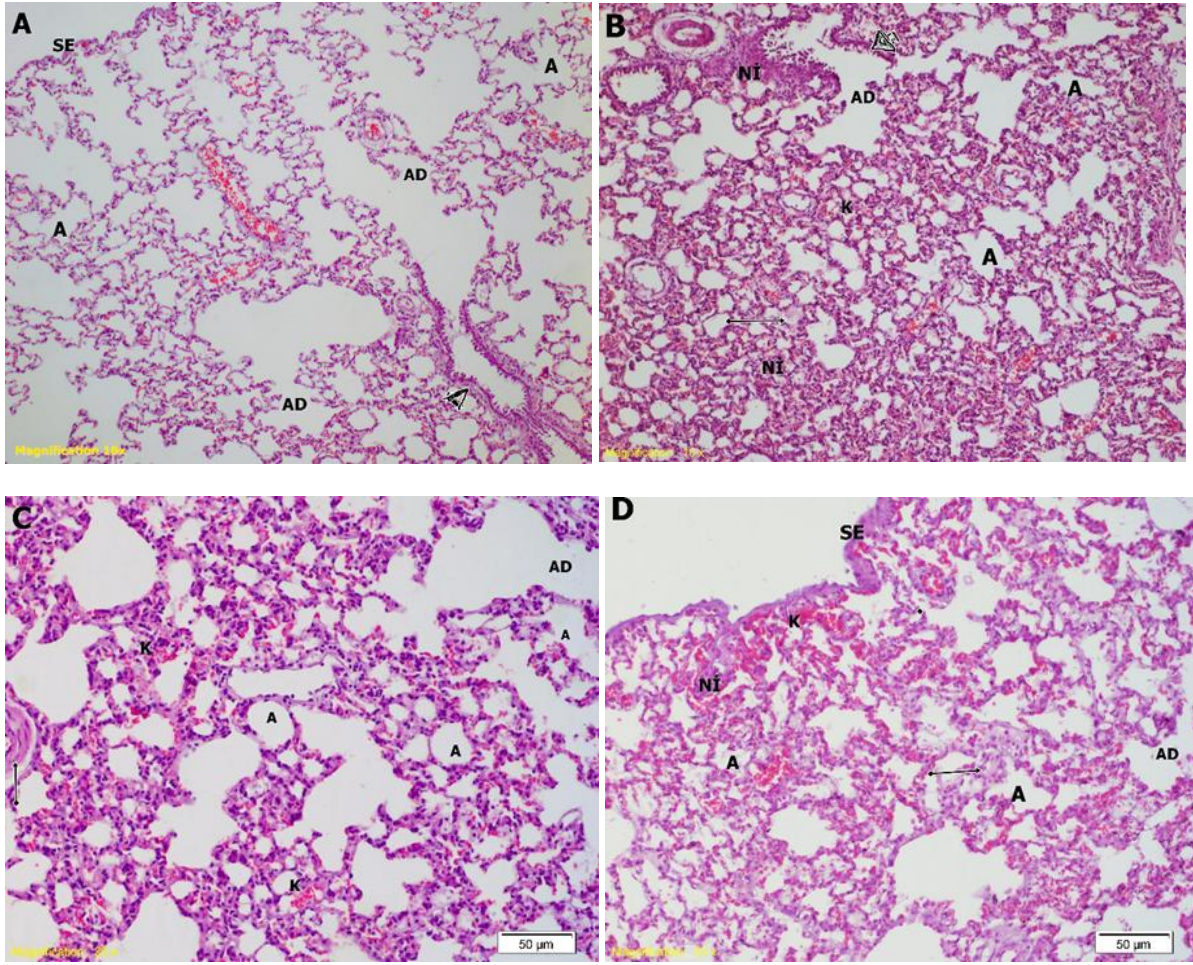


Şekil 6: Oleik aside maruz kalan akciğer dokusunda kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozom uygulanması ile oluşan "Total hasar skoru" değerlerinde histomorfolojik düzelme bulguları. A- Kontrol grubu (10x), B-Oleik Asit grubu (20x) ve C-OA+Kemik iliği kaynaklı eksozom (20x). Hemotoksilen-Eozin. A: alveol; AD: Alveolar Duktus; K: Kanama; Düz çizgi: Terminal bronşiyol; Çift yönlü ok: Ödem; Nİ: Nötrofil infiltrasyonu

Akciğer Hasarı ve Kemik İliği Kök Hücre Eksozom

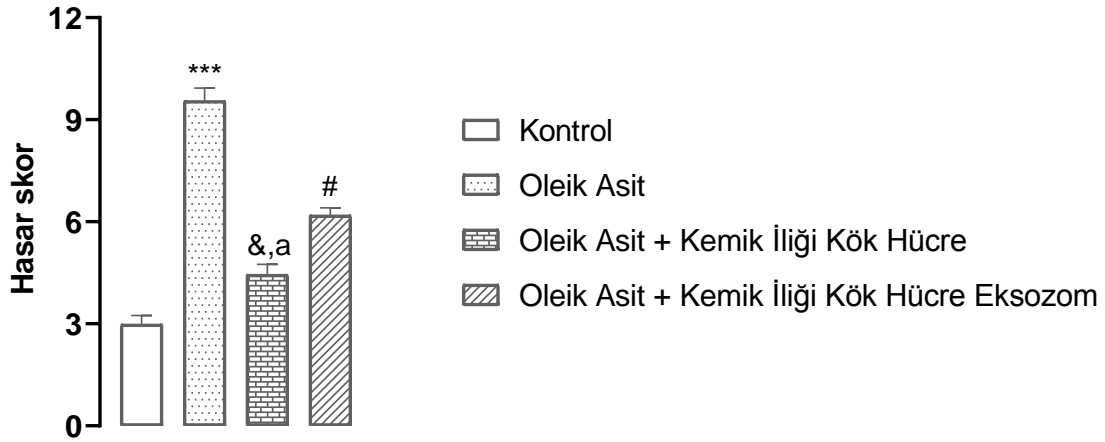


Şekil 7: Kemik iliği kök hücrelerin oleik asit ile oluşturulmuş akut akciğer hasarında terapötik etkisi. 1×10^6 sayıda kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların sıçanlarda oleik asit ile oluşturulan akut akciğer hasarında belirgin bir şekilde iyileşme sağladığı görülmüştür. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi istatistik değerlendirmesinde oleik asit hasarı kontrol grubuna göre (****) ve kemik iliği kök hücre eksozom grubu oleik asit grubu hasarına göre (***) anlamlı bulunmuştur. ****, $p < 0.0001$ değerini göstermektedir. ***, $p = 0.0001$ sonucunu göstermektedir.



