**T.C.**
**BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# SÜTTE BULUNAN EKSOZOMLARIN NANO-LC SİSTEMİNDE ANALİZİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ZEYNEP GÜNYEL**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**
**Doç. Dr. Cemil AYDOĞAN**

**BİNGÖL-2023**

# ÖNSÖZ

Bu uzun ve zorlu sürecin her aşamasında, yardımları esirgemeyen ve bilgi birikimi ile çalışamama öncülük eden saygı değer danışmanım Doç. Dr. Cemil AYDOĞAN'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen her zaman varlığını ve desteğini hissettiğim sevgili eşim Çağdaş Günyel'e teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Dr. Öğr. Üyesi Hakiye Aslan'a teşekkür ederim.

Yüksek lisansımın ders döneminde bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarıma teşekkür ederim.

**Zeynep GÜNYEL**

**Bingöl 2023**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... i
İÇİNDEKİLER ..... ii
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... iv
TABLOLAR LİSTESİ ..... ix
ÖZET ..... x
ABSTRACT ..... x
1. GİRİŞ ..... 1
1.1. Sıvı Kromotografisi (LC) ..... 1
1.2. Nano-LC ..... 4
1.3. Nano-LC Kolon Türleri ..... 7
1.3.1. Partikül Dolgulu Kolonlar ..... 10
1.3.2. Açık Tubüler Kolonlar ..... 10
1.3.3. Monolitik Kolonlar ..... 11
1.4. Eksozomlar ..... 16
1.4.1 Gıdalarda Eksozomlar ..... 19
1.4.2. Süt Eksozomları ..... 20
1.5. Eksozomların İzolasyon Yöntemleri ..... 23
1.5.1. Ultrasantrifüjleme Tekniği (UC) ..... 24
1.5.2. Ultrafiltrasyon ..... 25
1.5.3. Boyut Dışlama Kromotografisi (SEC) ..... 26
2. KAYNAK ÖZETLERİ ..... 27
3. MATERYAL VE YÖNTEM ..... 29
3.1. Alet ve Ekipmanlar ..... 29
3.2. Sarf Malzemeler ..... 30
3.3. Deneysel Yöntem ..... 30
3.3.1. Kolon Silanizasyonu ..... 30
3.3.2. Grafen Oksit Sentezi ..... 32
3.3.3. Poli(BMA-EDMA-MGONPs) Monolitik Kolon Sentezi ..... 33

3.3.4. Süt Numunelerinin Temin Edilmesi ..... 35
3.3.5. Eksozom İzolasyonu ..... 36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA ..... 40
4.1. MGONP'lerin Karakterizasyonu ..... 40
4.2. Poli(BMA-EDMA-MGONP) Monolitik Kolon Karakterizasyonu ..... 40
4.3. Kromatografik Karakterizasyonlar ..... 46
4.4. Eksozom Ekstraksiyon ve Karakterizasyon Çalışmaları ..... 46
4.4.1. Eksozomların NTA Analizi ..... 47
4.4.2. Eksozomların SEM Analizi ..... 48
4.4.3. FT-IR Analizi ..... 49
4.4.4. Gradient nano-LC ile poli(BMA-EDMA-MGONP) Monolitik Kolonu Kullanılarak Süt Numunesinden Eksozomların İzolasyonu ve Analizi ..... 50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 53
KAYNAKLAR ..... 55

# SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN : Asetonitril
BMA : Butilmetakrilat
DDS : İlaç Dağıtım Sistemleri
EDMA : Etilendimetakrilat
EV : Hücredışı Veziküller
ESI-MS : Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi
FT-IR : Fourier dönüşümü infrared spektroskopisi
G : Gram
GO : Grafen Oksit
HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografisi
HPMA-Cl : 3-kloro-2-hidroksipropilmetakrilat
HFSNP : Füme silika nanopatikülleri
HCl : Hidroklorik asit
HRMS : Yüksek çöznürlüklü kütle spektroskopisi
I.D : İç çap
ILV : İntralümenal veziküller
ISEV : Uluslararası EV'ler Derneği
Kg : Kilogram
LOQ : Miktar tayin limiti
LOD : Tanımlama tayin limiti
L : Litre
MVB : Multiveziküler Cisimler
MeOH : Metanol
ML : Mililitre
MFGM : Süt yağı globül zarı
MGONP : Metakrilol grafen oksit nanopartikül
Mm : Milimolar
Mg : Miligram

μL : Mikrolitre
NaOH : Sodyum Hidroksit
Nm : Nanometre
N : Teorik tabaka sayısı
NaCI : Sodyum klorür
Ppm : Milyonda
PS-DVB : Polistiren divinilbenze
RP : Ters Faz
Rs : Rezolüsyon
RSD : Bağıl standard sapma
SEM : Taramalı elektron mikroskobu
OP : Açık tübüler
OD : Dış çap
THF : Tetrahidrofuran
UV : Ultraviole
UPLC : Ultra Performans Sıvı Kromatogafisi
UC : Utrasantrüfüj
UP : Ultra saf su
WCOT : Duvar kaplamalı açık tübüler
XRD : X-ışını kırınımı
FED : Gıda kaynaklı eksozomlar

# ŞEKİLLER LİSTESİ


| | | |
|---|---|---|
| Şekil 1.1 | Klasik kolon kromotografinin gösterimi | 2 |
| Şekil 1.2 | LC sisteminin şematik gösterimi | 2 |
| Şekil 1.3 | Tez çalışması kapsamında kullanılan nano-LC sistemi | 4 |
| Şekil 1.4 | Nano-LC sisteminin avantajları | 5 |
| Şekil 1.5 | Minyatür LC ile ilgili son on yıldaki yayınlar, kapiler kolonların ana türleri arasında arasındaki dağılım | 6 |
| Şekil 1.6 | Nano-LC modlarının ile yaygın analitik kolonlarının ve bu kolon türlerinin temsili görüntüleri | 10 |
| Şekil 1.7 | Analitik kolon çeşitleri; a) Open tubüler, b) Partükül dolgulu ve c) Monolitik kolonlar | 10 |
| Şekil 1.8 | Kolon içindeki monolit yapının ayrıntılı gözenek yapısı | 12 |
| Şekil 1.9 | Boronik asit ve Füme silica nanopartikülleri (FSNP) ile hazırlanmış monolitin SEM görüntüsü | 15 |
| Şekil 1.10 | TEM mikroskobuyla görüntülenmiş 100 nm çapında sığır sütü eksozomu | 16 |
| Şekil 1.11 | Biyogenez ve ekstraselüler veziküllerin hücre membranından salgılanması | 17 |
| Şekil 1.12 | Eksozomlar, mikroveziküller ve apoptik gövdeler | 18 |
| Şekil 1.13 | Pubmed de ‘exosomes’ terimi ile yapılan araştırmada yıllara göre yayın sayısı grafiği | 19 |
| Şekil 1.14 | Pubmed de ‘milk exosomes’ terimi ile yapılan araştırmada yıllara göre yayın sayısı grafiği | 21 |
| Şekil 3.1 | Silanizasyon aşamasında 3-(Trimetoksilill)propil metakrilat (TMSPM) ile iç duvar siloksan gruplarının etkileşim mekanizması | 30 |
| Şekil 3.2 | Kolon silanizasyonu işlem basamakları | 31 |
| Şekil 3.3 | Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MGONP içeriğine sahip polimer karışımları | 32 |
| Şekil 3.4 | Monolit kolon hazırlama şeması | 33 |

| | | |
|---|---|---|
| Şekil 3.5 | Monolitik kolon hazırlama aşamasına ait resimler ..... | 35 |
| Şekil 3.6 | Sütten eksozom ekstraksiyonu …… | 37 |
| Şekil 3.7 | Süt numunesinin 2 000 rcf 30 dk 4 ℃′de ultrasantrüfüjü ..... | 37 |
| Şekil 3.8 | Süpernatanın 12 000 rcf 30 dk 4 ℃′de süt ultrasantrüfüjü ..... | 38 |
| Şekil 3.9 | Süpernatanın 25 000 rcf 30 dk 4 ℃′de ultrasantrüfüjü ..... | 38 |
| Şekil 3.10 | Süpernatanın 0,20 µm fitreden süzülmesi ..... | 39 |
| Şekil 4.1 | Metakriloil grafen oksit nanopartiküllerinin (MGONP) nihai monolitin şematik reaksiyonu..... | 42 |
| Şekil 4.2 | Metakriliol grafen oksit nanopartikülleri (MGONP) içeren (C ve D) ve içermeyen (A ve B) monolitlerin SEM görüntüleri……..... | 43 |
| Şekil 4.3 | Monolitik kolonların (A) MGONP içeremeyen ve B) MGONP içeren FT-IR spektrumları …… | 44 |
| Şekil 4.4 | Monolitik kolonların geri basıncına karşı akış hızının kalibrasyon grafiği, (A) C3 kolonu (B) C6 kolonu ..... | 45 |
| Şekil 4.5 | Monolitik kolonlarda (C3, C4, C5 ve C6) analizi yapılan alkilbenzenlerin (ABs) kromatogramları. Mobil faz karışımı, %88:12 ACN/su (v/v); pik sırası, (1) propilbenzen, (2) bütilbenzen, (3) pentilbenzen. Akış hızı, 400 nL/dak; dalga boyu, 200 nm; konsantrasyon, 0,02 µL/mL…….. | 46 |
| Şekil 4.6 | Eksozom standart numunesine ait kalibrasyon eğrisi ve NTA ölçümü; a) 1 µl enjeksiyon hacmi ile 5 farklı konsantrasyonda hazırlanmış sığır sütünden türetilen ticari eksozom standardına ait kalibrasyon eğrisi, kolona enjekte edilen eksozom miktarı ile pik alanına karşılık bir eğri çizilir. b) Boyutlarına göre eksozomların NTA ölçümü…….. | 48 |
| Şekil 4.7 | Eksozom numunesi katılarak hazırlanan ve boş hazırlanan kolonların ×20 000 magnifikasyon ile elde edilen SEM görüntüleri; A) Boş monolitik kolonu (numune uygulanmamış) B) ekstraksiyondan sonra süt numunesi uygulanmış monolit…….. | 49 |
| Şekil 4.8 | Monolitlerin FT-IR spektrumları, a) Eksozom ile hazırlanmış monolite ait yeşil spektrum b) Blank monolite ait siyah spektrum….. | 50 |

Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan eksozom numunesinin poli(BMA-EDMA-MGONP) C6 monolit kolon ile kromotografik analizi. Analiz koşulları; 1 μL/dk akış hızı, 216 nm dalga boyu. Gradient koşulları (A:%100 $H_2O$ / B:%80 ACN), 0-4 dk %10 B, 4-16 dk % 90 B……... 51

# TABLOLAR LİSTESİ


| | | |
|---|---|---|
| Tablo 1.1 | Sıvı kromotografisinde kolon iç çaplarına göre isimlendirme ..... | 3 |
| Tablo 1.2 | Nano-sıvı kromatografisinde kullanılan analitik kolon tipleri……..... | 8 |
| Tablo 1.3 | Biyoanalitik uygulamalar için alternatif fazlara kıyasla monolit kullanmanın avantajları ..... | 14 |
| Tablo 1.4 | Yaygın eksozom izolasyon tekniklerinin karşılaştırılması ..... | 25 |
| Tablo 3.1 | MGONP'li veya MGONP'siz monolitik kolonların hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon karışımının bileşimi ..... | 34 |

# SÜTTE BULUNAN EKSOZOMLARIN NANO-LC SİSTEMİNDE ANALİZİ

## ÖZET

Bu tez çalışmasının amacı, ters faz nano-sıvı kromatografisi (nano-LC) için yeni metakriloil grafen oksit nano partikül (MGONP) bazlı hidrofobisitesi artırılmış monolitik nano kolonların hazırlanması ve bu kolonların süt numunelerinden eksozomların ayrımı ve analizi için nano-LC sisteminde kullanılması olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda, çalışma kapsamında MGONP'leri grafit kullanılarak elde edilmiş ve MGONP içeriğine sahip monolitler hazırlanarak karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak, monolitik kolonlar, butilmetakrilat (BMA), etilen dimetakrilat (EDMA) ve MGONP içeren solüsyonlar hazırlanmış, porojenik çözücü olarak dimetilformamid (DMF) ve su kullanılmıştır. Hazırlanan polimerik solüsyon 50 µm i.d.'lik fused silika kapiler kolonlar içerisine enjekte edilerek *in-situ* polimerizasyon yöntemi ile monolitik kolonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan kolonların hidrofobisitesinin artırılması için, kolonlar dimetiloktadesilklorosilan (DODCS) ile modifiye edilmiştir. Karakterizasyon için monolitik kolonların morfolojik yapıları SEM görüntüleri ve FT-IR analizleri ile incelenmiştir. Ayrıca, hazırlanan monolitik nano kolonların kromatografik karakterizasyonu nano-LC'de alkilbenzen homologları kullanılarak yapılmıştır. Karakterizasyonu yapılmış monolitik kolonlar kullanılarak nano-LC sisteminde sütten ekstrakte edilen eksozom ayırımı ve analizi için kromatografik optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Eksozomlar karakterizasyon ve tanımlamaları için NTA, SEM, FT-IR kullanılmış ve sonrasında etkin olarak nano-LC'de kromotografik analizleri yapılmıştır. Geliştirlen yöntemin etkin sonuç verdiği ve yeni bir yaklaşımla eksozom izolasyon yöntemi geliştirilmiş olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Nano-LC, monolit, grafen oksit, eksozomları, izolasyon, karakterizasyon.

# ANALYSIS OF EXOSOMES IN MILK IN NANO-LC SYSTEM


## ABSTRACT

The aim of this thesis is to prepare methacryloyl graphene oxide nanoparticles (MGONPs) based monolithic nano-columns with increasin hydrophobicity for the separation and analysis of exosomes in milk samples. In this thesis, graphite was used for the synthesis of MGONPs and the preparation adn characterization of the developed monolithic columns were performed. Firstly, the monolithic columns are prepared using polymeric solutions composing of BMA EDMA and MGONPs and DMF/$H_2O$ as porogenic solvent. The final solution for monolithic column preparation was injected into the fudes silica capillary column with 50 µm i.d. in order to make in-situ polymerization. Final monolithic columns are modified for the increasing their hydrophobicity, which is neccessary for exosome separation and analysis. SEM images and FT-IR are applied for the characterization of monolithic columns as well as chromatographic characterization with homologous alkylbenzenes. The characterized monolithic olumns are applied for the separation and analaysis of exosomes in milk samples by using reversed-pahse nano-LC. In addtion to nano-LC studies, NTA, SEM and FT-IR are used for the tandem characterization of exosomes. All results shows that the developed tecnique is a novel and promising methadology for exosome isolation and it is proposed as a novel approach for exosome isolation.



**Keywords:** Nano-LC, monolith, grafen oxit, exosomes, isolation, characterization.

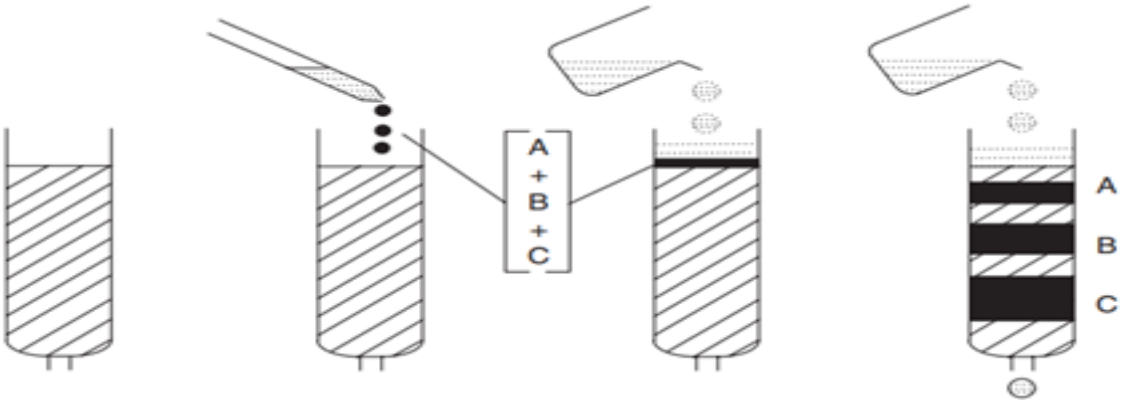
# 1. GİRİŞ

## 1.1. Sıvı Kromotografisi (LC)

Sıvı kromatografisi (LC), iki faz (katı faz ve sıvı faz) arasında yürütülen fiziksel bir ayırma tekniğidir. Bir numune, hareketli faz (akan sıvı) ve katı sabit faz arasında dağıtılarak (bölme, adsorpsiyon veya diğer etkileşimler yoluyla) içerdiği bileşenlerine (veya analitlerine) ayrılır (Dong, 2019). Sıvı kromatografisi 1900'lerin başında, "klasik kolon kromatografisi" olarak ortaya çıkmıştır (Snyder & Kirkland, 1979).