Şekil 8: Oleik aside maruz kalan akciğer dokusunda Kemik iliği mezenkimal kök hücre ve kemik iliği kök hücre kaynaklı ekzozom uygulanması ile oluşan "Total hasar skoru" değerlerinde histomorfolojik düzelme bulgularının karşılaştırılması. A-Kontrol grubu (10x), B-Oleik Asit grubu (20x) ve C-OA+Kemik iliği kök hücre(20x) ve D- OA+Kemik iliği kök hücre kaynaklı ekzozom(20x) . Hemotoksilen-Eozin. A: alveol; AD: Alveolar Duktus; K: Kanama; Düz çizgi: Terminal bronşiyol; Çift yönlü ok: Ödem; Nİ: Nötrofil infiltrasyonu, Okbaşı: Terminal bronşiyol.

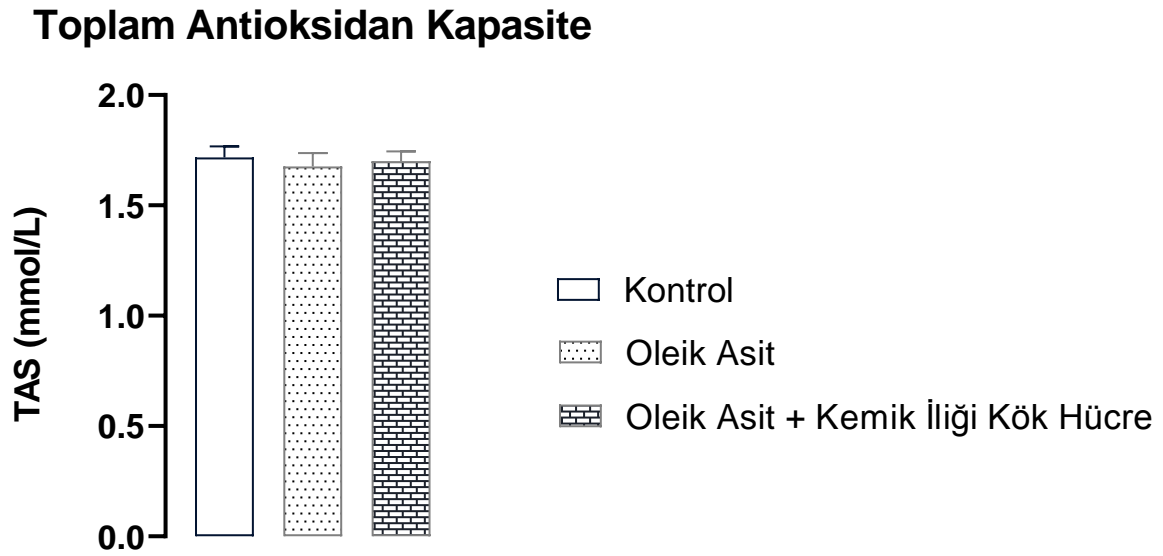
Akciğer Hasarı Kemik İliği Kök Hücre ve Eksozom



Şekil 9: Kemik iliği kök hücrelerin ve kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların oleik asit ile oluşturulmuş akut akciğer hasarında terapötik etkisi. 1.000.000 sayıda uygulanan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin ve yine aynı sayıda kemik iliği kök hücreden elde edilen eksozomların sıçanlarda oleik asit ile indüklenen akut akciğer hasarında belirgin bir şekilde iyileşme sağladığı görülmüştür. Veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için ANOVA ve post-hoc test için Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi istatistik değerlendirmesinde oleik asit hasarı kontrol grubuna göre (***), kemik iliği kök hücre grubu oleik asit grubuna göre (&), kemik iliği kök hücre eksozom grubu oleik asit grubu hasarına göre (#), ve kemik iliği kök hücre grubu KİKH-eksozom grubuna göre (a) anlamlı bulunmuştur. ***, &, #, $p < 0.0001$. a, $p < 0.05$ sonucunu göstermektedir.

4.4 Oleik Asit ve Kemik İliği Kök Hücre Uygulaması Sonrasında Serum TAS Bulguları

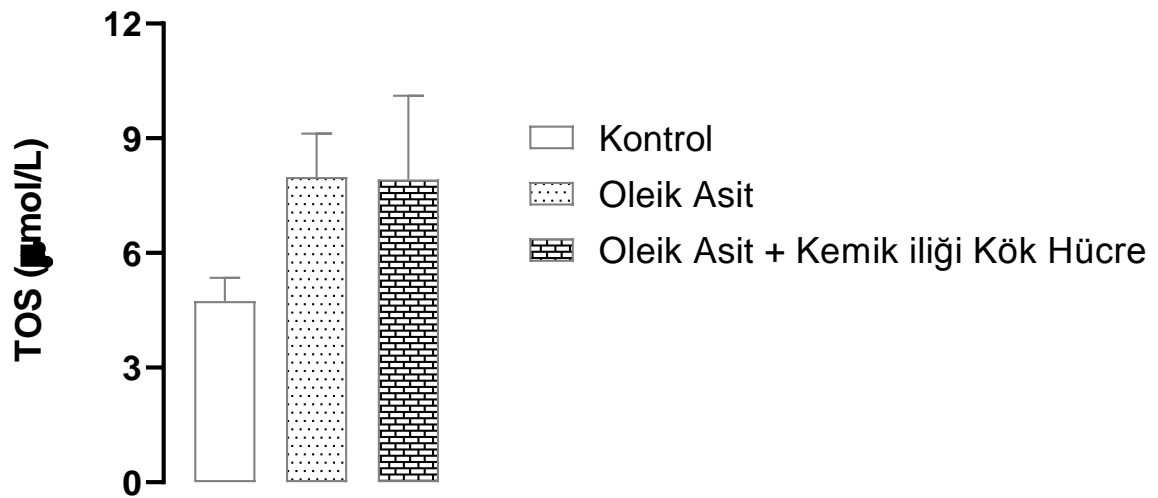
Sıçanlara kuyruk veinden uygulanan oleik asit (60 mg/kg) ve arkasından uygulanan 1×10^6 sayıda kemik iliği kök hücre serum total antioksidan kapasiteyi değiştirmede (şekil 7).