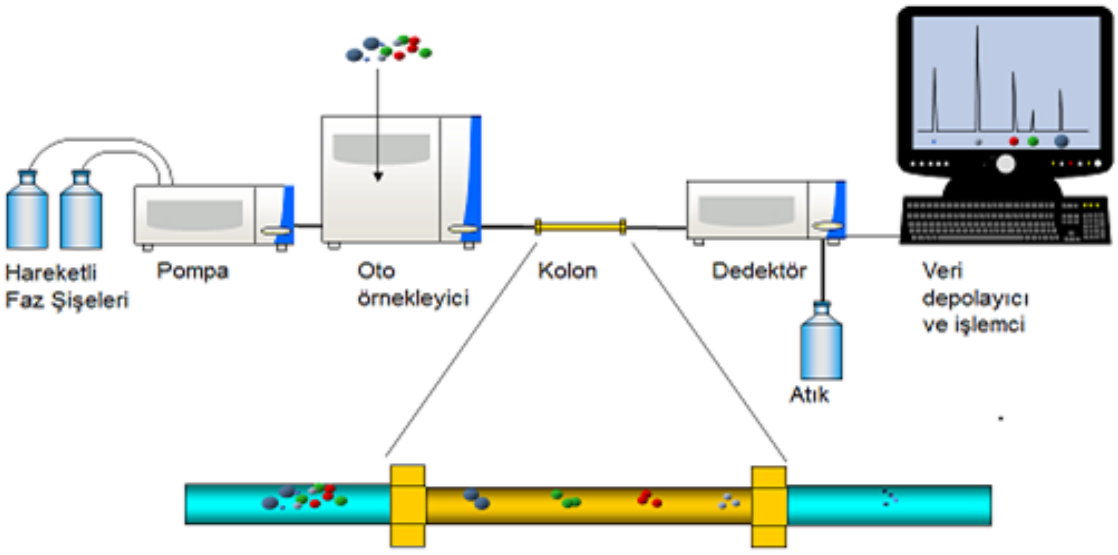
Sıvı kromatografisinin (LC) gelişimi 1941'de Martin ve Synge tarafından yürütülen çalışmalarla gerçekleştirilmiştir. Martin ve Syinge çalışmalarında, sıvı-sıvı kromatografisine ve kromatografinin teorik modeline ek olarak, LC'nin "harketli faz içerisinde çok küçük bileşenlerin kolon boyunca yüksek basınç farkı" kullanılarak elde edileceğini öngördüler (Ettre, 1971). Martin ve Syinge 1952'de gaz kromatografisinin (GC) kullanımına bağlı kalarak başarılı uygulamaları, LC'nin geliştirilmesi için teorik temelin oluşumunu sağlamıştır (Dong, 2019). Bu nedenle GC'de, uçucu olmayan ve farklı özellikteki bileşenlerin analiz edilememesi güçlü bir teknik olan sıvı kromatografisine olan ilgiyi arttırmıştır.

1960'ların sonlarında LC, yüksek basınçlı pompalar gerektiren küçük partikül içerikli kolonların kullanımıyla "yüksek performans"a dönüştü. 1960'larda ve 1970'lerin başında tüm LC üniteleri dahil kolonların, pompaların ve dedektörlerin ticarileştirilmesi, tekniğin kullanımını basitleştirdi ve potansiyel kullanıcıların nispeten kolaylıkla uygulamasını sağladı (Neal, 1995).




Şekil 1.1. Klasik kolon kromotografinin gösterimi (Snyder et al., 2009)

HPLC'nin temeli olarak görülen klasik kolon kromotografisinde; ilk olarak bir cam silindir, tebeşir gibi ince bölünmüş bir tozla doldurulur, kolonun tepesine bir numune uygulandıktan sonra kolonun üzerine bir çözücü ilave edilir (Şekil 1.1). Çözücü yerçekimi ile kolondan aşağı akarken, numunenin bileşenleri (A, B ve C) kolon boyunca farklı hızlarda hareket etmeye başlar ve bileşenlerin ayrımı bu şekilde gerçekleşir (Snyder & Kirkland, 1979).




Şekil 1.2. LC sisteminin şematik gösterimi (http://okanongan.blogspot.com/2015/01/hplc-yuksek-performans-sivi.html)

Modern bir LC sistemi (Şekil 1.2) pompa, numune enjektörü, kolon, dedektör, veri kaydedici ve atıktan oluşmaktadır (Altgelt, K H., Gouw, T H., 1979). HPLC sisteminde kullanıcı, örnekleri bir plakaya yerleştirerek otomatik enjeksiyonla başlar. Hareketli faz

rezervaurı hedeflenen bileşenlerin sistem boyunca taşınmasına ve kolondan geçmesine nihayetinde dedöktöre ulaşarak bileşenlerin kromotografik okumalarına aracılık etmektedir. Numunenin çeşidine göre harkerli faz olarak farklı çözücüler (ACN, su, methanol, propanol vb.) kullanılır. Pompa sistemi yüksek basınç kullanarak hareketli fazın sistem boyunca kesintisiz iletilmesini sağlamaktadır. Oto örnekleyici ya da numune enjeksiyon kısmı numunelerin sisteme yükleneceği bölmeyi ifade eder. Kolon kısmı LC'nin kalbidir ve sabit faz olarak ifade edilmektedir. Numunedeki bileşenlerin ayrımı kolonda gerçekleşmektedir.

Farklı özellikte kolonların kullanımıyla geniş tabana yayılan farklı polariteye sahip bileşenler analiz edilebilmektedir. Çözücü sürekli olarak pompa yoluyla kolona pompalanır ve kolondan geçen bileşikler eş zamanlı olarak dedektör tarafından algılanır. Gelişmiş UV/VIS, PDA, RID, FLD (floresans), MS vb. birçok dedektör tipi bulunmaktadır. Dedektöre iletilen sinyallerin sonucunda veri toplayıcı olarak adlandırılan bilgisayar aracılığıyla yapılan okumalar kromotograma aktarılır. Numunedeki bileşikler (örn; 1, 2 ve 3) ayrımları sonucunda kromotogramda pik şeklinde ortaya çıkar. LC ilaç, gıda, çevre ve klinik uygulamalarında için yaygın olarak kullanılmaktadır (Dong, 2019).

Tablo 1.1. Sıvı kromotografisinde kolon iç çaplarına göre isimlendirme (Chervet et al., 1996)

| Kolon İç Çapı (İ.D.) (mm) | Akış Hızı (mL min-1) | İsimlendirme |
|---|---|---|
| 4,6-3,2 | 2,0-0,5 | HPLC |
| 3,2–1,5 | 0,5–0,1 | Microbore LC |
| 1,5–0,5 | 0,1–0,01 | Micro LC |
| 0,5–0,15 | 0,01–0,001 | Kapiler-LC |
| 0,15–0,01 | 0,001–0,0001 | Nano-LC |
| 0,05–0,005 | <0,0001 | Open-Tubular LC |

LC için genel terminoloji, klasik modlardan minyatür modlara kadar uzanır. Genel olarak, bu tanımlamalar, kolon iç çapına (i.d) veya analiz boyunca uygulanan akış hızına dayanır (Vasconcelos Soares Maciel et al., 2020). İç çaplara göre çeşitli kolon tiplerinin tanımları ve bunlarla ilişkili karakteristikler Tablo 1.1'de gösterilmektedir. HPLC kolon iç çapı 4,6-3,2 mm ile karakterize edilir ve akış hızı 2 ml'e kadar çıkabilir. Son yıllarda oldukça popüler olan nano-LC' de ise kolon iç çapı 200-5 µm'ye kadar düşmektedir. Nano-LC'de 1000-50 nL/dk'ye kadar düşük akış hızlarında çalışma koşulları oluşturulmaktadır. Düşük kolon iç çapı ve düşük akış hızı beraberinde yüksek basınçlı sistemlerin kullanılmasını zorunlu kılmıştır.

## 1.2. Nano-LC

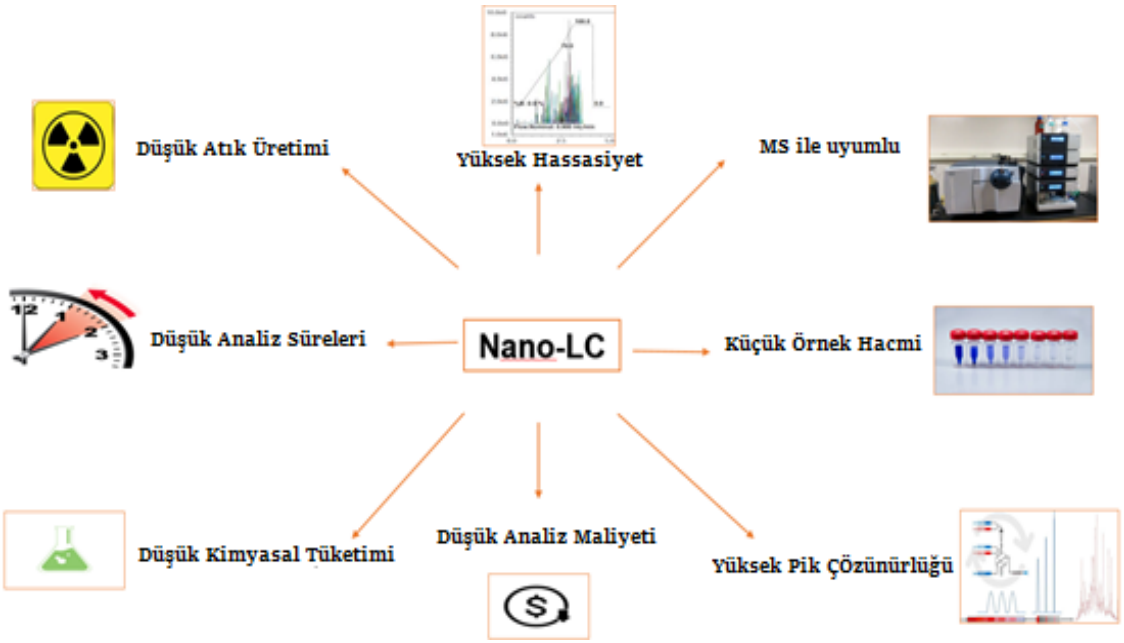
Minyatür LC'nin gelişimi, 40 µm'ye kadar daha dar iç çaplı (düşük i.d.) kolonlarda kromatografik ayrımlar 20. yüzyıl sonlarında bazı öncü çalışmaların gerçekleştirilmesi ile yaygınlaşmıştır (Takeuchi & Ishii, 1981). Nano-LC çalışmaları genellikle yüksek hassasiyet gerektiren, bir biyokarışımda çok düşük miktarda bulunan ve kritik rol oynayan bileşenlerin analizinde kullanılan modern kromatografi sistemidir (Šesták et al., 2015).




Şekil 1.3. Tez çalışması kapsamında kullanılan nano-LC sistemi

Daha sonra bu çalışmalara dayanarak teorik, enstrümental ve uygulama çalışmalarında bu tekniklere büyük ilgi duyulmuş ve böylece ticari LC sistemleri mikro-nano ölçekli formatta oluşturulmuştur (Şekil 1.3).

Minyatür sıvı kromotografi tekniğinin isimlendirilmesi ile ilgili olarak, kolon iç çap (i.d.) ve/veya hareketli faz akış hızı dikkate alınır. Bu nedenle, i.d. ≤200 µm, sırasıyla 50–800 nL/dk akış hızlarıyla nano-LC olarak adlandırılır (Fanali, 2017). Nano-LC terimi, sıvı kromatografi minyatürleştirmesindeki ilerlemeyi belirtmek için 90'lı yıllarının sonlarında kullanılmıştır (Chervet et al., 1996; Vissers et al., 1997). "nano" terimi, uygulanan nano hacimlerden kaynaklanır. Ancak nano-LC terimi günümüzde daha çok ayırma için kullanılan kolonun 10-100 µm aralığındaki iç çapı ile bağlantılıdır (Šesták et al., 2015).

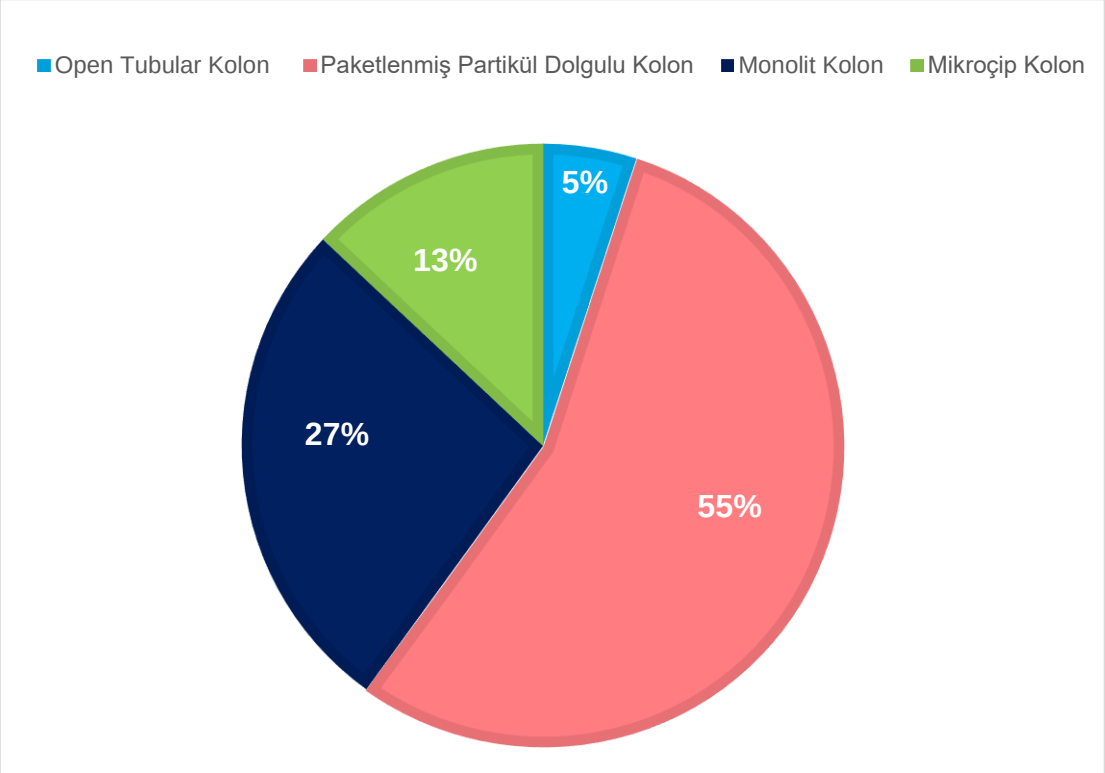



Şekil 1.4. Nano-LC sisteminin avantajları (Aydoğan, 2019)

Son yıllarda biyoanalitik ayırma çalışmalarında, ayırma kolonunun çapını ve akış oranlarını azaltan minyatür LC sistemlerinin geliştirilmesinin önemi artmıştır. Nano-LC, toksik reaktifler dahil olmak üzere hareketli ve sabit faz tüketiminde geniş bir azalma gibi klasik LC'ye göre çeşitli avantajlar sağlar. Genel olarak nano-LC'nin avantajları Şekil 1.4'te verilmiştir. Mikro/nano-akış ayırma sistemlerinde olduğu gibi, nano-LC, klasik LC'ye göre düşük numune gereksinimi, kısa analiz süresi, az miktarda reaktif kullanımı gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Aydoğan, 2019). Bunun yanında küçük örnek

hacimlerinde çalışma imkanları ile yüksek çözünürlüklü pikler elde edilmektedir. Sistemin MS ile uyumlu olması ve böylece yüksek hassasiyet sunması avantajları arasında yer almaktadır. Ayrıca partikül çapının ve kolon uzunluğunun azaltılması, hızlı analizlere olanak sağlar (Asensio-Ramos et al., 2017; Vasconcelos Soares Maciel et al., 2020; Žampachová et al., 2021). Özellikle, en önemli avantajları arasında, yeşil teknolojiye uygun olarak atık oluşumunun azaltılması yönü dikkat çekilmektedir (Welch et al., 2010).

Nano-LC'de analitlerin ayrılması, düşük akış hızlarında (10-700 nL/dak) iletilen bir hareketli fazın etkisi altında seçilmiş sabit fazları içeren kapiler kolonlarda gerçekleşir.




Şekil. 1.5. Minyatürize LC ile ilgili son on yıldaki yayınlar, kapiler kolonların ana türleri arasında arasındaki dağılım (Vasconcelos Soares Maciel et al., 2020)

Şekil. 1.5'te sabit faz tiplerine göre kapiler kolonların kendi içindeki dağılımı verilmiştir. Buna göre sabit fazlar açık tübüler LC (OT-LC), partikül dolgulu ve monolitler (polimerik, silika veya hibrit) şeklinde üretilmektedir. Azaltılmış akış oranı nedeniyle, nano-LC, klasik LC ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir kütle duyarlılığına sahiptir.

Bu özellik, daha düşük bir kromatografik seyreltmeden kaynaklanmaktadır (Vissers et al., 1997). Karlsson ve Novotny'nin küçük iç çaplara sahip kolonlar kullanarak yüksek verimlilik ve daha kısa analiz süresini gösteren öncü çalışmasından sonra, bazı bilim adamları nano-LC ile ilgili hem teorik, hem araçsal hem de metodolojik yaklaşımları dikkate alan çalışmalar rapor etmiştir (Karlsson & Novotny, 1988; Vissers et al., 1997; Zhang et al., 2016). Sonuç olarak dar i.d'ye sahip kromatografik kolonlar içeren ayırma teknikleri (örn, nano-LC), uluslararsı literatürde dikkat çekmektedir (Asensio-Ramos et al., 2011).

### 1.3. Nano-LC Kolon Türleri

Uzunluk, iç çap ve sabit faz tipi dikkate alınarak uygun kromatografik kolonun seçimi, daha küçük iç çapa (i.d.) sahip kromatografik kolonların kullanımı yapılan herhangi bir analitik ayırmanın performansı için önemlidir. MS ile kolay bağlantı, yüksek verimlilik, düşük reaktif tüketimi ve sonuçta ortaya çıkan düşük çevre kirliliği gibi çeşitli erişilebilir avantajlar nano-LC'nin önemli avnatajlarındandır. Kolon iç çapının azalmasıyla, ayrıştırılan bileşiklerin kolon içindeki konsantrasyonu yükselir ve elektrosprey iyonizasyon (ESI-MS) kütle spektrometresi gibi düşük konsantrasyona duyarlı dedektörlerle birleştiğinde gelişmiş hassasiyet elde edilir (Wilson et al., 2019).

Bir ayırma kolonu aslında her kromatografik sistemin en önemli parçasıdır. LC sisteminin diğer bileşenleri de ayırmayı etkiler, ancak kolon, ayırmanın gerçekleştiği kısımdır. Daha önce bahsedildiği gibi, iç çapı (i.d.) 10-100 μm aralığındaki kolonlar; nano kolonlar olarak adlandırılır. Nano kolonlar çoğunlukla araştırmacılar tarafından sabit faz kimyasının gerçek gereksinimlerine, partikül-gözenek boyutuna ve kolon çaplarına göre hazırlanan kolonlardır. Nano kolonlar paketlenmiş dolgulu, açık borulu veya monolit bazlı olabilir.

Günümüzde, çeşitli araştırma alanlarını (omics bilimi, toksikoloji , tıp, gıda güvenliği ve kalitesi, çevre gözetimi, diğerleri arasında) kapsayan minyatürleştirilmiş LC'ye dayalı uygulamalar olarak, yeni analitik kolonların geliştirilmesine odaklanan çalışmalar da teşvik edilmektedir. Bu nedenle, minyatürize LC'nin genel kalitesini iyileştirmede önemli bir dalı temsil eden kolon teknolojisine artan bir ilgi olmuştur (Wilson et al., 2019).

Tablo 1.2. Nano-sıvı kromatografisinde kullanılan analitik kolon tipleri (Vasconcelos Soares Maciel et al., 2020)

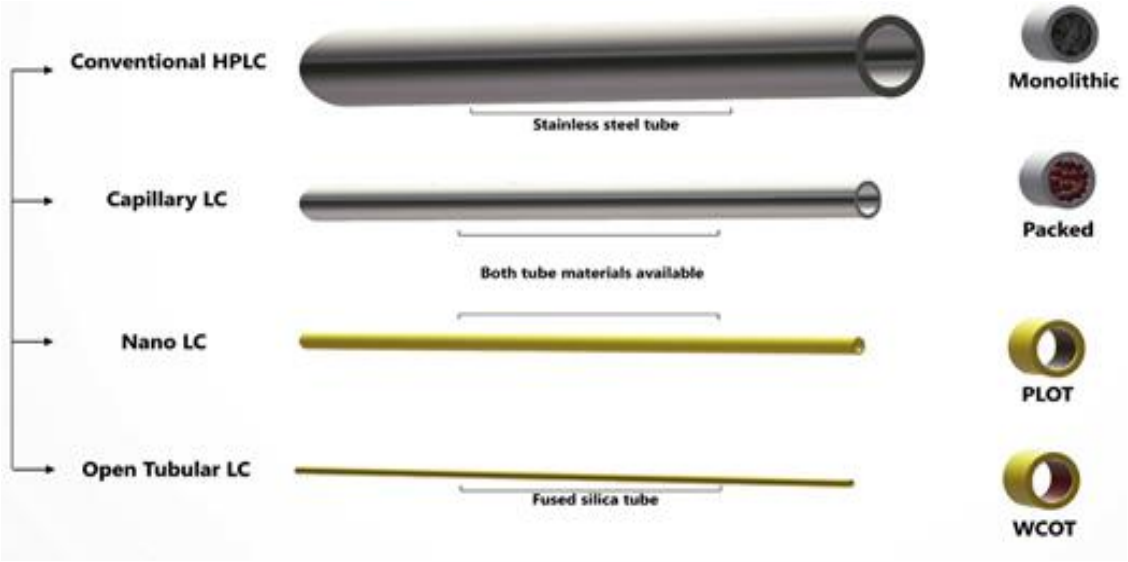
| **Kolon Türleri** | **Sabit Fazlar** | **Uygulamalar** | **Avantajlar** |
|---|---|---|---|
| Partikül Dolgulu Kolonlar | Alkil bağlı (C8, C18), Fenil-heksil, Kolesterol-hidrit, amino, diol ve siyano | Gıda, çevre, ilaç ve ilaç analizi | Birçok sabit fazın farklı seçiciliği mevcuttur |
| Monolitik Kolonlar | Organik polymer monolitler<br>Silika bazlı monolitler<br>Hibrit monolitler | Biyoanaliz için kiral ayırmalar, afinite kromatografisi ve biyomoleküller | Yüksek geçirgenlik, hızlı kütle transferi, düşük ayırma süresi, ayarlanabilir özellikler ve basit üretim |
| Açık Tubüler Kolonlar | WCOT: fiziksel olarak adsorbe edilmiş polimerik fazlar ve nanopartiküller; PLOT: kimyasal olarak bağlı polimerik fazlar. | Yetersiz numuneler için: adli tıp, tıp, biyotıp ve doğal ürünler | LC-EI-MS için potansiyel olarak daha uygun olan yüksek kromatografik verimlilik, optimum geçirgenlik ve düşük karşı basınç oranları |

Genel olarak nano-LC kolonları partükül dolgulu, monolitik ve açık tubüler (open-tubular) kolonlar olarak sınıflandırmaktadır. Kapiler-nano kolonlar, Tablo 1.2'de özetlendiği gibi monolitik kolonlar, açık borulu ve partikül dolgulu kolonlar olmak üzere üç büyük gruba ayrılabilir. Çeşitli uzunluklarda ve tipik olarak C18 kolonlar yaygındır (Wilson et al., 2019). Gıda, çevre, ilaç ve ilaç analizi çalışmalarında genellikle tercih edilmektedir. Sabit fazların seçiciliği önemli avantajı olarak görülür. Ancak yüksek geri basınç ve düşük geçirgenlikleri gibi dezavantajlarıda bulunur.

Monolitik kolonlar, küçük boyutlu katı bir iskelet yapısı gibi benzersiz özellikler gösteren gözenekli yapıda malzemelerdir ve bu morfoloji yüksek geçirgenlik gösterir. Monolitler, kolay hazırlanmaları, hızlı kütle transferi ve daha yüksek geçirgenlik ile birlikte önemli

avantajlara sahiptir (Aydoğan, 2016). Dolgulu kolonlarda uça takılan frit kullanması sorunlu olduğundan, uç frit gerektirmeyen monolitler bu sorunu ortadan kaldırdı (Vitha, 2016). Monolitler organic çözücüler ile çalışıldığında şişme eğilimindedirler ve dolayısıyla gözenek yapısında değişiklikler meydana gelebilir. Mekanik olarak kararsız olmalarıda dezavantajları arasındadır.

Açık tubüler kolonlarda, sabit faz olarak erimiş silika kılcal kolonun iç duvarları kaplanır. Iç duvarları kaplanmış kolonun ortası kolon boyunca açıktır. Son yıllarda, açık tubüler kolonlar, biyoanalitik ayrımlar alanında artan bir ilgi kazanmıştır (Knob et al., 2015). Açık tubüler kolonlar özellikle az miktarda bulunan adli tıp ve biyo-tıp gibi alanlarda numunelerin analizinde tercih edilmektedir. Açık tubüler kolonlar LC-EI-MS için potansiyel olarak daha uygun olan, yüksek kromatografik verimlilik, optimum geçirgenlik ve düşük karşı basınç oranları gibi önemli avantajlara sahiptir.




Şekil 1.6. Nano-LC modlarının ile yaygın analitik kolonlarının ve bu kolon türlerinin temsili görüntüleri (Vasconcelos Soares Maciel et al., 2020)

Şekil 1.6'da nano-LC kolonları ile yaygın kullanılan analtik kolonların temsili görüntüleri verilmiştir. Klasik LC kolonlar çelik malzemeden üretilmektedir ve genellikle geniş iç çaplara sahiptir. Fakat kapiler LC ve nano-LC kolonlar için kullanılan malzemeler değişkenlik göstermektedir. Açık tubüler kolonlarda yaygın kullanılan erimiş silika malzemeden üretilen daha küçük iç çaplı kolonlar olarak karşımıza çıkmaktadır.




Şekil 1.7. Analitik kolon çeşitleri; a) Açık tubular, b) Partükül dolgulu ve c) Monolitik kolonlar

Monolitik ve partikül dolgulu kolonlar içerisine dolgu yapılır. Açık tubüler olan kolonlar ise kolon iç duvarı kaplanır orta kısım ise açıklık kalacak şekilde üretilir. Monolitik kolonlar genellikle iç yapısı dallanmış ağsı bir yapıyı anımsatır (Şekil 1.7).

### 1.3.1. Partikül Dolgulu Kolonlar

Genel olarak, partikül dolgulu nano kolonların tekrarlanabilir bir şekilde hazırlanması için iyi deneyim ve becerilere ihtiyaç vardır. Nano-LC'nin gereksinimleri gereğince kolon yarıçapının azaltılması performansta iyileşmeye neden olabilir. Ayrıca, özellikle küçük iç çaplı kapiler kolonlar (<150 μm) için küçük partiküllerin paketlenmesi ve kapiler kolonların içine fritlerin yerleştirilmesi hem teknik olarak zorluk oluşturmaktadır (Nie et al., 2007).

### 1.3.2. Açık Tubüler Kolonlar

Açık tubüler kolon üretiminde, kapiler iç duvarları modifiye etmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Bunlar arasında polimer kaplamalar, gözenekli silika katmanları, aşındırma ve sol jel teknikleri yer alır. Bu tipler arasında, uzun süreli stabilite ve farklı ligand modifikasyonu ile polimer kaplama yöntemi, durağan fazın kapilerin iç duvarlarına kaplanması için daha iyi bir alternatif sağlar (Collins et al., 2012)

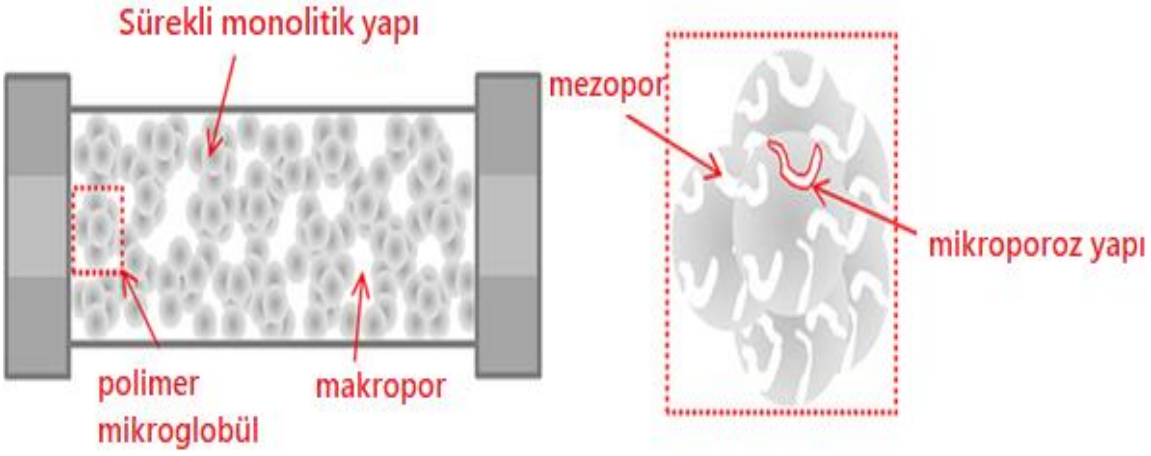
### 1.3.3. Monolitik Kolonlar

Monolitler, tek bir yapıdan oluşan ve ağsı yapı içeren katı yapı olarak tanımlanır (Arrua et al., 2012). LC için polimer monolitik sabit fazlar, partikül dolgulu kolonlara alternatif olarak 1990'ların başlarında Svec ve Frechet tarafından önerilmiştir (Svec and Frechet, 1992). Sürekli gözenekli ayırmayı kullanmanın orijinal fikri ise, Mold ve Synge tarafından 1952'de yayımlanan çalışmasına kadar uzanmaktadır (Mould & Synge, 1952). Monolitler monomer, porojen ve bir başlatıcı içeren homojen bir polimerizasyon karışımından tek bir adımda hazırlanabilirler. Öte yandan, polimerizasyon karışımının bileşimini ayarlayarak yani porojen bileşimini veya monomer-porojen oranını değiştirerek veya polimerizasyon sıcaklığı ve süresi gibi reaksiyon koşullarını değiştirerek makro gözeneklerin ve mikro küreciklerin boyutunu küçültmek ayırma verimliliği arttırabilir (Svec & Frechet, 1995). Monolitik kolonların hazırlama tekniğinin çok yönlülüğü, hidrofobik, hidrofilik, iyonize olabilen ve zwitteriyonik monomerlerle kullanımıyla ortaya konulmuştur (Svec, 2004). Monolitik kolonlar hem numune zenginleştirme için ön kolon (trap kolon) olarak hem de moleküllerin ayrılması için analitik kolon olarak kullanılabilir. Monolitleri içeren analitik kolonların, partikül dolgulu kolonlardan daha yüksek bir geçirgenliğe sahiptir ve ayrıca bir kromatografik analiz yapıldığında daha düşük analitin kütle transfer direnci sunmaktadır (Ladisch and Zhang, 2016).

Son yıllarda monolitik kolonlar, kolay hazırlama, yüksek akış hızında hızlı ayırma, fonksiyonellik ve iyi geçirgenlik gibi mükemmel kromatografik özellikleri nedeniyle küçük moleküllerin ve makro moleküllerin ayrılmasındaki önemli özelliklerine ek olarak hazırlama, karakterizasyon ve uygulamada da hızla gelişmiştir (Liu K. et al., 2013). Monolitik polimerlerin bir başka avantajı ise, monomerler (belirli bir fonksiyonel grup ve bir çapraz bağlayıcı monomer ile monomer/monomerler), porojenik karışım ve polimerizasyon reaksiyonunu başlatan bir radikal başlatıcı içeren homojen bir polimerizasyon karışımından tek bir adımda hazırlanabilir (Arrua et al., 2012). Monolitik kolonlar, bileşimlerine göre üç ana gruba ayrılır; organik polimer bazlı, inorganik silika bazlı ve organik-silika hibrit monolitler (Zajickova, 2017).

İnorganik silika bazlı monolit, küçük moleküllerin hızlı ayrılması için iyi mekanik stabilite, geçirgenlik ve yüksek kolon verimliliği sağlar. Bununla birlikte, silika monolitlerinin yüzeyinin modifiye edilmesi, yoğun emek gerektirmekte ve zaman almaktadır (Cabrera et al., 2000). Silika bazlı ve organik-inorganik monolitlerle karşılaştırıldığında; Polimetakrilat, poliakrilamid ve polistiren monolitleri içeren polimer bazlı monolitler, iyi kimyasal stabilite, basit hazırlama gibi önemli avantajlar gösterir. Silika kolonlar partükül dolgulu ve monolit silika olarak hazırlanabilirler. Monolitik silika kolonların, benzer bir kolon verimliliğinde daha yüksek geçirgenlik ve daha yüksek mekanik stabilite dahil olmak üzere, silika partikül dolgulu kolonlara göre avantajlıdır.

Organik polimer bazlı monolitler inorganik silika bazlı monolitlerin aksine yapımı oldukça kolaydır (Wilson et al., 2019). Organik polimer monolitik kolonlarda iki ana gözenek türü vardır: mezo gözenekler ve makro gözenekler. Mezo gözenekler (2-50 nm), analitin aktif adsorpsiyon bölgelerine eriştiği, hareketli mobil faz ile dolu gözeneklerdir. Makro gözenekler, geri basıncı önemli ölçüde artırmadan daha büyük mobil faz akışı sağlar. Mikro ve mezo gözenekler esas olarak yüzey alanına katkıda bulunurken, makro gözenekler esas olarak gözenekliliğe katkıda bulunur (Svec, 2004). İyi bir monolitik kolon, yeterince geniş bir yüzey alanı sergiler ve kolon içinde alıkonma için yüksek bir akış ve düşük bir geri basınç sergiler.