şekil 10: Sıçanlarda oleik asit ve sonrasında kemik iliği kök hücre uygulamasının serum antioksidan kapasite üzerine etkisi. İntravenöz yoldan uygulanan oleik asit ve 2 saat sonra uygulanan kemik iliği kök hücreler ile serum total antioksidan kapasitede herhangi bir değişiklik bulunmadı. İstatistiksel analiz için ANOVA ve post-hoc test için Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

4.5 Oleik Asit ve Kemik İliği Kök Hücre Uygulaması Sonrasında Serum TOS Bulguları

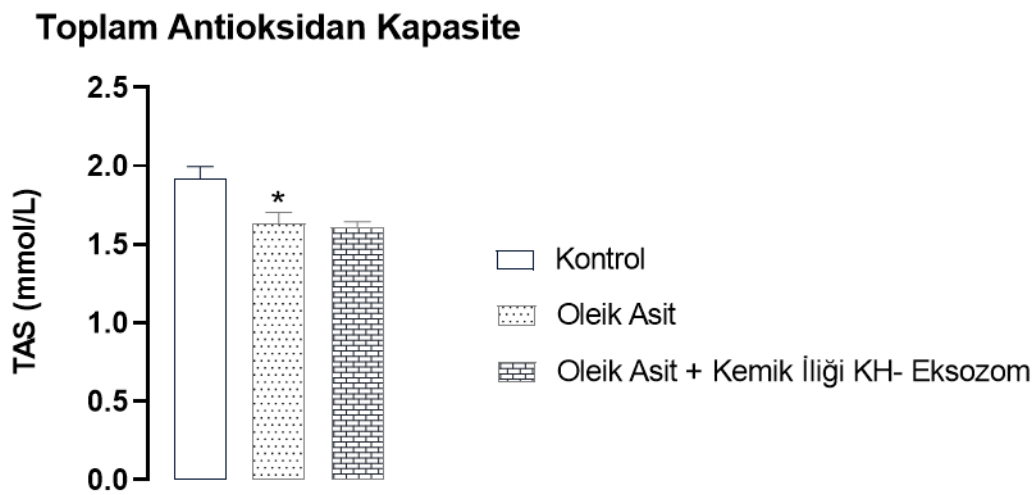
Sıçanlara kuyruk veninden uygulanan oleik asit (60 mg/kg) ve arkasından uygulanan 1×10^6 sayıda kemik iliği kök hücre serum total oksidan stres parametresini değiştirmedir (şekil 8).



şekil 11: Sıçanlarda oleik asit ve sonrasında kemik iliği kök hücre uygulamasının serum antioksidan kapasite üzerine etkisi. İntravenöz yoldan uygulanan oleik asit ve 2 saat sonra uygulanan kemik iliği kök hücreler ile serum total oksidan stres parametresinde herhangi bir değişiklik bulunmadır. İstatistiksel analiz için ANOVA ve post-hoc test için Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

4.6 Kemik İliği Kök Hücrelerden Salınan Eksozom Uygulamasında TAS Sonuçları

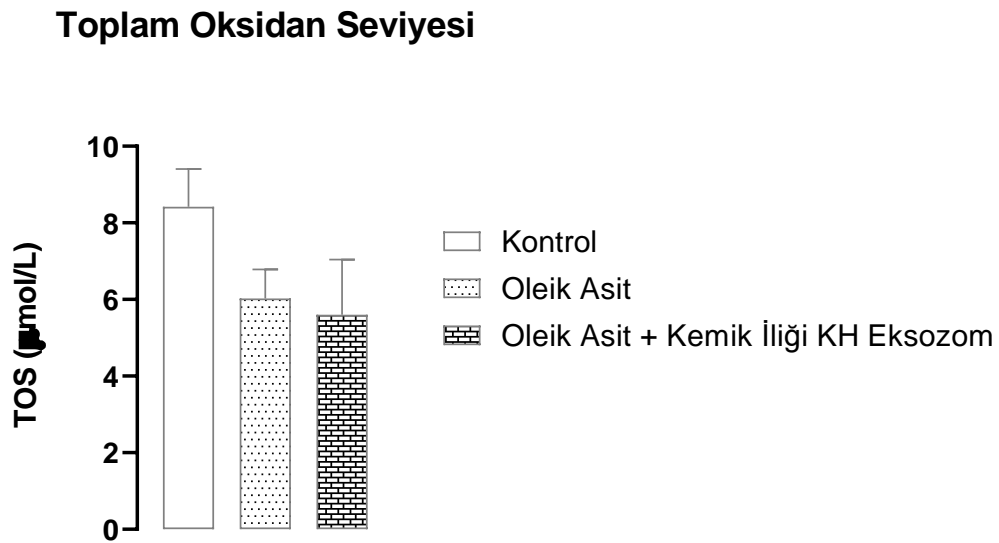
Sıçanlarda oleik asit (60 mg/kg) ile indüklenmiş akut akciğer hasarında 1×10^6 sayıda kemik iliği mezenkimal kök hücrelerden salınan eksozom uygulamasıyla serum toplam antioksidan kapasite düzeyleri değerlendirildi. Oleik asit toplam antioksidan kapasiteyi beklendiği gibi süprese ederken eksozom uygulaması bu süpresyonu tersine çevirmemiştir (Şekil 9).



Şekil 12: Kemik iliği kök hücre kökenli eksozomların sıçanlarda total antioksidan kapasiteye etkisi. Oleik asit kontrol grubuna kıyasla, toplam antioksidan kapasiteyi düşürmüştür. Buna karşılık, kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomlar oleik asit ile süprese edilen antioksidan kapasitede herhangi bir iyileşme yapmamıştır. İstatistiksel analiz için ANOVA ve post-hoc test için Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi uygulandı. *: $P < 0.05$.

4.7 Kemik İliği Kök Hücrelerden Salınan Eksozom Uygulamasında TOS Sonuçları

Sıçanlara kuyruk veninden uygulanan oleik asit (60 mg/kg) ve arkasından uygulanan 1×10^6 sayıda kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomlar serum total oksidan stres parametresini değiştirmedir (şekil 10).



şekil 13: Sıçanlarda oleik asit ve sonrasında kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozom uygulamasının serum antioksidan kapasite üzerine etkisi. İntravenöz yoldan uygulanan oleik asit ve 2 saat sonra uygulanan kemik iliği kök hücreler ile serum total oksidan stres parametresinde herhangi bir değişiklik bulunmadı. İstatistiksel analiz için ANOVA ve post-hoc test için Dunn-Sidak çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu yüksek lisans tezinde amacımız sıçanlarda oleik asit ile oluşturulan akut akciğer hasarı modelinde, kemik iliği kaynaklı kök hücre ve hücrelerin kültüründen elde edilen eksozomların akciğer dokusunda oluşturduğu olası rejeneratif etkisini test etmektir. Bu amaçla, Wistar sıçanlarında oleik asit ile indüklenen akciğer harabiyeti geliştikten sonra kemik iliği mezenkimal kök hücre ve bu hücrelerden izole edilen eksozomların terapötik etkisi gerek akciğer dokusunda histopatolojik olarak gerekse serumdaki oksidan/antioksidan kapasiteler kolorimetrik olarak değerlendirildi.

Akut akciğer hasarı, tedavisi zor ve ölüm oranı yaklaşık %45 ile seyreden önemli bir klinik tablodur. Mortaliteyi yüksek kılan etmenlerden biri de aslında pek çok hastalığın akut akciğer hasarına sebep olabilmesi ve dolaylı olarak ilerlemiş formu olan Akut Solunum Sıkıntısı Sendromuna (ARDS'ye) zemin hazırlamasıdır. Akut akciğer hasarında gözlemlenen tipik semptomlardan bazıları hasar nedeniyle alveol-kılcal damar bütünlüğünün bozulması, alveol-kılcal damar geçirgenliğinin artması, nötrofil yoğunluğunun artması ve inflamasyon belirteçlerinin artması olarak sayılabilir. Akciğerde interstiyumda sıvı artışı gözlemlenir ve bu sıvı alveol boşluklarını doldurur.

Yapılan literatür taramalarında akut akciğer hasarı ve buna bağlı olarak gelişen ARDS modellemeleri yapmak amacıyla farklı farmakolojik/toksikolojik ajanların kullanıldığını görmekteyiz. Bu amaçla en sık kullanılan maddelerden biri de oleik asittir. Ayrıca bir bakteriyel fragman olarak LPS de kullanılmaktadır. Bu ajanların model olarak kullanıldığı çalışmalarda kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif etkileri somut olarak gösterilmiştir (9, 10, 16) ancak bu etkiye kök hücrenin kendisi mi yoksa onun en önemli rejeneratif komponenti olarak ileri sürülen eksozomların mı katkı yaptığı net olarak ortaya konulmamıştır. Dolayısıyla bu tez projesinde kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin oleik asitle oluşturulan ARDS modelinde tedavi edici etkisine eksozom fraksiyonunun katkı yapıp yapmadığını değerlendirdik. Bu açıdan tez konusu özgün durmaktadır.

Öncelikle Wistar sıçanlarının femoral ve tibial kemikleri steril ortamda izole edildikten sonra bu kemiklerin her iki başı kesilip kemik boşluklarından kemik iliği kök hücreler alınıp DMEM kültüründe 48 saat boyunca beklenilerek kemik iliği kök hücrelerin petri kabına tutunması sağlandı. Kemik iliği kök hücrelerden eksozom izolasyonu ve tanımlanması aşamasında ise hücre kültüründe son pasajda "exosome-depleted" FPS kullanılarak kontaminasyonun oluşması engellenmeye çalışıldı. Rejeneratif amaçla uygulamada deney hayvanı başına 1×10^6 kök hücre olacak şekilde verildi. Eksozom deney serilerde ise her bir sıçana 1×10^6 kemik iliği kök hücreden izole edilen eksozomlar uygulandı.

Eksozomların tanımlanması için eksozom izolasyon kiti kullanıldı. Şekil 2A'da flow sitometri ile eksozomlar tanımlanmıştır. Eksozomların toplam moleküller içerisindeki alanı işaretlenmiş olup şekil 2B'de görüldüğü gibi 10^0 APC alanı negatif kontrol bölgesidir. CD belirteçleri ile belirlenmiş eksozomlar 10^1 APC alanında gösterilmiştir. Eksozom izolasyon kitinde CD 9, CD 63 ve CD 81 belirteçleri kullanıldı. Kemik iliği kök hücrelerden saliverilen

eksozomları tanımlamak için genellikle CD 9 ve CD 63 yüzey markerleri kullanılmaktadır. Yüksek lisans tezimde bu iki belirteci kemik iliği mezenkimal kök hücre eksozomlarını tanımlamak için kullandım. PE / APC grafiğinde gösterilen 2 eksozom alanı CD 9 ve CD 63 yüzey markırlarına aittir (45).