Şekil 1.8. Kolon içindeki monolit yapının ayrıntılı gözenek yapısı (Stassen et al., 2014)

Monolitik fazlar, makro gözenekler yoluyla ağın yapısından kaynaklanan daha yüksek dış gözenekliliğe sahiptir. Şekil 1.8 monolitik bir kolonun gözenekli yapısını göstermektedir.

Mezo ve makro gözeneklerin ağları birbiri etrafında ağsı yapı oluşturur. Bu yapısal özellik, kolonun düşük bir hidrolik direncinin mobil faz akışı (düşük geri basınç) ve analit tutma için gereken yüzey alanını sağlar.

Fonksiyonel monomerlerin çeşitliliği nedeniyle, polimer bazlı monolit, ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC), hidrofobik etkileşim kromotografisi (HIC), hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) ve iyon değişim kromatografisi (IEC) dahil olmak üzere çeşitli kromatografik modlara geniş çapta uygulanmıştır (Talebi et al., 2013). Bununla birlikte, daha az mezoporları ve daha düşük spesifik yüzey alanları nedeniyle özellikle izokratik elüsyonda küçük moleküller için düşük kolon verimi ve alıkonmaya bağlı kolon performansı sunar ( Liu K. et al., 2013). Mikro gözeneklerin varlığı, küçük moleküllerin jel yapısına nüfuz etmesine izin verdiği ve durgun kütle transfer direnci nedeniyle kromatografik dağılımı arttırdığı için ayırma verimliliğine zararı olacaktır (Nischang, 2013).

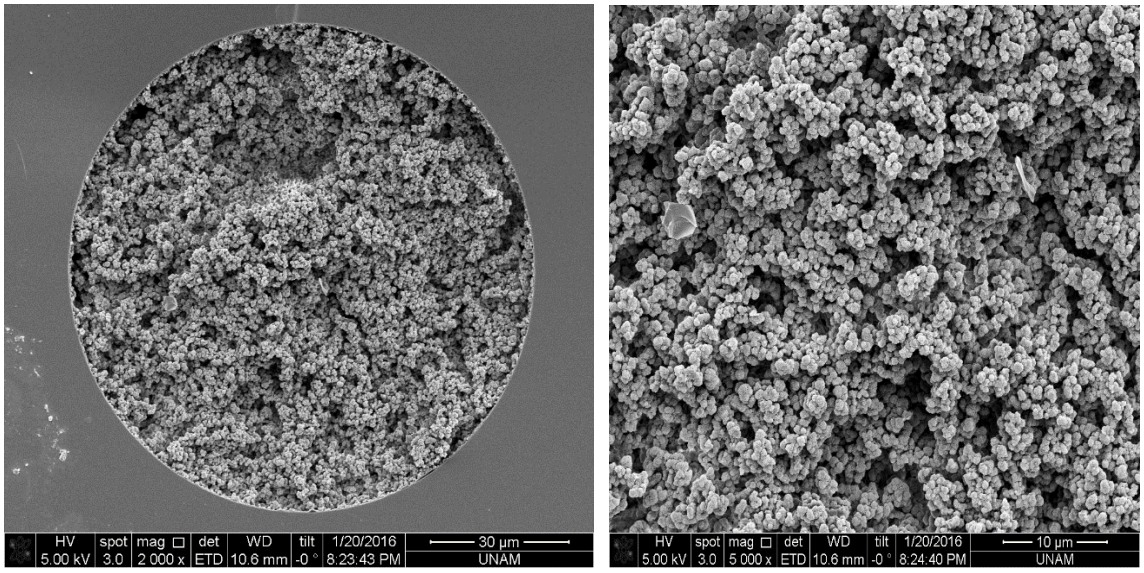
Büyük moleküllerde polimer monolitlerin ve küçük moleküllü ayırmalardaki silika bazlı monolitlerin sıvı kromatografi performansları alanlarındaki belirgin farkları, aslında silika bazlı ve polimer bazlı monolitlerde bulunan gözenekli yapıdaki farklılıklar olabilir. Monolitik kolonların gözenek özellikleri, özellikle geniş gözenekler ve buna bağlı olarak düşük spesifik yüzey alanı, bunların büyük biyomoleküllerin ayrılması veya saflaştırılması için sıklıkla kullanılmasından kaynaklanır (Arrua et al., 2012). Yüksek gözeneklilik ve yüzey alanı, hareketli ve sabit fazlar arasında hızlı kütle aktarım kinetiği ve yüksek bağlama kapasitesi dahil olmak üzere birçok iyileştirme sergiler.

Tablo 1.3. Biyoanalitik uygulamalar için alternatif fazlara kıyasla monolit kullanmanın avantajları (Saunders vd., 2009)

| **Monolitik Sabit Fazlar** |
|---|
| Düşük maliyet, yerinde hazırlamanın göreceli kolaylığı, mekanik olarak sağlam, geleneksel LC akış hızlarıyla oluşan boşluk hacimlerinin yoktur |
| Büyük ve küçük moleküllerin ayrılması için monomerlerin ve porojenlerin bileşimlerini değiştirerek gözenekli özellikleri kontrol edebilir |
| Yüksek hidrolik geçirgenlik ve ayırmanın son derece yüksek akış hızlarında gerçekleştirilmesine izin veren dinamik koşullar altında etkin analiz imkânı verir |
| Esnek sentez, monolitlerin iyon değişimi, afinite, kiral, karışık mod, kısıtlı erişim, hidrofobik ve hidrofilik dahil olmak üzere hemen hemen her işlevsellik ile sabit fazları farklı analitler için uyarlamak üzere değiştirilebileceği anlamına gelir |
| Herhangi bir şekle kalıplanabilir (kılcal, kolon, mikropipet uçları, çip üzerindeki mikroakışkan kanalı). |
| Açık gözenekli yapısı nedeniyle nispeten biyouyumludur |

Yaygın olarak kullanılan geleneksel silika bazlı partikül malzemelere göre polimer monolitlerin bir takım potansiyel avantajları vardır (Tablo 1.3). Polimer monolitler, örneğin daha büyük ölçekli numune hazırlama ve küçük ölçekli kapiler veya nano-LC ayırmaları gibi çoğu biyoanalitik duruma uyarlanabilir ve bunların biyoanaliz kullanımı son yıllarda artmıştır. Bu malzemeler, sıvılar ve biyolojik numuneler için yüksek geçirgenlikleri gibi daha geleneksel partikül malzemelerle karşılaştırıldığında bazı önemli özelliklere sahiptir ve bu da onları katı faz ekstraksiyonu (SPE) için ideal kılar.

Monolitik fazlar çeşitli formatlarda kullanılabilir ve LC kolonları, katı faz eksraksiyonu plakaları, pipet uçları dahil çeşitli formatlarda hazırlanabilir ve hatta nano akış için dar çaplı kapilerlerde sentezlenebilir (Saunders et al., 2009).



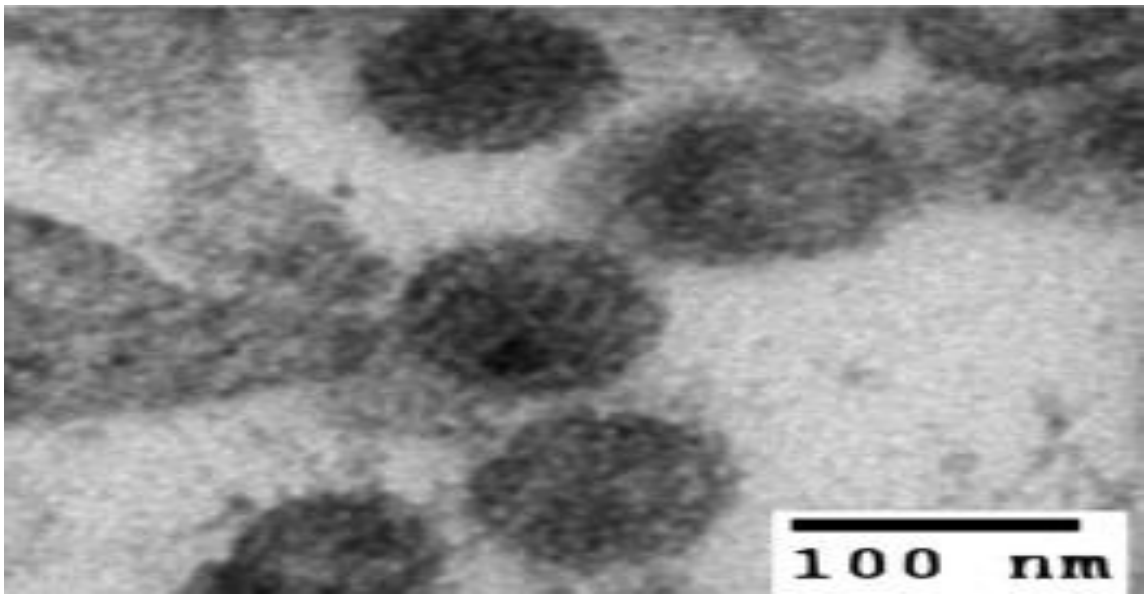

Şekil 1.9. Boronik asit ve Füme silica nanopartikülleri (FSNP) ile hazırlanmış monolitin SEM görüntüsü (Aydoğan, 2016)

Daha küçük iç çapları ile monolitik kolonlar gıda analizinde küçük ve orta ölçekli bileşiklerin analizi için kullanılmıştır (Aydoğan, 2019). Polimer bazlı monolitik nano-kolonlar LC de yaygın olarak hazırlanmış ve hem durgun faz olarak farklı biyolojik yapıların, proteinlerin analizinde (Şekil 1.9) (Aydoğan, 2016; Aydoğan et al., 2020; Günyel et al., 2021; Lynch et al., 2019), iyon analizinde (Aydoğan et al., 2015) proteomic çalışmalarında (Yi et al., 2017) mikro-nano ölçekli kromatografi çalışmalarında (Liu Y. et al., 2018; Vasconcelos Soares Maciel et al., 2020) analitik kolon olarak kullanılmıştır.

Monolitik protein ayrımlarının çoğu, organik polimer monolitlerini kullanır. Bu monolitler, özellikle makromolekül ayrımları için uygun olan geniş gözenekli bir "karnabahar" yapısına sahiptir (Lynch et al., 2019). Monolitik kolon tabanlı nano-LC, geniş tabana yayılan numune analiz çalışmalarında büyük potansiyele sahip minyatür bir ayırma tekniği olarak görülmektedir. Nano-LC ayrımları, farklı seçeneklerde sabit fazları içeren dar iç çapa sahip kılcal kolonlarda (örneğin, 50-100 µm) gerçekleştirilir (Aslan et al., 2022). Yakın zamanda yapılan çalışmada garfen oksit ile işlevselleştirilmiş 50 ve 100 µm çapında bir monolit nano kolon ile bazı küçük moleküller ve proteinlerin başarılı bir şekilde nano-LC'de ayrımını elde edilmiştir (Aydoğan et al., 2021).

## 1.4. Eksozomlar

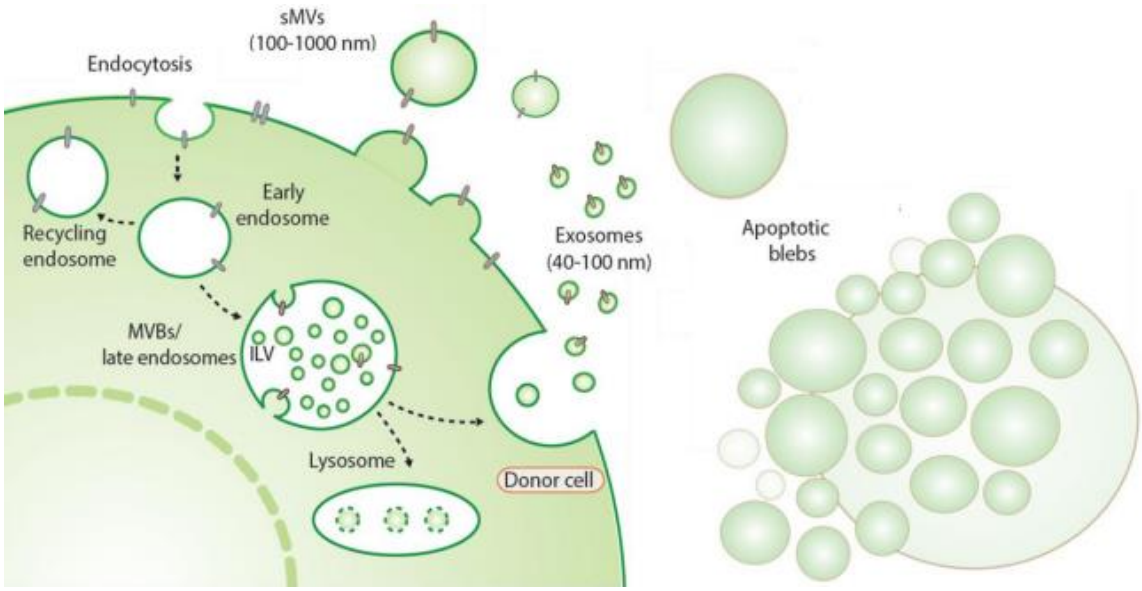
Eksozomlar, ilk olarak 1980 yıllarında R. M. Johnstone ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş ancak işlevleri hakkında o yıllarda hücresel atıkların hücre dışına atılmasında görev aldıklarını ön görmüşlerdir (Pan B.T. and Johnstone, 1985; Pan B.-T. ve Johnstone, 1983). On yıl sonra, eksozomların B lenfositleri ve dendritik hücreler tarafından benzer bir yoldan salındığı bulundu (Raposo et al., 1996). 2000' li yıllardan sonra eksozomların mRNA ve miRNA içeriklerinin saptanmasıyla beraber onlara olan ilgiyi büyük oranda arttırdı (Théry, 2011).




Şekil 1.10. TEM mikroskobuyla görüntülenmiş 100 nm çapında sığır sütü eksozomu

Eksozomlar 40-100 nm (Şekil 1.10) çapında oldukları bilinen hücre içi endozomuyla oluşturulan ve hücre dışına hücre plazma zarından salınan hücre dışı veziküllerin bir alt grubudur (Simpson et al., 2009). Bu biyogenez mekanizması, mikroveziküllerden ve apoptotik kabarcıklardan farklıdır ve eksozomların diğerlerinden farklı özel işlevlere sahip olabileceği hipotezine yol açmıştır (Tauro, 2013). Eksozomlar, çift katmanlı fosfolipit zar yapısına sahip hücre dışı veziküllerdir. Şu ana kadar yapılan sınıflandırmalara göre 3 farklı hücre dışı veziküller karakterize edilmiştir: eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimler. Hücre dışı veziküller boyut, görev ve içerik bakımından farklılık göstermektedir. Eksozomların izolasyon çalışmalarında çoğunlukla

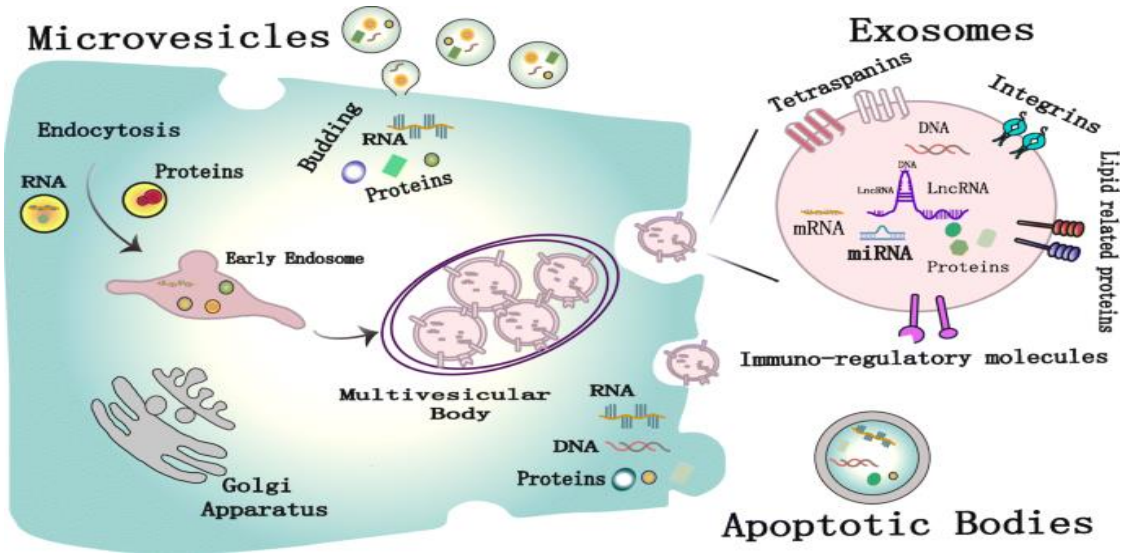
örneklerin süpernatant kısmı tercih edilmiştir. Bunun nedeni, protein, lipit vb. safsızlıkların gidermek ve eksozomların izolasyonunun kontrollü bir şekilde yapılabilmesidir. Bununla birlikte numune ve çalışmaya alanına göre spesifik yöntemler de kullanılabilmektedir (Wang L. et al., 2019).