Oleik asit ile indüklenmiş akciğer hasar modeli literatürde sıklıkla kullanılan bir model olup oluşturduğu hasar doz ve uygulama süresiyle doğru orantılıdır (1). Köksel, O. Ve Ark. (2005) yılında yapmış olduğu çalışmada oleik asit ile oluşturulan ARDS modelinde Rho-kinaz enziminin katkı yaptığı ve bu enzim inhibitörlerinin söz konusu harabiyeti hem histopatolojik olarak hem de biyokimyasal olarak belirgin bir şekilde önlediği gösterilmiştir. Ayrıca oleik asit (100 mg/kg) aracılı akciğer hasarında Rho-kinaz enziminin her iki izoformunun (ROCK-1 ve ROCK-2) da dramatik bir şekilde up-regüle olduğu Westren blot analizi ile net bir şekilde ortaya konmuştur (20). Bu çalışmada oleik asit dozunu 60 mg/kg'a çektim zira daha önceki çalışmaların çoğunda test edilen maddelerin büyük bir kısmı profilaktik olarak yani oleik asitten önce uygulanmıştır. Ancak yüksek lisans tez çalışmamda oleik asit uygulamasından sonra kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ve ondan izole edilen eksozom fraksiyonlarını tedavi edici olarak uyguladım. Dolayısıyla olası tedavi edici etkiyi net olarak ortaya koyabilmek için oleik asit dozunu hasar oluşturan en düşük doz olarak belirledim. Sonuç olarak oleik asit bu dozlarda sıçanların akciğer parankim dokusunda belirgin kanama, infiltrasyon, ödem ve hiperplazi meydana getirdi.

Bu model üzerinde test ettiğim kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (1×10^6 sayıda), yukarıda belirtilen bu dört parametrede de belirgin bir düzelme yapmıştır. Daha önceki çalışmalarda da benzer bulgular elde edilmiştir. Örneğin; inflamatuvar ve katastrofik sitokinler olan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerinin kemik iliği mezenkimal kök hücre uygulamasıyla belirgin olarak azalırken, antiinflamatuvar faktörler olan IL-4 ve IL-10 değerlerinin tam tersine arttığı gösterilmiştir (14, 24, 26, 38, 42). Ayrıca, LPS ile indüklenmiş ARDS çalışmasında ise sıçanlara i.v. yoldan aynı bu tezdeki gibi 1×10^6 sayıda verilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin apoptoz ile ilgili parametreleri (p-GSK-3 β ve Bax) de azalttığı gösterilmiştir (14).

Diğer taraftan insan kök hücre çalışmalarında da umut verici bulgular elde edilmiştir. Örneğin, bir faz 1 çalışmasında ARDS hastalarına farklı dozlarda uygulanan kemik iliği kök hücrelerinin doz (sayı) bağımlı olarak gerek solunum parametrelerini ve çoklu organ yetmezliklerini ve gerekse de ölüm oranlarını belirgin olarak düşürdüğü saptanmıştır. Kullanılan en düşük sayıda (1×10^6) bile önemli bir terapötik etki yapmıştır ancak en belirgin iyileşme en yüksek doz olan 1×10^7 'da görülmüştür (41). İlerleyici supranükleer felçten mustarip hastalara yapılan bir faz 1 deneyinde ise kemik iliği mezenkimal kök hücreler hastalığın ilerlemesini azalttı. Parkinson hastalığında klinik olarak uygulanan kemik iliği kök hücreler dopaminerjik nöronların bozulmasına bağlı olarak gelişen motor nöron aktivitesinin kötüleşmesini engelledi. Bunun yanında kemik iliği kök hücreler faz 2 çalışmasında siroz hastalarına uygulanarak, sirozda doku fibrozunu inhibe ettiğini ve karaciğer fonksiyonunu iyileştirdiğini gösterdi. Sonuç olarak literatürde daha önce gösterildiği ve bu çalışmadaki bulguların da doğrulandığı gibi oleik asit ile indüklenen akut akciğer harabiyetinde kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin terapötik fayda sağladığı somut olarak ortaya konulmuştur.

Diğer çalışmalarda bu terapötik etkiye kök hücrenin hangi fraksiyonunun (örneğin eksozom veya diğer mikro veziküllerin) aracılık ettiği belirsiz kalmıştır. Bu çalışmada özellikle eksozom etkisinin ortaya çıkarılmasına yönelik farklı olarak 1×10^6 sayıda kemik iliği

mezenkimal kök hücrelerden ultra santrifügasyon ile izole edilen eksozom fraksiyonunu oleik asit verilisinden 2 saat sonra eş zamanlı ayrı ancak aynı yolla uygulandı. Sonuç olarak kök hücrenin kendisinde olduğu gibi eksozom fraksiyonunun da oleik asit ile oluşturulan harabiyeti (kanama, ödem, infiltrasyon ve hiperplazi parametreleri açısından) restore ettiği eksozom katkısı bağımsız belirlenmiştir. Bulgularımız, Benzer şekilde, kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomların rejenerasyona katkı sağladığı başka çalışmalarla uyum göstermektedir. (37). Bu çalışmada olası mekanizmalar için miR-384-5p yükselmesi ve hücrel glikolizin inhibisyonu üzerinden birtakım proteinlerin ekspresyonu seviyesinin artışı ilgili tutulmuştur (37).