Şekil 1.11. Biyogenez ve ekstraselüler veziküllerin hücre membranından salgılanması (Tauro, 2013)

Eksozomlar Şekil 1.11'de gösterildiği gibi, membran mekanizmasını içeren ard arda gelişen iki ayrı süreçte endositik yolla oluşur. İlk olarak, plazma zarından türetilen endositoz, hücre dışı sıvı içeren içten dışa yönelimli endositik veziküller oluşturur. Çoklu endositik veziküllerin füzyonu, multiveziküler bir gövdeye (MVB) olgunlaşan erken bir endozom oluşumuyla sonuçlanır (Tauro, 2013).

Genel olarak, boyut, bileşim ve işlev açısından büyük ölçüde değişebilen heterojen bir popülasyonun salınmasına yol açan birden fazla EV oluşumu yolu vardır. Şimdiye kadar, izole veziküllerin alt popülasyonuna dayalı olarak belirli bir yol atamak zorluğu devam etmektedir. Bu nedenle, EV'lerin biyogenezini, sınıflandırılmasını ve serbest bırakılmasını farklılaştıran faktörlerin daha iyi anlaşılmasına açık bir şekilde ihtiyaç vardır. Uluslararası EV'ler Derneği (ISEV), bir EV'yi belirli bir biyogenez yoluna atamanın zorluğundan dolayı, EV serbest bırakılma sırasında canlı görüntüleme teknikleri yakalanmadığı sürece, bu tip veziküller için bir şemsiye terim olarak EV'nin kullanılmasını önermektedir (Gandham et al., 2020).



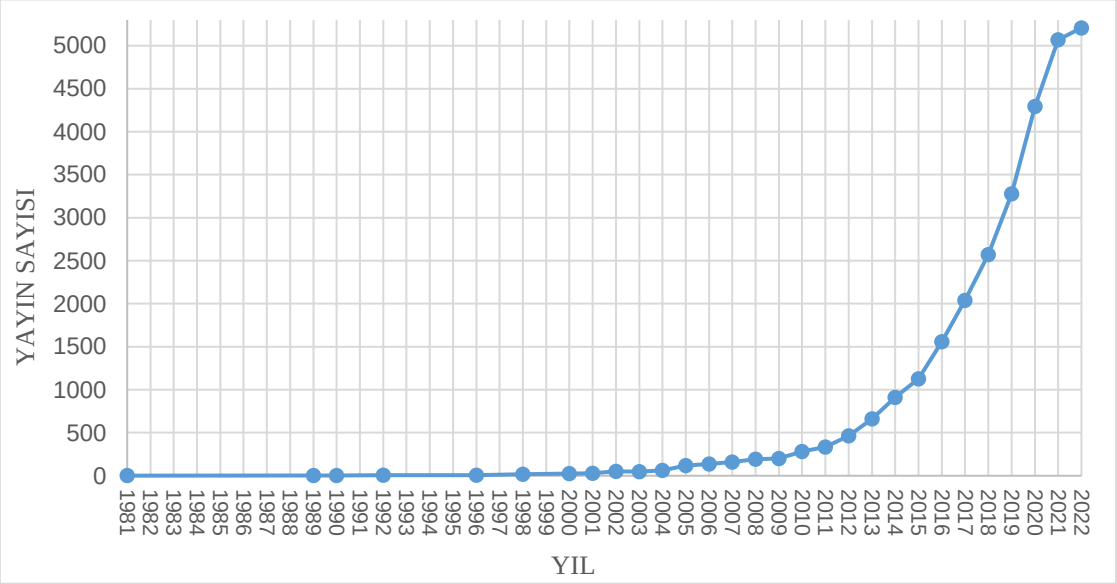

Şekil 1.12. Eksozomlar , mikroveziküller ve apoptik gövdeler(Wang X. et al., 2021)

Ekstraselülar veziküllerin alt grupları boyutları ve işlevleri bakımından hetorejen bir dağılım göstermektedir (Şekil 1.12). Salgılama mekanizması doğrultusunda boyutları 40-100 nm arasında değişiklik gösteren multiveziküller içinde oluşturulan ve eksozitoz yoluyla hücre dışına salgılanan eksozomlar yer alır.

Eksozom membran bileşenlerinin konumlanması ve lümenlerinin içeriği ana hücreninkine benzer. Eksozomlar için salgılandıkları ana hücrenin küçük kopyası da denilebilir (Raimondo F. et al., 2011). Eksozomlar tüm memeli hücreleri tarafından salgılanmaktadır. İnsanlarda eksozomlar, plazma, idrar, tükürük, anne sütü ve bronkoalveolar lavaj sıvısı dahil olmak üzere fizyolojik sıvılarda bulunur (Yamauchi et al., 2019). Eksozomlar mikroRNA, mRNA, membranöz ve hücre içi proteinler içerdiğinden, hem eksozom yüzey antijenlerinin hedef hücre reseptörü ile doğrudan etkileşimi hem de RNA'ların ve proteinlerin eksozomlarda taşınması yoluyla hücreler arası iletişimde rol oynadıkları öne sürülmüştür (Théry et al., 2009; Valadi et al., 2007).

Çeşitli biyolojik yükler taşıyan EV'lerin, ana hücrelerin fizyolojik durumunu yansıttığı kabul edilir (Stremersch et al., 2016). Eksozomların 4563 protein, 764 miRNA, 1639 mRNA ve 194 lipid içeriği karakterize edilmiştir (Mathivanan et al., 2012). Her tür dokudan eksozom kargolarını sınıflandırma çabasıyla 2009 yılında bir veri tabanı

geliştirilmiştir (Keerthikumar et al., 2016). Mevcut durumda ise exoCarta platformunda 9769 protein, 3408 mRNA, 2838 miRNA ve 1116 lipid rapor edilmiştir.




Şekil 1.13. Pubmed'de 'exosomes' terimi ile yapılan araştırmanın yıllara göre yayın sayısı grafiği

Eksozomlara olan ilgi yayımlanan araştırmalardan görülmektedir. Şekil 1.13' te Pubmed veri tabanından "exosomes" terimi ile yapılan araştırmada yayın sayısı, 2010 yılında 282 yayın mevcuttur ve eksozomların önemli fonksiyonlarının keşfedildiği bu tarihten itibaren çalışmalar hızla artmıştır ve 2022 yılında 5200'e ulaşarak eksozomlara olan ilgiye önemli dayanak oluşturmuştur.

### 1.4.1 Gıdalarda Eksozomlar

Eksozomlar, farklı organizmaların biyolojik sıvılarında bulunan nano veziküllerdir (40-100 nm) (Simpson et al., 2009). Gıdalarda bulunan biyoaktif bileşenlerinin insan sağlığı ve hastalıkları üzerindeki etkisi önemli bir alan oluşturmaktadır. Hücredışı veziküllerin alt grubundan biri olan eksozomlar gıdalarda keşfedilen önemli biyoaktif bileşenler arasındadır (Munir et al., 2020). Eksozomlar meyvelerden, sebzelerden ve hayvansal kaynaklardan elde edilen gıdalardan başarılı şekilde izole edilmiştir (Raimondo S. et al., 2015). Son yıllarda yapılan çalışmalarda limon, zencefil, havuç, greyfurt ve süt gibi gıdalardan eksozomlar izole edilmiştir. Bitkilerden izole edilen eksozomların anti-

enflamatuar özellikler, anti-proliferatif, anti-kanser gibi hastalıklara karşı antijen özellikler sergilemiştir (Raimondo S.et al., 2015; Wang B. et al., 2014).

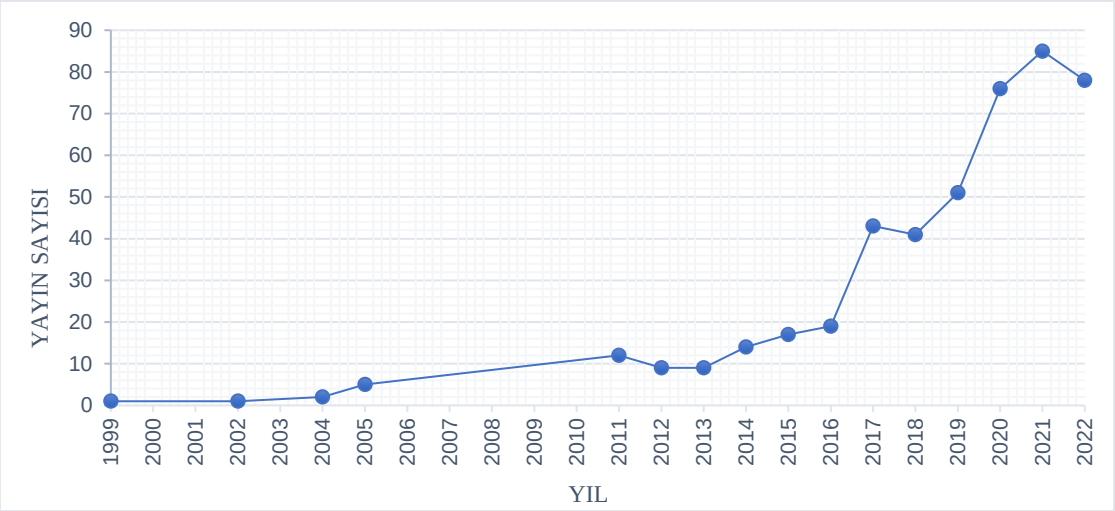
Gıda kaynaklı eksozomlar (FDE), bağırsakta kolayca emilebilir ve kan akışı yoluyla diğer organlara verilerek alıcı hücrelerde uzaktan işlev görebilir. Bundan dolayı FDE'lerin spesifik kargolanması ve yüklerinin boşaltılmasının detayları ve hedef hücrelerle etkileşimi hakkındaki çalışmalar yetersiz olsa da bu moleküller fizyolojik ve patolojik süreçlerin kontrolünde ve terapötik araçlar olarak potansiyel rolleri nedeniyle dikkat çekmiştir (Munir et al., 2020).

Süt eksozomlarının ekonomik uygulanabilirliği, toksik olmaması ve alerjik şok etkisinin olmaması nedeniyle, farklı terapötik moleküller için ilaç dağıtım sistemlerini süt eksozomlarını daha çok çalışmaya itti (Munagala et al., 2016). Eksozomların RNA içeriğinin belirlenmesi ve hücreler arası iletişimdeki rollerinin rapor edilmesinden beri, EV'lerin, nükleik asitlerin belirli hücrelerle hücre içi iletimini sağlayan doğal bir ilaç dağıtım sistemi (DDS) olarak kullanılması araştırılmaktadır (Somiya et al., 2018).

### 1.4.2. Süt Eksozomları

Süt, yenidoğan için büyümeyi, gelişmeyi destekleyen ve bağışıklık sisteminin gelişimini desteklemek için biyoaktif bileşenler sağlayan ilk besindir (Ballard and Morrow, 2013). Sütün besleyici rolüne ek olarak, yenidoğanların sindirim sisteminde aktif olan immünoglobulinler (antikorlar) ve immün düzenleyici proteinler dahil biyoaktif bileşenler içerir. Özellikle, eksozomlar ve süt yağı globülleri (MFG) dahil olmak üzere farklı EV'ler, süt biyoaktif bileşikleri arasında yer almaktadır (Reinhardt et al., 2012).

İnek sütü kolostrumu bol miktarda kazein, β-laktoglobulin ve α-laktalbümin gibi proteinleri ve monosit farklılaşma antijeni CD14 gibi bağışıklığın gelişmesi ve yeni doğanın büyümesi için önemli bileşenleri içermektedir. Doğumdan hemen sonra salgılanan süt (kolostrum) immünoglobulinler açısından zengin farklı bir protein bileşimine sahiptir (Farrell et al., 2004). Kolostrum sonrası sütte bu bileşenlerin (laktoz hariç) çoğunun miktarı kolostrum sütüne oranla daha düşüktür.




Şekil 1.14. Pubmed de ‘milk exosomes’ terimi ile yapılan araştırmada yıllara göre yayın sayısı grafiği

Sütte eksozom çalışmaları sütün cazip bir örnek olmasından dolayı artmıştır. Şekil 1.14’te yıl yıl süt eksozomlarına olan ilgi artarak devam ettiği görülmektedir. Özellikle eksozomların izolasyon ve karakterizasyonda çalışmaların derinleşmesi ile farklı teknikler geliştirilmiştir ve çalışmaların başladığı 2000’li yılların başında süt eksozomları üzerine yayınlanan yayın sayısı 1 ile 5 arasında kalırken, 2021’e gelindiğinde bu sayı 85’e ulaşmıştır.

Birçok çalışma eksozomal taşıyıcılar ile dikkate değer sonuçlar bildirmiş olsa da, ölçek büyütme ve immünojenisite ile ilgili sorunlar, terapötik ürünler olarak eksozomların geliştirilmesinde önemli engeller teşkil etmektedir (Akao et al., 2011). Bu çalışmalarda belirtilen önemli engellerden biri hücre dizilerinden veya hasta örneklerinden eksozomların toplanması, ticari farmasötik üretimle uyumlu değildir ve eksozomların protein bileşeni, sistemik olarak uygulandığında ise muhtemelen bağışıklık tepkilerini tetikleyecek olmasıdır. Bununla birlikte, eğer mevcut kaynaklardan bol miktarda eksozom hasat edilebilirse ve bağışıklık endişeleri hafifletilebilir veya çözülebilirse, bu engeller potansiyel olarak aşılabilir durumda olacak (Mathivanan et al., 2010). Oral uygulama ilaç kullanımı için süt eksozomları ile yapılan bir klinik deneyde süt eksozomlarından gelen miRNA'ların, kan hücrelerindeki genleri düzenlemek için yeterli seviyelerde insan hastaların kanına emildiğini göstermiştir (Baier et al., 2014; Zempleni et al., 2017).

Başka bir çalışmada, eksozomların ölçeklenebilir miktarlarda inek sütünden elde edilebileceğini ve süt eksozomlarının oral uygulama yoluyla ilaç vermek için kullanılabileceğini ileri sürmüştür. Hemen hemen çoğu insanın çocukken süt tüketmesi ve birçoğunun yaşamları boyunca eksozom içeren süt ürünleri (örneğin, süt, yoğurt) tüketmesi gerçeği, insanların inek sütündeki proteinlere karşı bir bağışıklık toleransı geliştirmiş olmaları muhtemel kılmaktadır. Reinhardt ve ark. inek sütü eksozomlarında vezikül füzyonu ve taşıyıcılığı ile ilgili Rab proteinleri ve anneksinler gibi 2107 protein tanımladı (Reinhardt et al., 2012). İnek sütü eksozomları mide asitleri tarafından bozulmaya karşı korunduğundan (Izumi et al., 2012), süt eksozomlarının insan tıbbında ilaç dağıtım sistemleri (DDS) için yararlı olduğu düşünülmektedir; inek sütü eksozom kapsüllü formülasyonları terapötik amaçlar için kullanılabilir.

İnek sütünün proteomu insan sütünden önemli ölçüde farklılık gösterse de, hem inek sütü hem de kolostrum, bebek maması ve protein takviyelerinin üretimine önemli katkılarından dolayı sürekli olarak incelenmiştir (Le et al., 2011). Son on yılda, hücre dışı veziküller (EV'ler) çeşitli türde sütlerden karakterize edilmiştir (Baddela et al., 2016; Gu et al., 2012; Quan et al., 2020; Samuel et al., 2017; Vaswani et al., 2019). Süt hücre dışı keseciklerine (MEV'ler) başlangıçta insan sütünde (Admyre et al., 2007) ve daha sonra sığır sütünde (Hata et al., 2010) bağışıklık düzenleyici özellikler üzerinde çalışılmıştır (Hansen et al., 2022).

İnek sütü eksozomları üzerindeki çalışmaların bir diğer yönü laktasyon evresi özellikle de mastisis meme hastalığı ile ilgili, gelişmiş teşhislere, süt kalitesinde ve çiftlik karlılığında iyileşmelere yol açacak olan meme fizyolojisi ve immünolojisinin daha iyi anlaşılmasının anahtarıdır (Boehmer, 2011). Eksozom fonksiyonlarının/proteinlerinin meme sağlığı üzerinde etkileri olabilir. Bu proteinlerin eksozomlarda tanımlanması, meme beziyle ilişkili hücrelerde bu yolların varlığını ve bu bağışıklık mekanizmalarının bir enfeksiyon durumunda yanıt vermeye hazır olduğunu basitçe gösterebilir.

Bağışıklıkla ilişkili proteinler, bir enfeksiyona karşı bağışıklık tepkisinde doğrudan bir rol oynayabilir. Eksozomların antijenleri paketleme ve proinflamatuar yanıtları uyarma yeteneği, meme enfeksiyonlarının kontrolü ve anlaşılması için çıkarımlar mevcuttur. Örneğin, MHC sınıf I molekülleri, süt eksozomlarının dış yüzeyinde bulunur.

Eksozomların, bağışıklık hücresinin spesifik bağlanması ve aktivasyonu ile sonuçlanan T-hücreleri ile aynı kökenli MHC sınıf I antijenlerini sunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, antijenik peptitler içeren eksozomlar, dendritik hücreler tarafından alınabilir ve antijeni T hücrelerine sunabilir (Bobrie et al., 2011).