Ayrıca kükürtlü hardal kullanımı ile oluşturulan ARDS modelinde kemik iliği kök hücre eksozomların akciğer ödemi düzelttiği gösterilmiştir (39). Başka bir akciğer hasar modelinde (akciğer epitel hücre bariyer modeli) KİKH-eksozomlarının (10, 20, 40 µg), rejenerasyonu arttırdığı bildirilmiştir ve bu etkiye aracılık eden mekanizmanın, G proteinleri ile kenetli reseptör sınıf 5A (GPRC5A)-Yes ile ilişkili protein (YAP) aksı üzerinden hücrel yıkımın durdurulması olarak ileri sürülmüştür (40). Buna ek olarak farklı miR çeşitlerinin (miR-125, miR-133, miR-181 vb.) kemik iliği kök hücre kaynaklı eksozomlarda bulunduğu ve bu miRNA'ların rejenerasyona katkı sağladığı önerilmiştir. Örneğin, miR-181'in inflamatuvar TLR4, TNF-α ve interleukin-1β üretimini baskıladığı, miR-125'in ise anjiyogenez reaksiyonlarını tetiklediğini, buna karşılık miRNA-133b'nin de nöronlarda gelişmeyi tetikleyerek nöronların dallanma sayısının ve akson uzunluğunun arttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak eksozomların terapötik etkisine onların içinde bulunan mikro RNA'ların katkı yapacağı ileri sürülmüştür (44). Ancak başka mekanizmalarında olası rollerin ihtimal dışı olup olmadığının belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada kemik iliği kök hücre ile bu hücre kaynaklı eksozomların rejeneratif etkisi karşılaştırıldığında tek başına kök hücre uygulamasının eksozom uygulamasına göre akciğer hasarını daha fazla düzelttiğini gözlemledim. Bu bulgunun olası açıklaması şu şekilde yapılabilir: 1. Kök hücrenin eksozom fraksiyonuna göre daha fazla sayıda ve çeşitlilikte protein ve diğer molekülleri (sitokin, RNA, DNA gibi büyük moleküllerin yanı sıra mRNA, siRNA, miRNA gibi mikro molekülleri) içermesi, 2. Kök hücrelerin inflamasyon bölgesindeki diğer hücreler (örneğin progenitör, kök hücre vd hücrelerle) ile etkileşmesi (bir takım sinyal molekülleri ile) ve 3. Düşük bir ihtimal olsa da, uygulanan kök hücrenin hasar bölgesinde transdiferansiyasyon olarak rejeneratif etki sağlaması ve son olarak 4. Yukarıdaki mekanizmalardan eğer farklı ise uygulanan kök hücrenin antiinflamatuvar etki oluşturması.

Bu çalışmada histopatolojik incelemenin yanı sıra değerlendirdiğimiz bir başka parametre de serum oksidatif stres düzeyleri ile total antioksidan kapasite olmuştur. Ancak bu parametreler teknik olarak çok sağlıklı elde edilemedi; şöyle ki, daha önceki yayınlımızda (23) ve başka çalışmalarda oleik asidin kendisi serum oksidatif stres belirteçlerini belirgin olarak yükseltip antioksidan kapasiteyi azaltırken bizim bu çalışmamızda böyle tutarlı veriler elde edilmedi. Buna neden olarak hemen hemen tüm gruplarda görülen hemoliz sorunu olabilir. Söz konusu parametreler teknik olarak kolorimetrik olduğu için hemolizli serum ile etkileşme olasılığı yüksektir. Oleik asit grubunda hemolizli kanın elde edilmesi aslında oleik asidin sadece akciğer epitelinde değil de diğer bazı hücrelerde ve bu arada kanda bulunan eritrositlerde de harabiyet yaptığını gösterebilir. Sonuç olarak total antioksidan kapasite ile oksidatif stres biyobelirteçlerinin yeniden ya da başka metotlarla ölçülmesinde fayda vardır.

Bu tez çalışmasının kısıtlılıkları konusuna gelince, histopatolojik parametre ile serum oksidatif stres ve total antioksidan kapasite dışında, ileride ayrıca Western blot, qPCR veya RT-PCR, yöntemleri ile MPO, MDA, nitrit/nitrat, 3-nitrotirozin, peroksinitrit vs gibi parametrelerinde değerlendirilmesi önerilmektedir. Bundan başka, konuya katkı sağlayacağını düşünülen diğer deneysel parametreler arasından inflamatuvar yolaklarla (örneğin TNF- α , IL-4, 6, 8, 10 gibi interlökinler, Wnt/ β -katenin), apoptotik sinyal yolları (sitokrom c, kaspazlar, Bcl-2 ve Bax vs gibi) ve diğer ilişkili sinyal mekanizmalara ait parametrelerle bulunmaktadır. Son olarak eksozom içeriklerinin belirlenmesi ve tedavi edici etkiye hangi madde/lerin aracılık ettiği konusu ileride yapılması önerilmektedir. Böylelikle eksozomun ve kök hücrenin hangi komponenti/lerinin rejeneratif etkiye katkı sağladığı konusu netleştirilebilecektir.

Sonuç olarak, sıçanlarda oleik asit ile indüklenen akut akciğer harabiyetinde sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücre ile ondan izole edilen eksozom fraksiyonu rejeneratif etki yapmaktadır. Bu bulgular, akut akciğer harabiyetinde kemik iliği mezenkimal kök hücre uygulamasının terapötik fayda sağlayabileceği konusundaki daha önceki bilimsel çalışmalardan elde edilen bulgulara katkı sağlamaktadır. Bu yüksek lisans tezinde, mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomların rejenerasyona katkı sağladığı gösterilmiştir, ancak eksozomların rejeneratif kapasitenin kök hücrenin bir bütün halinde uygulamasına göre daha zayıf olduğu görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Beilman, G. (1995). Pathogenesis of oleic acid-induced lung injury in the rat: distribution of oleic acid during injury and early endothelial cell changes. *Lipids*, 30(9), 817-823.
2. Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., ... & Spragg, R. (1994). The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 149(3), 818-824.
3. Brooke, G., Cook, M., Blair, C., Han, R., Heazlewood, C., Jones, B., ... & Atkinson, K. (2007). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 18, No. 6, pp. 846-858). Academic Press.
4. Choi, S. G., Won, S. R., & Rhee, H. I. (2010). Oleic acid and inhibition of glucosyltransferase. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 1375-1383). Academic Press.
5. Collino, F., Pomatto, M., Bruno, S., Lindoso, R. S., Tapparo, M., Sicheng, W., ... & Camussi, G. (2017). Exosome and microvesicle-enriched fractions isolated from mesenchymal stem cells by gradient separation showed different molecular signatures and functions on renal tubular epithelial cells. *Stem cell reviews and reports*, 13(2), 226-243.
6. Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255-289
7. Debnath, T., & Chelluri, L. K. (2019). Standardization and quality assessment for clinical grade mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Hematology, transfusion and cell therapy*, 41, 7-16.
8. Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, 20(1), 5-14.
9. Gibson, P. G., Qin, L., & Puah, S. H. (2020). COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. *Medical Journal of Australia*, 213(2), 54-56.
10. Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Silva, A. R., Burth, P., Castro-Faria, M. V., & Castro-Faria-Neto, H. C. (2015). Acute respiratory distress syndrome: role of oleic acid-triggered lung injury and inflammation. *Mediators of inflammation*.
11. Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Silva, A. R., Burth, P., Castro-Faria, M. V., & Castro-Faria-Neto, H. C. (2015). Acute respiratory distress syndrome: role of oleic acid-triggered lung injury and inflammation. *Mediators of inflammation*, 2015.
12. Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Silva, A. R., Burth, P., de Moraes, I. M. M., Oliveira, F. M. D. J., Younes-Ibrahim, M., ... & Castro Faria, M. V. D. (2012). Oleic acid induces lung injury in mice through activation of the ERK pathway. *Mediators of Inflammation*, 2012.
13. Guo SX, Jin YY, Fang Q, et al. (2015) Beneficial effects of hydrogen-rich saline on early burn-wound progression in rats. *PLoS ONE*;10:e0124897
14. Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. H. (2019). Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, 8(4), 307.
15. Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 97(2), 329-339.