Süt eksozomlarına ilişkin bu veriler, laktasyon ortasındaki ineklerden alınan eksozomlar için geniş bir veri tabanı oluşturur ve bu nedenle meme bezindeki fizyolojik koşullar değiştikçe meme hücrelerindeki fonksiyonel değişiklikleri incelemek için bir arka plan oluşturur. Son olarak bu veriler, meme fonksiyonu ve süt bileşenleri ile ilgili "Omics" veri tabanlarının genişletilmesine katkıda bulunur. Bunlar, özellikle eksozomların yeni tanımlanmış bağışıklık fonksiyonu rollerine odaklanan gelecekteki fonksiyonel çalışmalarda laktasyon fizyolojisi ve meme sağlığının daha iyi anlaşılmasının anahtarı olacaktır (Reinhardt et al., 2012).

Süt sığırlarında sağım döneminde sağım günde iki kez yapılır ve büyük miktarda süt elde etmek kolaydır. Bununla birlikte, toplam inek sütü proteinlerinin %80'inden fazlasını oluşturan ana süt proteinleri olan büyük miktarda kazeinin mevcudiyeti nedeniyle inek sütü eksozomlarını izole etmek ve saflaştırmak zordur (Groenen & van der Poel, 1994). Bu nedenle, süt eksozomlarının sonraki analizleri için ilk olarak kazeinleri çıkarmak için sıralı ultrasantrifüjler (UC) gereklidir (Yamauchi et al., 2019).

### 1.5. Eksozomların İzolasyon Yöntemleri

Eksozomların tekrarlanabilir izolasyonu ve zenginleştirilmesi biyolojik işlevlerinin değerlendirilmesine yardımcı olacaktır. Bununla birlikte, eksozomlar boyut, içerik, fonksiyon ve kaynak bakımından heterojendir bu durum eksozomların izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Mevcut izolasyon tekniklerinin çoğu, eksozomları benzer biyofiziksel özelliklere sahip lipoproteinlerden ve endozomal olmayan yollardan türetilen hücre dışı veziküllerden tam olarak ayıramaz, bu da düşük eksozomal saflık ile sonuçlanır. Bununla beraber eksozomları en saf şekilde saflaştırmak için hala geçerli bir yöntem tam olarak geliştirilememiştir.

Tablo 1.4. Yaygın eksozom izolasyon tekniklerinin karşılaştırılması (Li P. et al., 2017)

| İzolasyon Tekniği | İzolasyon prensibi | Avantajlar | Dezavantajlar |
|---|---|---|---|
| Ultrasantrüfüje Dayalı Teknikler | Bileşenlerin ve çözünmüş maddelerin yoğunluk ve boyuta dayalı ayrımları | Düşük ayırma maliyeti ve düşük kontaminasyon, büyük numune kapasitesi ile büyük miktarlarda eksozom eldesi sağlar, az teknik uzmanlık, az veya hiç numune ön işlemi gerektirmez, | Yüksek ekipman maliyeti, hantal, uzun çalışma süresi ve ağır iş yükü, düşük taşınabilirlik durumu, yüksek hızlı santrifüjleme ile eksozomlara zarar görme ihtimali |
| Ultrafiltrasyon | 0,8 μm, 0,45 μm, 0,22 μm çaplı membrane kullanılması | Farklı parçacıklar, moleküler ağırlıklarına ve boyutlarına dayalı ayırma<br>Yüksek saflık | Filtrasyon membranına yapışmalar nedeniyle eksozom kaybı<br>Filtreleme sırasındaki basınç ile EV'lerin deformasyonu ve hasarı |
| Boyuta Dayalı Teknikler | Eksozom izolasyonu, eksozomlar ve diğer bileşenler arasındaki boyut farkına dayalı ayırma (ultraffiltrasyon, SEC) | Ultrafiltrasyon ile, hızlı, özel ekipman gerektirmez, düşük ekipman maliyeti, iyi taşınabilirlik, doğrudan RNA ekstraksiyonu mümkün. SEC ile, yüksek saflıkta eksozom eldesi, biyolojik aktiviteyi korur; üstün tekrarlanabilirlik, orta seviye örnek kapasitesi. | Utrafiltrasyon ile, izole edilmiş eksozomların orta derecede saflığı, kesme geriliminin neden olduğu bozulma, tıkanma ve vezikül yakalama olasılığı, zarlara yapışma nedeniyle eksozom kaybı. |

Eksozom izolasyonunda birçok yöntem kullanılır (Tablo 1.4). En yaygın olarak kullanılan teknikler; Boyut dayalı teknikler (SEC), ultrafiltrasyon ve ultrasantrüfüjleme olarak sıralanabilir. Bu tekniklerin önemli avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. En yaygın kullanılan teknik ultrasantrüfüjleme tekniğidir. Düşük ayırma maliyeti ve düşük kontaminasyon, büyük numune kapasitesi ile büyük miktarlarda eksozom eldesi tekniğin önemli avantalarıdır. Ek olarak ultrasantrifüjleme, çok az teknik uzmanlık gerektirir ve çok az veya hiç numune ön işlemi gerektirmez. Yüksek maaliyetli ekipman, uzun çalışma süresi ve ağır iş yükü, düşük taşınabilirlik durumu, yüksek hızlı santrifüjleme ile eksozomlara zarar görme ihtimali ise tekniğin dezavantajları arasındadır.

### 1.5.1. Ultrasantrifüjleme Tekniği (UC)

Ultrasantrifüjleme (UC) şu anda en yaygın kullanılan eksozom izolasyon tekniğidir ve eksozom ekstraksiyonu ve ayrılması için altın standart olarak da bilinir. UC, esas olarak,

bir çözeltideki her bir bileşenin boyut ve yoğunluk farklılıklarına dayalı olarak gerekli bileşenleri toplar, bu nedenle sedimantasyon katsayısında önemli farklılıklar olan büyük dozlu numune bileşenlerinin ayrılması için uygundur (Livshits et al., 2015). Ultrasantrifüjleme esas olarak iki aşamaya ayrılmıştır. İlk olarak, bir dizi sürekli düşük orta hızlı santrifüjleme ölü hücreleri, hücre kalıntılarını ve büyük boyutlu hücre dışı veziküllerı uzaklaştırmak ve daha sonra eksozomları 100.000 x g'lik bir merkezkaç kuvveti ile daha yüksek bir hızda ayırmak için eksozomlar kirletici proteinler gibi safsızlıkları gidermek için PBS ile yıkamak. Çalışmalar, santrifüjleme süresi, merkezkaç kuvveti, rotor tipi ve parametrelerinin tümünün hedef eksozomların verimini ve saflığını etkilediğini bulmuştur (Cvjetkovic et al., 2014; Livshits et al., 2015). Burada bir dizi diferansiyel merkezkaç kuvveti ve zaman kullanılır. Önce daha büyük parçacıklar, ardından daha küçük parçacıklar ayrılır. Hücrelerin, hücresel kalıntıların, büyük EV'lerin ayrılması için düşük merkezkaç kuvvetleri (≤10000 g) kullanıldı. Eksozom toplama için uzun süreli (100000-200000 g, ≥70 dk) güçlü merkezkaç kuvveti kullanıldı. Fosfat tamponlu salin, kalan proteinlerin çıkarılması için eksozomların peletini yıkamak için kullanılır. Bu işlem saflığı artırmasına rağmen, izole edilmiş eksozomların verimini azaltır (Akuma et al., 2019).

### 1.5.2. Ultrafiltrasyon

Diferansiyel ultrasantrifüjleme ile izole edilen eksozomların düşük saflığı nedeniyle hem daha yüksek saflık hem de verim ile eksozomların büyük ölçekli izolasyonu için yöntemler tasarlamaya yönelik çabalar devam etmektedir. Ultrafiltrasyon, biyomolekülleri boyut farkına göre ayıran bir tekniktir (Akuma et al., 2019). Eksozom parçacıklarının daha yüksek bir geri kazanımına yol açtığını gözlemlediği bir çalışmada, bu yöntemi ultrasantrifüjlemeye daha hızlı bir alternatif olarak öne sürülmüştür (Lobb et al., 2015). Ultrafiltrasyon, daha sonra eksozomların izolasyonu ile büyük moleküler boyutlu kirleticileri ortadan kaldırmak için membran filtrelerin ve basıncın kullanılmasını içerir. Yüksek saflık vaadine rağmen, filtrasyonda uygulanan basınç, daha büyük veziküller eksozomlara benzeyen veziküllere parçalanabileceği ve eksozomlarla birlikte izole edilebileceği için kontaminasyona yol açabilir (Li P.et al., 2017).

### 1.5.3. Boyut Dışlama Kromotografisi (SEC)

SEC ile izolasyon, partiküllerin boyutuna bağlı olarak gözenekli sabit bir faz ile izole edilmesine dayanır. Belirli bir boyutta birçok gözenek içeren küresel jel boncuklara sahip bu gözenekli durağan faz (kolon) SEC'in temelini oluşturur. SEC ile ayırmada numune çözeltisi durağan fazdan geçerken, küçük parçacıklar gözeneklerden geçer ve daha büyük olanlar elüe edilerek dışarı çıkar. SEC ile eksozom izolasyonu, eksozomlar ve diğer bileşenler arasındaki boyut farkına dayalı izolasyonu yapılır (Bankar et al., 2022). SEC ile yüksek saflıkta eksozom elde edilir ve böylece biyolojik aktiviteyi korur. SEC yüksek tekrarlanabilirlik ve orta seviye örnek kapasitesi nedeniyle tercih edilmektedir (Li P. et al., 2017).

Her izolat tekniği, yoğunluk, boyut veya immünoafinite gibi eksozomun kendilerine özgü bir özelliğine/karakteristiklerine dayandığından, düşük ile orta dereceli saflıklar izole eksozomlar sıklıkla gözlenir. Öte yandan, bu teknikler, daha yüksek maliyetlere sebep olur, bu nedenle potansiyel olarak hem analiz öncesi hem de sonrasında daha büyük hata oluşturur ve daha düşük geri kazanımlarla sonuçlanır.

Bu çalışmada ultrasantrüfüj yöntemi ile eksozomların izolasyonu sonrasında ters faz nano-LC sistemiyle yüksek hidrofobik monolitik kolon kullanarak yeni yaklaşımlar eksozom izolasyonu ve analizleri hedeflenmiştir. Eksozom analizlerinde literatürde nano-LC kullanımı yeni bir yaklaşım olmakla birlikte en yaygın yöntem olan ultrasantrüfüjün önemli üstünlükleri bulunmaktadır.

# 2. KAYNAK ÖZETLERİ

1950 yılında kapiler nano kolonlar gaz kromatografisi için Golay tarafından uçucu bileşenlerin analizinde kullanılmıştır (GOLAY, 1958).

El-Rassi ve Horvath tarafından 1960-1985 li yıllar arasında nano düzey kromatografi çalışmaları iç çapı düşük kolonlar kullanılarak yapılmış ve düşük miktarlı numunelerin analizinde kullanılarak geliştirilmiştir (El Rassi and Horváth, 1986; Horvath et al., 1967; Rassi and Horváth, 1986).

1988'de Karlsson ve Novotny tarafından nano-LC tekniği tanımlanmış ve küçük çaplı partikül kolonlar kullanılarak literaturde gösterilmiştir (Karlsson and Novotny, 1988).

1990-2000 arasında nano-LC tekniği laboratuvarlarda uygulanmasına ve pek çok bilimsel çalışma yapılmasına rağmen ticari olarak üretimi sınırlı olmuştur (Deterding et al., 1991; Fanali et al., 2004; Novotny, 1996).

Monolitler Svec ve Frechet tarafından 1996 yılında Science dergisinde tanıtılmıştır (Svec and Frechet, 1992).

El-Rassi ve araştırma grubu farklı türde nano-kolon hazırlayarak nano-LC sisteminde kullanmışlardır (Bedair and El Rassi, 2005; Okanda and El Rassi, 2007).

Nano-LC uygulamaları için son zamanlarda farklı monolitik nano-kolon hazırlanmış ve kromatografik durgun faz olarak ayırma amaçlı kullanılmıştır (Hong et al., 2016).

Grafenin tek tabakalı yapısının gözlenmesi ve karakterizasyonu ilk olarak Novoselov ve arkadaşları tarafından 2004 yılında tesbit edilmiştir (Novoselov et al., 2004).

Wang ve Yang ilk olarak 2012 yılında GO kullanarak GO-monolit hazırlamışlardır (Wang M.-M. and Yan, 2012).

Qu ve arkadaşları Grafen ve GO kullanarak, 3-AMDS ile kaplanmış kapiler durgun faz hazırlamış daha sonra kapiler sıvı kromatografide kullanmışlardır (Qu et al., 2012).

Eksozomlar keşfedilmeden önce, memeli hücrelerinin birbiri arasında hücresel bilgileri ilettiği bilinmesine rağmen bunların hangi yollarla ve nasıl iletildiği tam olarak anlaşılamamıştır. Eksozomlarla ilgili ilk olarak 1983 yılında, iki farklı kan örneğinde yapılan çalışma ile retikülositlerin eritrositlere dönüştüğü gözlemlenmiş ve transferrin reseptörlerinin 50 nm büyüklüğündeki küçük veziküller yoluyla hücre boşluğuna salındığı iki ayrı makalede bildirilmiştir (Harding et al., 1983; Pan B.-T. and Johnstone, 1983).

1987 yılında Rose Johnstone restikülositlerin olgunlaşması sırasında vezikül oluşumunu açıklarken onları diğer veziküllerden ayırt etmek için ‘eksozom’ terimini ortaya atmıştır (Johnstone et al., 1987).

Escudier ve çalışma grubu tarafından 2005 yılında dentrik kökenli hücrelerden türetilmiş eksozomların aşı olarak kullanılması üzerine yapılan klinik çalışmada eksozomların bağışıklıkta önemli rol aldıkları bildirilmiştir (Escudier et al., 2005).

Başlarda süt vezikülleri, Admyre tarafından yapılan çalışmada insan sütünde bağışıklık düzenleyici olarak atanmıştır (Admyre et al., 2007).

2000’li yıllardan sonra süt eksozomları ile ilgili birçok çalışma ele alınmış ve çeşitli sütlerden eksozomların elde edildiği bildirilmiştir (Baddela et al., 2016; Gu et al., 2012; Hata et al., 2010; Quan et al., 2020) .

Sığır sütünden eksozomları izole etmek için Yamada ve çalışma arkadaşları yaptıkları çalışmada 4 farklı izolasyon metodunu değerlendirmiştir. Eksozom verimi açısından bu yöntemler yaygın kullanılan ultrasantrüfüj yöntemi ile karşılaştırılmıştır (Yamada et al., 2012).

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1. Alet ve Ekipmanlar

Kromotografi analizleri için proFlow nano LC (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series- NCS, 3500 RS) sistemi kullanıldı. Sistem başlıca şu birimlerden oluşur; solvent rezervuarı (SRD-3400), pompa (NCP-3200RS), değişebilir 3 nl flow cell kapasitesi ile UV-Vis dedektör (3400-RS) ve son olarak oto örnekleyici (WPS-3000 RS). Ultra saf su için (Direct-$Q^R$-3) Millipore corporation (Billerica, MA, ABD) cihazı kullanıldı. Ayrıca hassas LC sisteminde kullanılmak üzere yüksek saflıkta arıtılmış su için LC-pak® (No: LCPAK000) ürünü kullanıldı. Partikül içeren sıvı solusyonun homojenize edilmesi için Bandelin ultrasonikatör kullanıldı.

NCS-3500 RS ProFlow-nano-LC: (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series)
Dedektör: VWD-3400RS (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series)
Autosampler: WPS-3000TPL (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series)
Soğutmalı Santrüfüj: Beckman Coulter (Allegra X-30R)
Elektron Mikroskop: (SEM, Zeiss, Evo-50)
FT-IR spektometre: (PerkinElmer, spectrum 100)
pH Metre: Thermo Orion Star A111
Magnetic Karıştırıcı: Termal WN-H320
Karıştırıcı(vorteks): WN-2800
Ultrasonic Su Banyosu: WUC-D06H
Hassas Terazi: HR250AZ (252 g/0,1 mg)
Su Banyosu: WF-SB11
Ultra Saf Su Cihazı: (Direct-$Q^R$-3) Millipore corporation (Billerica, MA, ABD)
Otomatik Pipet: EPPENDORF
Şırınga Filtre (0,20 µm): Corning NY 14831(Lot:02821008) (Almanya)
Tüp (14 m), Cutter, Septum

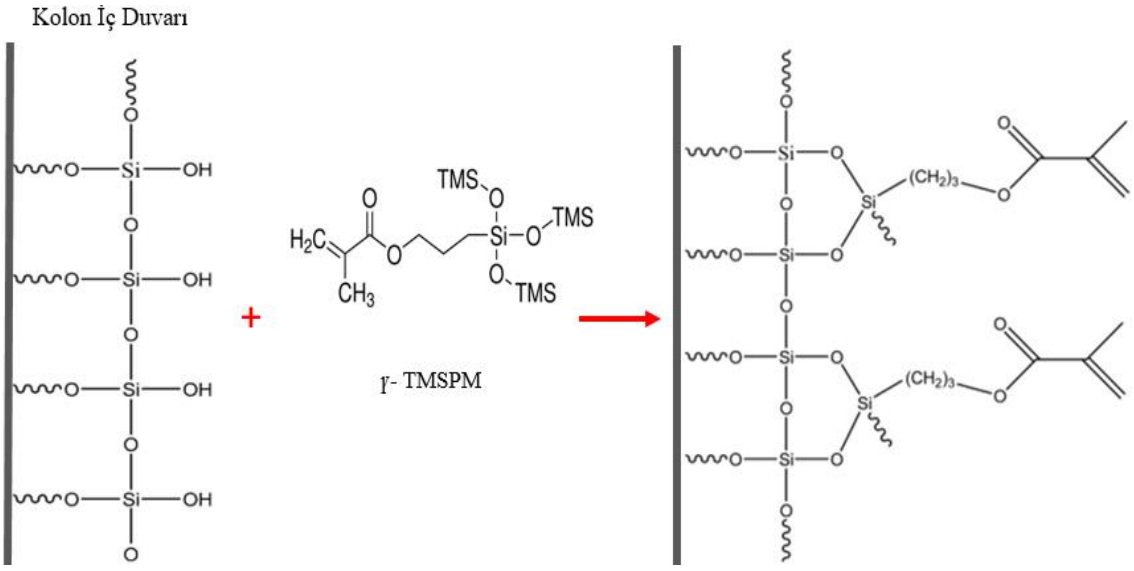
## 3.2. Sarf Malzemeler

Asetonitril (ACN) ve metanol (MeOH) (99% LC-Grade) Merck A.G (Darmstadt, Almanya) den, N, N-Dimetilformamid (DMF) ve Toluen (>98%) Aldrich'den satın alındı. Alkilbenzenler, 1- Dodecanol (Lauryl alkol) Merck'den (Darmstadt, Almanya) satın alındı, AIBN (2,2'-Azobisisobutyronitrile) Chemical (Şangay, Çin) den satın alındı, Butil metakrilat (BMA), 3-(Trimetoksilill)propil metakrilat (TMSPM) ve etilen dimetakrilat (EDMA) Merck'den (Darmstadt, Almanya), sodyum hidroksit (NaOH) Biontech Co. Ltd.'den satın alındı. TSP050375 50 µm i.d. ve 363 µm o.d. (Lot: BUHT02A) BGB Analitik'den satın alındı. Reduced grafen oksid (Lot: MKBW8678V) Aldrich' den (USA) satın alındı.

## 3.3. Deneysel Yöntem

### 3.3.1. Kolon Silanizasyonu

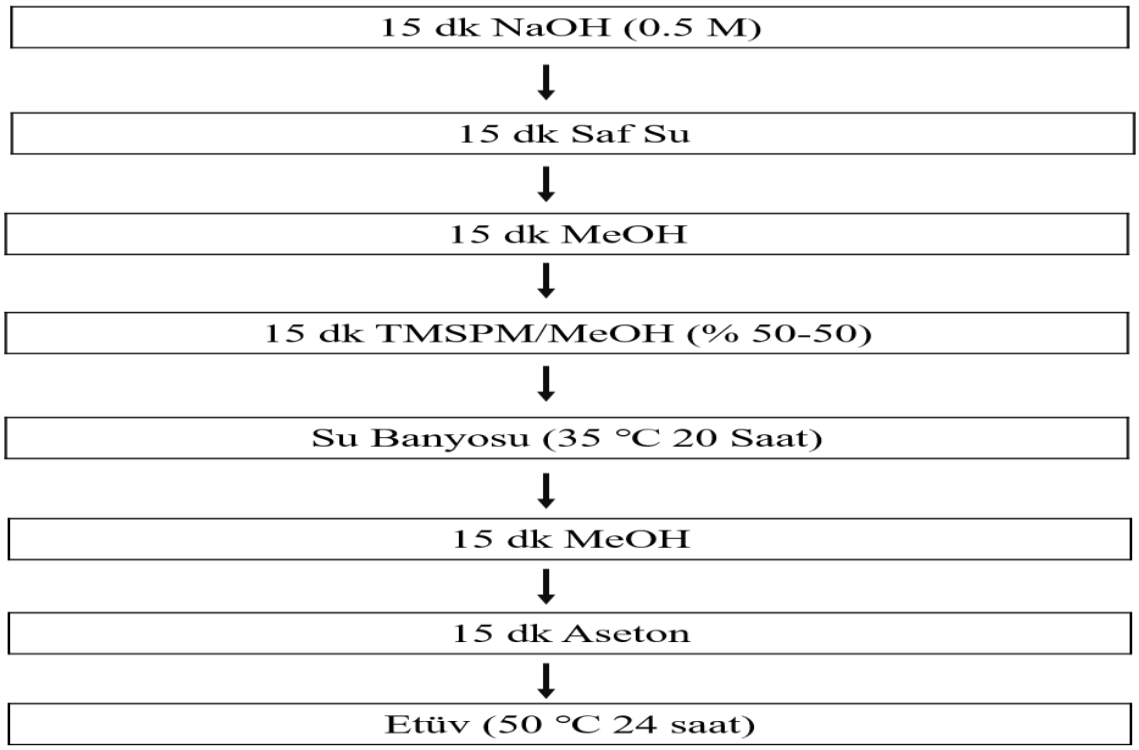
Silanizasyon, kapiler kolonun polimerizasyon aşamasından önce bir ön hazırlama işlemidir ve kolonun iç duvarındaki hidrolize olmuş silanol gruplarının yoğunlaştırılması sağlanır. Silanizasyon işlemi ile silanol gruplarının yoğunluğunu arttırmak amacıyla alkali bir solüsyon kullanılır.




Şekil 3.1. Silanizasyon sonucu kapiler kolon iç duvarında meydana gelen 3-(Trimetoksilill) propil metakrilat (TMSPM) ile silanol gruplarının etkileşim mekanizması

Silanizasyon ile erimiş silika kapiler kolonların iç yüzeyindeki siloksan grupları, sonraki polimerizasyon için bağlayıcı görevi gören silanol gruplarının yoğunluğunu arttırmak süretiyle vinilizasyon için ön işlem yapılır (Şekil 3.1) (Gusev et al., 1999). Kapiler iç yüzeyin silanizasyonu yüksek basınca dirençli, mekanik olarak stabil kolonlar hazırlamak amacıyla polimerin kovalent olarak bağlanmasını sağlamak için kullanılır. Kolon iç duvarında bahsedilen vinil gruplarını elde etmek için çalışmamızda TMSPM kullanıldı.

Silanlama yapılmak üzere 50 cm uzunluğunda fused kapiler kolonu kesici (cutter) kullanılarak kesildi. Silanlama işleminden önceden 0,5 M NaOH hazırlandı. Vinilize işlemi için kullanılan TMSPM, MeOH ile %50-50 oranında karıştırılarak hazırlandı. Silanizasyon işlemi için 1 ml'lik şırınga kullanıldı. Her aşama için ayrı şırıngalar kullanıldı.



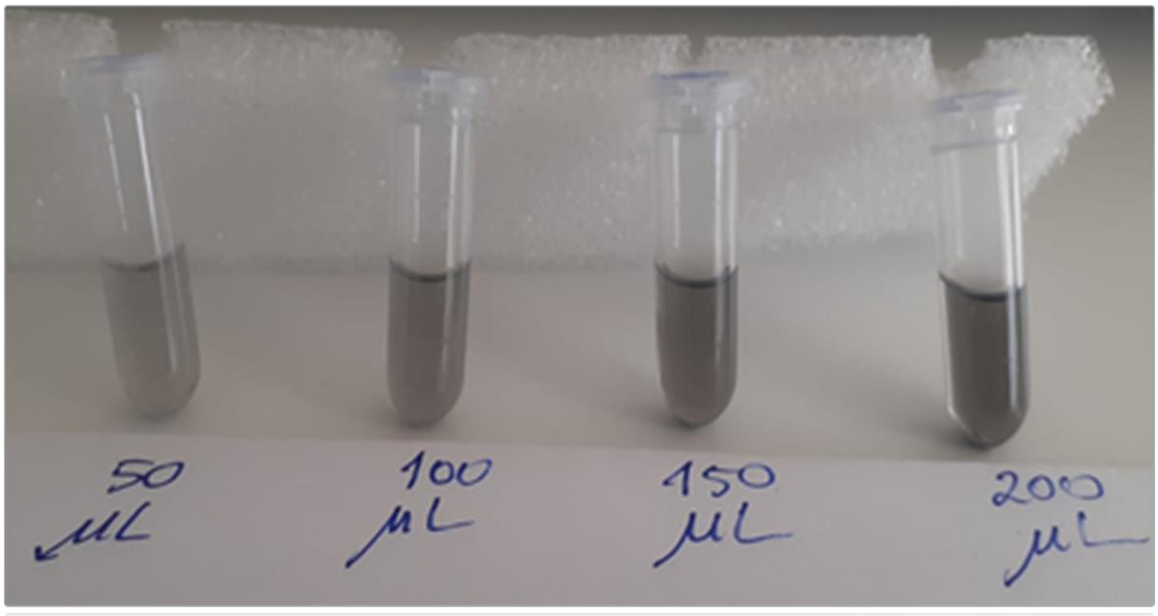

Şekil 3.2. Kolon silanizasyonu işlem basamakları

Silanlama için ilk olarak boş kapiler kolon 15 dk boyunca 0,5 M NaOH ile muamelesinin ardından 15 dk süreyle deiyonize su kullanılarak yıkandı. Sonraki adımda sırasıyla kolondan 15 dk MeOH ve %50-50 oranında hazırlanan TMSPM/MeOH karışımı kolondan geçirildi. İşlem sonunda kolonun her iki ucu septum ile kapıtılarak önceden

ayarlanmış 35℃ su banyosunda 18-20 saat bekletildi. Ayarlanan süre sonunda su banyosundan çıkarılan kolon 15 dk süreyle metanol ile yıkandı. Bu aşamada kapiler iç duvara bağlanamamış yapıların kolondan arındırılması amaçlanmaktadır. Son olarak kolonu kurutmak amacıyla 15 dk aseton ile muamele edildi. İşlem sonunda kolonlar tamamen kurutulması amacıyla 50 ℃ 24 saat etüve konuldu (Şekil 3.2). Aynı işlemler diğer kolonlar için tekrar edildi.

### 3.3.2. Grafen Oksit Sentezi

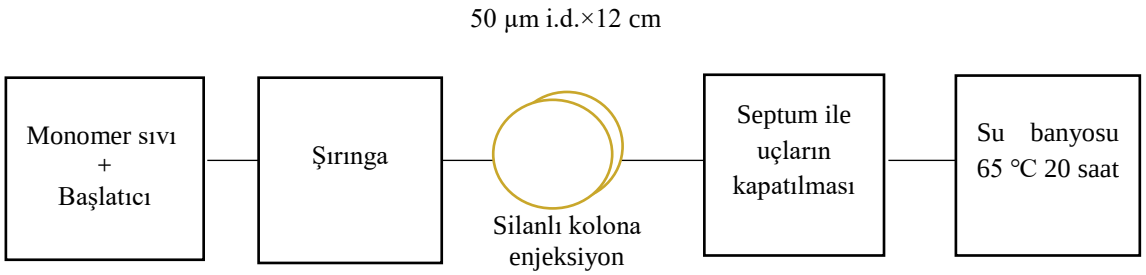
GO sentezi yayımlanmış literatüre (Aydoğan et al., 2021; Hummers and Offeman, 1958) göre yapıldı. GO hazırlama için grafit kullanıldı. Özetle, 1 g grafit tartıldı, 5 mL $H_2SO_4$ (%98), 2 g $K_2S_2O_8$ ve 2 g $P_2O_5$ içeren bir karışımda oksitlemek için 4,5 saat 80 ° C'de bekletildi. Deiyonize su ile yıkaması yapılan katı faz, 12 mL $H_2SO_4$ (%98) ve 0,25 g $NaNO_3$ (%98) ilave edilmesinin ardından karışıma sırasıyla 2 g $KMNO_4$ ve 12 mL deiyonize su ilave edildi. 35 ° C'de 1 saat karıştırıldıktan sonra nihai çözelti deiyonize su ile yıkaması yapılarak kurutuldu. Son olarak GONP'ler kahverengi katı NP'ler (nano partiküller) olarak elde edildi. Elde edilen GO nanopartikülleri, MGONP sentezi için kullanıldı.




Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan MGONP içeriğine sahip polimer karışımları

Şekil 3.3'te 4 farklı konsantrasyonlar hazırlanan MGONP'lere ait koyu renkli bir polimer sıvı elde edilmiştir. Farklı oranlarda katılan MGNOP'lerin polimer sıvısı içinde çözünmesinin araştırılması için polimer karışımları hazırlanmıştır. Bu aşamada MGONP'ler polimerizasyon karışımında 4 konsantrasyonda da başarılı bir şekilde çözündürüldü. Polimer sıvısı hazırlanırken öncelik karışımın homojen olmasıdır.

### 3.3.3. Poli(BMA-EDMA-MGONP) Monolitik Kolon Sentezi




Şekil 3.4. Monolit kolon hazırlama akış şeması

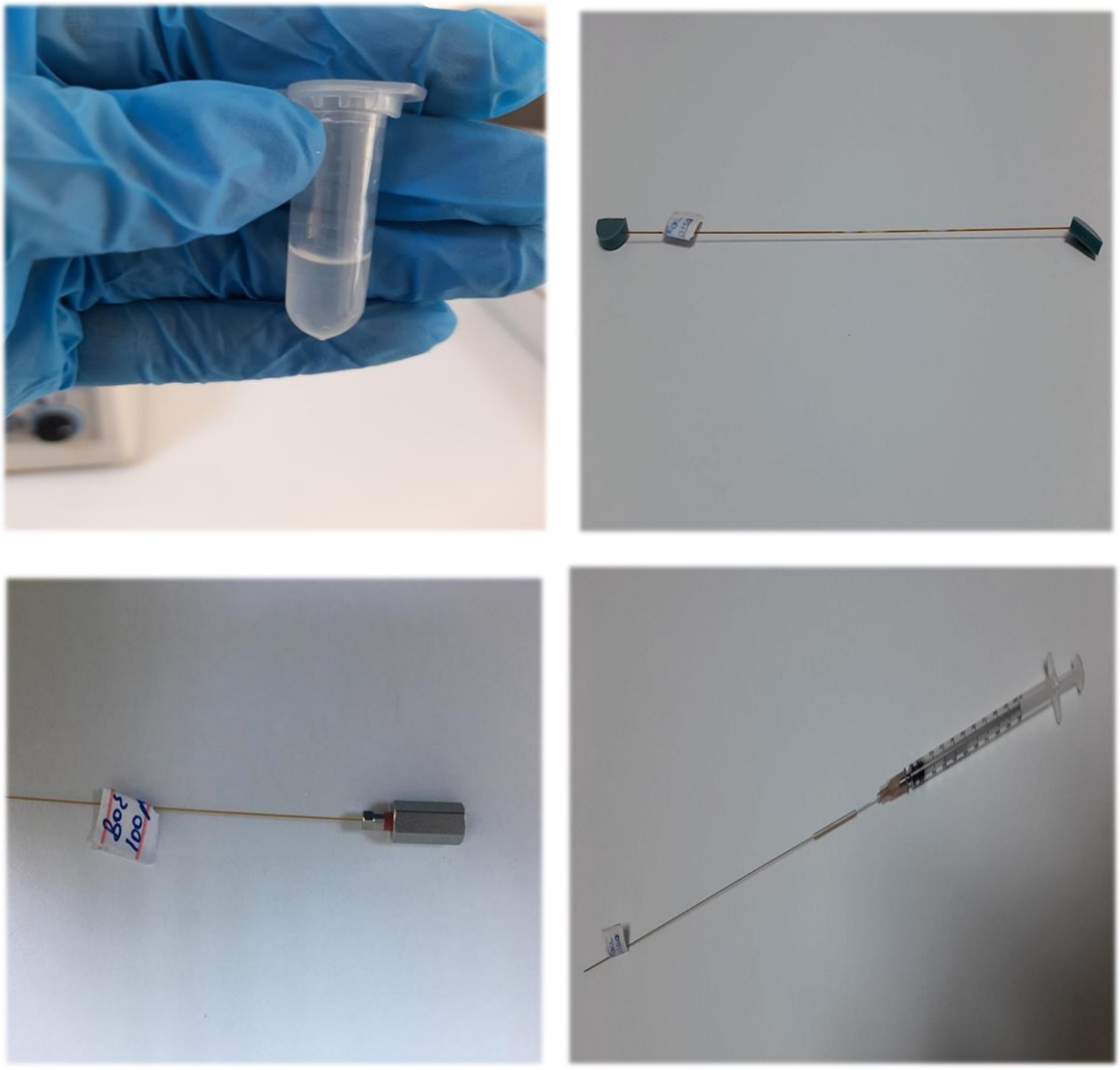
Monolitik kolon hazırlamak için, ilk olarak önceden silanlanmış 50 µm i.d. diç çaplı 12 cm uzunluğunda kapiler kolon kesildi. Polimerizasyon işlemi için sıcak su banyosunda 65 °C'de 20 saat polimerizasyona bırakıldı (Şekil 3.4). Bu tezde eksozomların kromotografide analizi için yüksek hidrofobik yapılı poli(BMA-EDMA-MGONP) kolonlar hazırlanarak kullanıldı.