16. He, X., Li, C., Yin, H., Tan, X., Yi, J., Tian, S., ... & Liu, J. (2022). Mesenchymal stem cells inhibited the apoptosis of alveolar epithelial cells caused by ARDS through CXCL12/CXCR4 axis. *Bioengineered*, 13(4), 9060-9070.
17. Hong, S. H., Yang, S. J., Kim, T. M., Shim, J. S., Lee, H. S., Lee, G. Y., ... & Oh, I. H. (2014). Molecular integration of HoxB4 and STAT3 for self-renewal of hematopoietic stem cells: a model of molecular convergence for stemness. *Stem Cells*, 32(5), 1313-1322.
18. Ibrahim, A. G. E., Cheng, K., & Marbán, E. (2014). Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem cell reports*, 2(5), 606-619.
19. Inoue, H., Nakagawa, Y., Ikemura, M., Usugi, E., & Nata, M. (2012). Molecular-biological analysis of acute lung injury (ALI) induced by heat exposure and/or intravenous administration of oleic acid. *Legal medicine*, 14(6), 304-308
20. Jing, H., He, X., & Zheng, J. (2018). Exosomes and regenerative medicine: state of the art and perspectives. *Translational Research*, 196, 1-16.
21. Jung, Y. J., Park, Y. Y., Huh, J. W., & Hong, S. B. (2019). The effect of human adipose-derived stem cells on lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in mice. *Annals of translational medicine*, 7(22).
22. Kikuchi Y, Tateda K, Fuse ET et al (2009) Hyperoxia exaggerates bacterial dissemination and lethality in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Pulm Pharmacol Ther* 22:333–339.
23. Köksel, O., Yıldırım, Ç., Tiftik, R. N., Kubat, H., Tamer, L., Cinel, L., ... & Büyükaşar, K. (2005). Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induced lung injury and its restoration by Y-27632. *European journal of pharmacology*, 510(1-2), 135-142.
24. Liang X, Zhang L, Wang S, Han Q, Zhao RC. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J Cell Sci* 2016;129:2182–9.
25. Liu, J., Chen, T., Lei, P., Tang, X., & Huang, P. (2019). Exosomes released by bone marrow mesenchymal stem cells attenuate lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion via the TLR4/NF-κB pathway. *International journal of medical sciences*, 16(9), 1238.
26. Liu, X., Gao, C., Wang, Y., Niu, L., Jiang, S., & Pan, S. (2021). BMSC-derived exosomes ameliorate LPS-induced acute lung injury by miR-384-5p-controlled alveolar macrophage autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
27. Lopez-Verrilli MA, Picou F, Court FA. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia* 2013;61:1795–806.
28. Luyt C-E, Hékimian G, Koulenti D, & Chastre J. (2018) Microbial cause of ICU-acquired pneumonia: hospital-acquired pneumonia versus ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Crit Care* 24:332–338.
29. Mao, G. C., Gong, C. C., Wang, Z., Sun, M. X., Pei, Z. P., Meng, W. Q., ... & Xiao, K. (2021). BMSC-derived exosomes ameliorate sulfur mustard-induced acute lung injury by regulating the GPRC5A–YAP axis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(12), 2082-2093.
30. Matute-Bello, G., Frevert, C. W., & Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(3), L379-L399.
31. Mizuta, Y., Akahoshi, T., Guo, J., Zhang, S., Narahara, S., Kawano, T., ... & Yamaura, K. (2020). Exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate histone-induced acute lung injury by activating the PI3K/Akt pathway in endothelial cells. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 1-12.
32. Özyurt, Y., Erkal, H., Demirhan, R., & Arıkan, Z. (2002). Akut respiratuar distres sendromu (ARDS). *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg*, 10(2), 126-130.
33. Peterson, K. M., Franchi, F., Olthoff, M., Paulmurugan, R., & Rodriguez-Porcel, M. (2021). Cardio Phenotypic Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Current Protocols*, 1(3), e62.
34. Quintel, M., Pelosi, P., Caironi, P., Meinhardt, J. P., Luecke, T., Herrmann, P., ... & Gattinoni, L. (2004). An increase of abdominal pressure increases pulmonary edema in oleic acid-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 169(4), 534-541.
35. Rodríguez-González, R., Ramos-Nuez, Á., Martín-Barrasa, J. L., López-Aguilar, J., Baluja, A., Álvarez, J., ... & Villar, J. (2015). Endotoxin-induced lung alveolar cell injury causes brain cell damage. *Experimental Biology and Medicine*, 240(1), 135-142.

36. Sato, E., Yamamoto, H., Honda, T., Koyama, S., Kubo, K., & Sediguchi, M. (1996). Acute respiratory distress syndrome due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sepsis in hyper-IgE syndrome. *European Respiratory Journal*, 9(2), 386-388.
37. Su, X., Yang, L., Yin, Y., Huang, J., Qiao, F., Fang, Y., ... & Wang, J. (2018). Bone marrow mesenchymal stem cells tune the differentiation of myeloid-derived suppressor cells in bleomycin-induced lung injury. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-13.
38. Tang JM, et al. VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovasc Res*. 2011;91(3):402–11.
39. Toh, W. S., Lai, R. C., Hui, J. H. P., & Lim, S. K. (2017, July). MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: implications for osteoarthritis treatment. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 67, pp. 56-64). Academic Press.
40. Troncoso R, et al. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(3):128–37.
41. Wilson, J. G., Liu, K. D., Zhuo, H., Caballero, L., McMillan, M., Fang, X., ... & Matthay, M. A. (2015). Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(1), 24-32
42. Wu, Y., Li, J., Yuan, R., Deng, Z., & Wu, X. (2021). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviate hyperoxia-induced lung injury via the manipulation of microRNA-425. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 697, 108712.
43. Xin, H., Li, Y., Buller, B., Katakowski, M., Zhang, Y., Wang, X., ... & Chopp, M. (2012). Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem cells*, 30(7), 1556-1564.
44. Zhang, X., Wei, X., Deng, Y., Yuan, X., Shi, J., Huang, W., ... & Xiang, A. P. (2022). Mesenchymal stromal cells alleviate acute respiratory distress syndrome through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 307.
45. Zhang, Y., Chopp, M., Liu, X. S., Katakowski, M., Wang, X., Tian, X., ... & Zhang, Z. G. (2017). Exosomes derived from mesenchymal stromal cells promote axonal growth of cortical neurons. *Molecular neurobiology*, 54, 2659-2673.
46. Zhao, B., Zhang, Y., Han, S., Zhang, W., Zhou, Q., Guan, H., ... & Hu, D. (2017). Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *Journal of molecular histology*, 48(2), 121-132.

EKLER



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI



| Karar Tarihi | Toplantı Sayısı | Karar Sayısı |
|--------------|-----------------|--------------|
| 13.07.2021 | 27 | 2021/212 |

Karar 212- Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Anabilim Dalı Başkanlığından gelen 07.07.2021 tarih ve 1692639 sayılı yazısı üzerinde görüşüldü.

Prof.Dr.Kansu BÜYÜKAFŞAR'ın danışmanlığında hazırlanan Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Anabilim Dalı 1904260171002 numaralı yüksek lisans öğrencisi Elif ÖNSÖZ'ün "Sıçanlarda Oleik Asit ile Oluşturulan Akciğer Hasarında Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Olası Rejeneratif Etkisi" konulu tez önerisinin "Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin 30/1. maddesi uyarınca kabul edilmesine, durumu danışmanına ve adı geçen öğrenciye bilgi vermek üzere Anabilim Dalı Başkanlığına bildirilmesine oy birliğiyle karar verildi.

(İmza)
Doç.Dr. Seda TEZCAN ÜLGER
(Başkan V.)

(İzinli)
Prof.Dr. Bahar TAŞDELEN
(Üye)

(İmza)
Doç.Dr. Gülay ALTUN UĞRAŞ
(Üye)

(İmza)
Prof.Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
(Üye)

(İmza)
Prof.Dr. Meral GÜN
(Üye)

(İmza)
Doç.Dr. Özlem İZCİ AY
(Üye)

ASLI GİBİDİR





T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Sayı : 52602694-050.01.04 -E-173 8484

25/08/2021

Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Sorumluluğunuzda yapılması tasarlanan "Sıçanlarda Oleik Asit ile Oluşturulan Akciğer Hasarında Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Olası Rejeneratif Etkisi" adlı araştırmaya ilişkin 23/08/2021 tarihli ve 2021/33 sayılı Kurul Kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Ali İYICI
Kurul Başkanı

EK- Kurulun 23/08/2021 tarihli ve 2021/33 sayılı kararı (1 sayfa)

Adres : MEÜ Çiftlikköy Kampüsü 33110 Yenişehir / MERSİN Ayrıntılı bilgi için irtibat: Ayla

DURDU

Tel : 0324 361 00 01/14417

Fax :

e-posta : hadyek@mersin.edu.tr Elektronik Ağ : www.mersin.edu.tr

MEÜ.İD.FR-001/04

Sayfa 1/1

Yayın Tarihi : 12 / 11 / 2015

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

| Karar Tarihi | Toplantı Sayısı | Karar Sayısı |
|--------------|-----------------|--------------|
| 23/08/2021 | 11 | 33 |

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Sıçanlarda Oleik Asit ile Oluşturulan Akciğer Hasarında Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Olası Rejeneratif Etkisi" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 14/07/2021 tarihinde sunulan Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ile ilgili belgeler ve araştırmada deney hayvanları üzerinde yapılacak tüm işlemler gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Başkan
Prof. Dr. Ali NAYCI

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Üye

Prof. Dr. S. Necmi İLMAZ
Üye

Doç. Dr. Gülhan TEMEL
Üye

(Katılmadı)
Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA
Üye

(Katılmadı)
Dr. Öğr. Üyesi Nail Can ÖZTÜRK
Üye

Dr. Vet. Hek. Famer YENER
Üye

(Katılmadı)
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Erdem DÖNMEZ
Üye

Avukat Lale DAĞLI
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Elif ÖNSÖZ

Doğum Tarihi : 13/02/1995

E-mail : eliffonsoz@gmail.com

Öğrenim Durumu

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite | Yıl |
|---------------|---|-----------------------------------|------|
| Lisans | Moleküler Biyoloji ve Genetik | İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü | 2019 |
| Yüksek Lisans | Cellular and Molecular Biology/Neurobiology | Universita degli studio di Torino | 2022 |

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayınız)

| Görevi | Kurum | Yıl |
|---------------------|---|-----------|
| Araştırma Asistanı | National University of Ireland, Galway | 2022 |
| Erasmus Öğrenim | National University of Ireland, Galway | 2022 |
| Staj | Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University | 2019 |
| Zorunlu Staj | Mersin Üniversitesi | 2018 |
| Araştırma öğrencisi | İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü | 2017-2018 |

YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

- 1.
- 2.
- 3.