Tablo 3.1. MGONP'li veya MGONP'siz monolitik kolonların hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon karışımının bileşimi

| **Kolon** | **Monomer BMA:EDMA[a]** | **MGONPs[bc]** | **Porojen DMF:$H_2O$[d]** | **$R^2$ [e]** | **Spesifik yüzey alanı ($m^2/g$)** | **Geçirgenlik ($x10^{-14}$)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **C1** | 2:1 | - | 7:1 | - | - | - |
| **C2** | 2:2 | - | 7:1 | - | - | - |
| **C3** | 3:2 | - | 7:1 | 1 | 71,2 | 6,84 |
| **C4** | 3:2 | 0,81 | 7:1 | 0,9985 | - | - |
| **C5** | 3:2 | 1,60 | 7:1 | 0,9984 | - | - |
| **C6** | 3:2 | 3,44 | 7:1 | 0,9995 | 402,5 | 2,25 |
| **C7** | 3:2 | 5,21 | 7:1 | - | - | - |
| **C8** | 3:2 | 7,10 | 7:1 | - | - | - |

[a] BMA ile EDMA oranları, [b] Genel polimer karışımındaki MGONPs'nin yüzdesi (% wt)
[c] DODCS ile modifiye edilmiş kolonlar
[d] DMF ile $H_2O$ oranları, [e] Akış hızı ve monolitin ortaya çıkan geri basıncı arasındaki doğrusal ilişki

Polimerizasyon çözeltisi hazırlamak için Tablo 3.1'de verilen oranlara göre; monomer olarak ağırlıkça %12,62 BMA, çapraz bağlayıcı olarak %10,18 EDMA, porogen olarak ağırlıkça %8,64 deiyonize su, %64,5 DMF ve başlatıcı olarak ağırlıkça %0,8 AIBN kullanıldı. MGNOP ağırlıkça %3,44 kullanıldı. Epandorfta hazırlanan karışım 5 dk boyunca ultra sonikatörde homojenize edildi ve son olarak vortekslendikten sonra hazır hale getirildi. Polimerizasyon karışımı bir şırınga yardımıyla silanlanmış 50 µm'lik kolona enjekte edildi (Şekil 3.4). Hazırlanan kolon yerinde polimerizasyon için 65 ℃'de önceden ısıltılmış su banyosunda 20 saat bekletildi.



Şekil 3.5. Monolitik kolon hazırlama aşamasına ait resimler

Şekil 3.5'de monolitik kolon hazırlanmasına ait resimler gösterilmektedir.

### 3.3.4. Süt Numunelerinin Temin Edilmesi

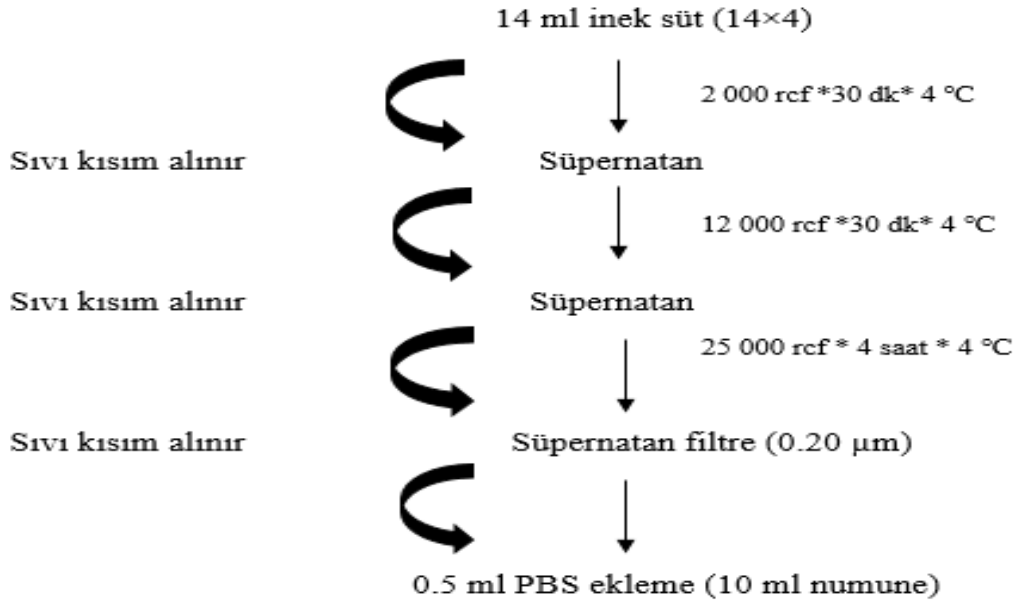
Süt numunesi, laktasyon ortası dönemdeki sağlıklı Holstein ırkı ineklere ait olup, Bingöl merkez ilçeye bağlı bir köyden temin edilmiştir. Süt, günlük otla beslenen ve yaşları 3-4 arasında değişen ineklerden elde edilmiştir. Örnekler arasındaki farklılıkları gidermek amacıyla deneyden önce süt örnekleri birbiriyle karıştırıldı. Örnekler aynı gün veya hemen sonraki gün kullanılmak üzere 4 °C de muhafaza edildi.

### 3.3.5. Eksozom İzolasyonu

Eksozom izolasyonu amacıyla, süt numunesinin ultrasantrüfüjü ile eksozomların izolasyonunun yanında çözünür proteinler, yağlar, kazein ve diğer kirleticiler giderilir. Bu aşamada eksozomların sıcaklık etkisiyle bozunmasının önüne geçmek için soğutmalı ultrasantrüfüjü kullanılmıştır. İzolasyon sırasında uygulanan yüksek santrüfüj hızaları ve uzun santrüfüj süreleri eksozomların yapısına zarar verebilir. Bunun yanında düşük akış hızları ise eksozomlarla beraber diğer EV alt gruplarının beraberinde izole edilmesine neden olabilir.

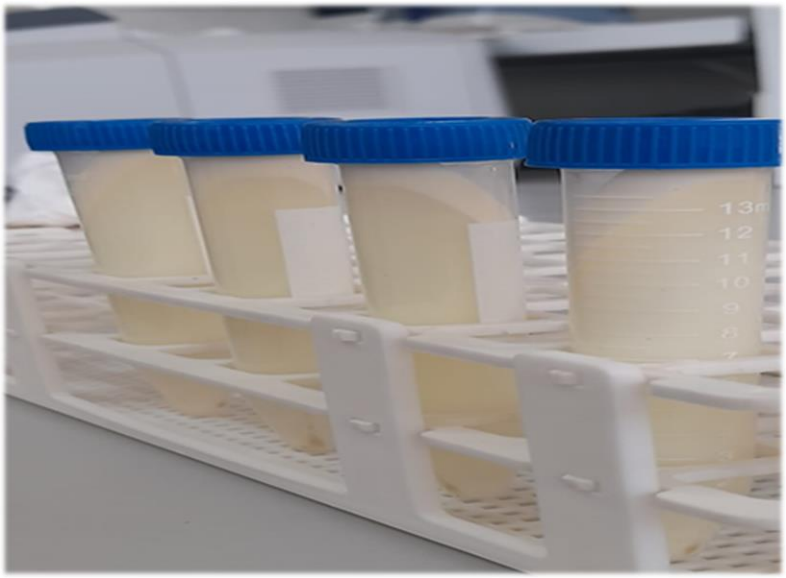
Literatürde sütten eksozomların ultrasantrüfüj ile izole edilmesine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Rahman et al., 2019; Samuel et al., 2017; Somiya et al., 2018; Vaswani et al., 2019; Yamada et al., 2012; Yamauchi et al., 2019). Eksozomların ultrasantrüfüj ile izolasyonu için bu çalışmalarda ortak bir prosedür bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında eksozomların ultrasantrüfüj prosedürü, literatürde yayımlanmış birkaç başarılı çalışmada önerilen prosedürler, mevcut labaratuvar koşullarına göre düzenlenerek yeniden oluşturulmuştur. Bu tez kapsamında yenilenen bu prosedür üzerinden eksozomların izolasyonu yapılmıştır

2000 rcf uygulaması, hücresel kalıntıların ve daha büyük bileşenlerin matristen topak haline getirilmesine yardımcı olur. 0,22 μm filtreleme ve 12000 rcf adımları, matrisi saflaştırarak daha büyük EV'leri ve apoptotik cisimleri ortamdan arındırır. Son olarak, eksozomlar ve 25000 rcf santrifüj adımları ile izole edilir. Bu nedenle çalışmamızda eksozomların ultrasantrüfüj ile izolasyonuna ait literatürde yapılan çalışmaların değerlendirilmesi sonucunda uygun ultrasantrüfüj koşullarını oluşturduk.




Şekil 3.6. Sütten eksozom izolasyonu

Süt numunesinden eksozomların izolasyonuna ait işlem basamakları Şekil 3.6'de verilmiştir. Eksozom numuneleri bir dizi ultrasantrüfüj işlemi uygulanarak izole edildi. Son aşamada fitreden geçirilirdi. Aşağıda izolasyon adımlarını gösteren resimlere yer verilmiştir. Eksozomların izolasyonu amacıyla süt numuneleri toplandı. Numuneler ultrasantrüfüj edilmek üzere 14 mL'lik 4 ayrı falcon tüpüne bölündü.



Şekil 3.7. Süt numunesinin 2000 rcf 30 dk 4 °C'de ultrasantrüfüjü

Süt ilk olarak 2000 rcf 30 dk 4 ℃'de ultrasantrüfüj edildi. Bu adımda süt numunesinin bu aşamada ultrasantrüfüjü ile düşük yoğunluklu süt yağı en üstte, ortada ise süpernetant olarak adlandırılan sıvı kısım ve en altta yüksek yoğunluklu süt proteinler vb. bileşenler faz ayrımına uğrar. Bu aşamada süpernatant kısım alınarak sonraki santrüfüj adımı için hazırlandı (Şekil 3.7).



Şekil 3.8. Süpernatantın 12000 rcf 30 dk 4 ℃'de süt ultrasantrüfüj

İkinci aşamada süpernatant epandorflara (2,5 mL) aktarıldı. 12000 rcf 30 dk 4 ℃'de ultrasantrüfüj edildi. Bu adımdan sonra epandorflarda üst kısımda yine az miktardaki süt yağı toplandı, yüksek yoğunluklu süt bileşenleri ise ultrasantrüfüjün etkisiyle altta toplandı. Ortada bulunan üpernatant kısım alındı (Şekil 3.8).




Şekil 3.9. Süpernatantın 25000 rcf 30 dk 4 ℃'de ultrasantrüfüjü

Üçüncü adımda süpernatant epandorflara aktarıldı ve 25000 rcf 30 dk 4 ℃'de ultrasantrüfüj edildi (Şekil 3.9). Bu aşamada berrak bir sıvı elde edildi. Yüksek santrüfüjün etkisiyle süt yağı ve diğer kirleticiler büyük oranda uzaklaştırıldı.



Şekil 3.10. Süpernatanın 0,20 µm fitreden süzülmesi

Epandorflar daki süpernatan şırınga yardımıyla 0,20 µm gözenek çapına sahip filtreden süzüldü (Şekil 3.10). Son adımda elde edilen numuneye 0,5 mL PBS eklendi ve analiz edilmek üzere 4 ℃'de muhafaza edildi.

# 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında süt numunelerinden eksozomların izolasyonu ve kromotografik analizi için MGONP bazlı hidrofobik monolitik nano-kolon sentezlendi. Hazırlanan kolon literatuürde yer alan poli (BMA-EDMA-MGONP) monolit kolon hazırlama esasına göre optimize edildi ve oluşturuldu (Günyel et al., 2021).

## 4.1. MGONP'lerin Karakterizasyonu

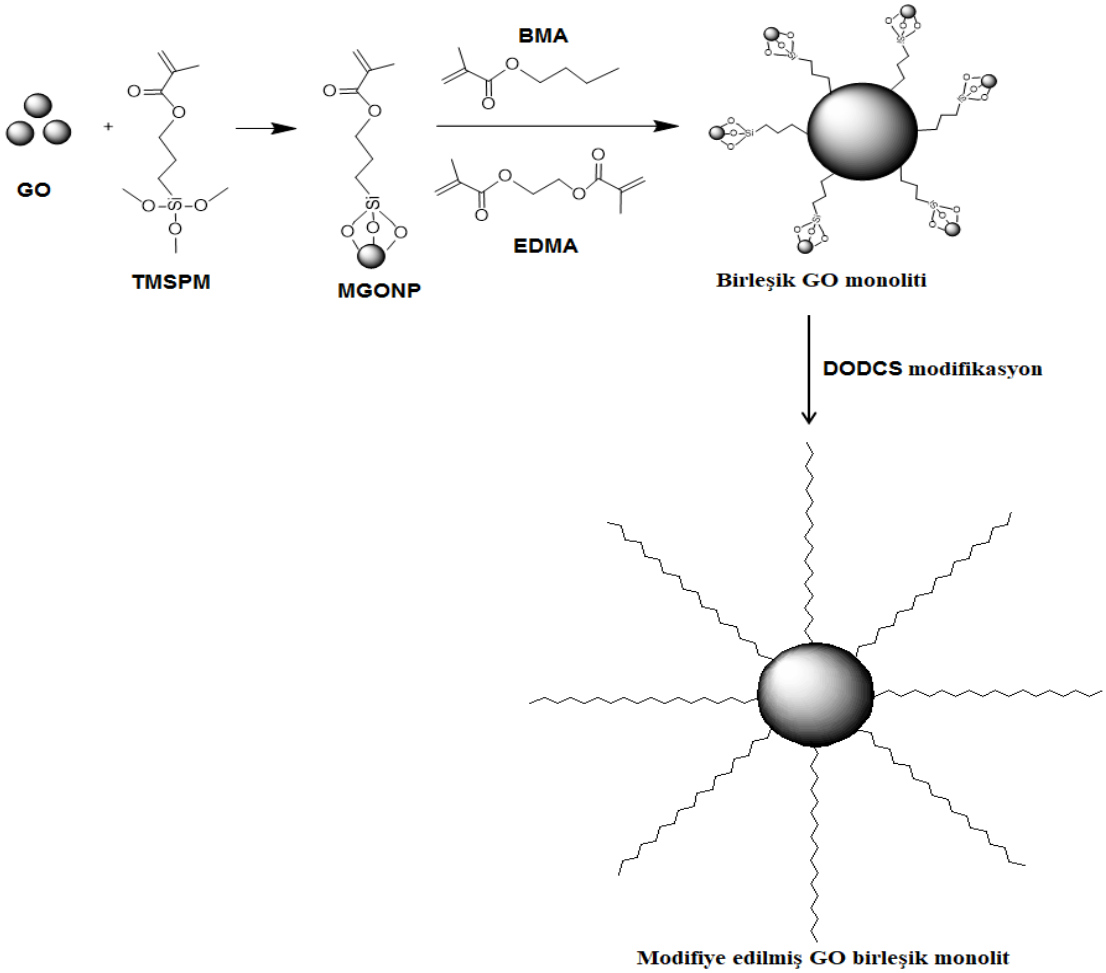
İleri kromatografik analizlerde kullanılan monolitik kolonların hazırlanmasında geniş yüzey alanına sahip MGONP'leri kullanımı yüksek yüzey alanları dikkate alındığında ideal bir seçim olduğu için bu çalışmada monolitik nano kolon hazırlamada kullanılmıştır. MGONP'leri, epoksi, hidroksil ve karboksilik asit grupları gibi çok çeşitli fonksiyonel gruplara sahip nano yapılı malzemelerdir (Gao, 2015). GONP'ler hazırlamak için grafit kullanıldı. MGONP'leri polimerini elde etmek için 3-(Trimetoksisilil) propil metakrilat, epoksi fonksiyonel grupları ile uygun koşullarda etkileştirilerek edildi. Daha sonra DODCS ligandı ile modifiye edilerek yüzey hidrofobisitesi artırıldı.

## 4.2. Poli(BMA-EDMA-MGONP) Monolitik Kolon Karakterizasyonu

MGONP miktarı yüksek hidrofobisiteli monolitik kolon hazırlamak için önemlidir. Literatürde GO'nun karışım içersindeki dağılabilirliğinin, hem çözücünün hemde yüzey modifikasyonu gösterilmiştir (Gao, 2015). Yeni monolitik nano kolonlar oluşturulması bağlamında, yeni bir nanoyapının (MGONP) yapıya dahil edilmesi dolaysıyla polimerizasyon içeriğinin optimize edilmesi gerekir. Bu anlamda, MGONP nanoyapılı malzemelerle yeni bir homojen polimer çözeltisi hazırlamak için kolonun içeriğinin değiştirilmesi gerekmektedir. Monolitin bu hazırlanmasında, monomer olarak BMA hidrofobisiteye katkı verirken çapraz bağlayıcı olarak EDMA hem destek hem de hidrofobik karakter etkisi oluşturmaktadır. Tablo 3.1, monolitlerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon çözeltilerinin bileşimini göstermektedir. BMA ve EDMA içeriklerinin optimizasyonu önceki çalışmamıza göre yapılmıştır (Günyel, 2021).

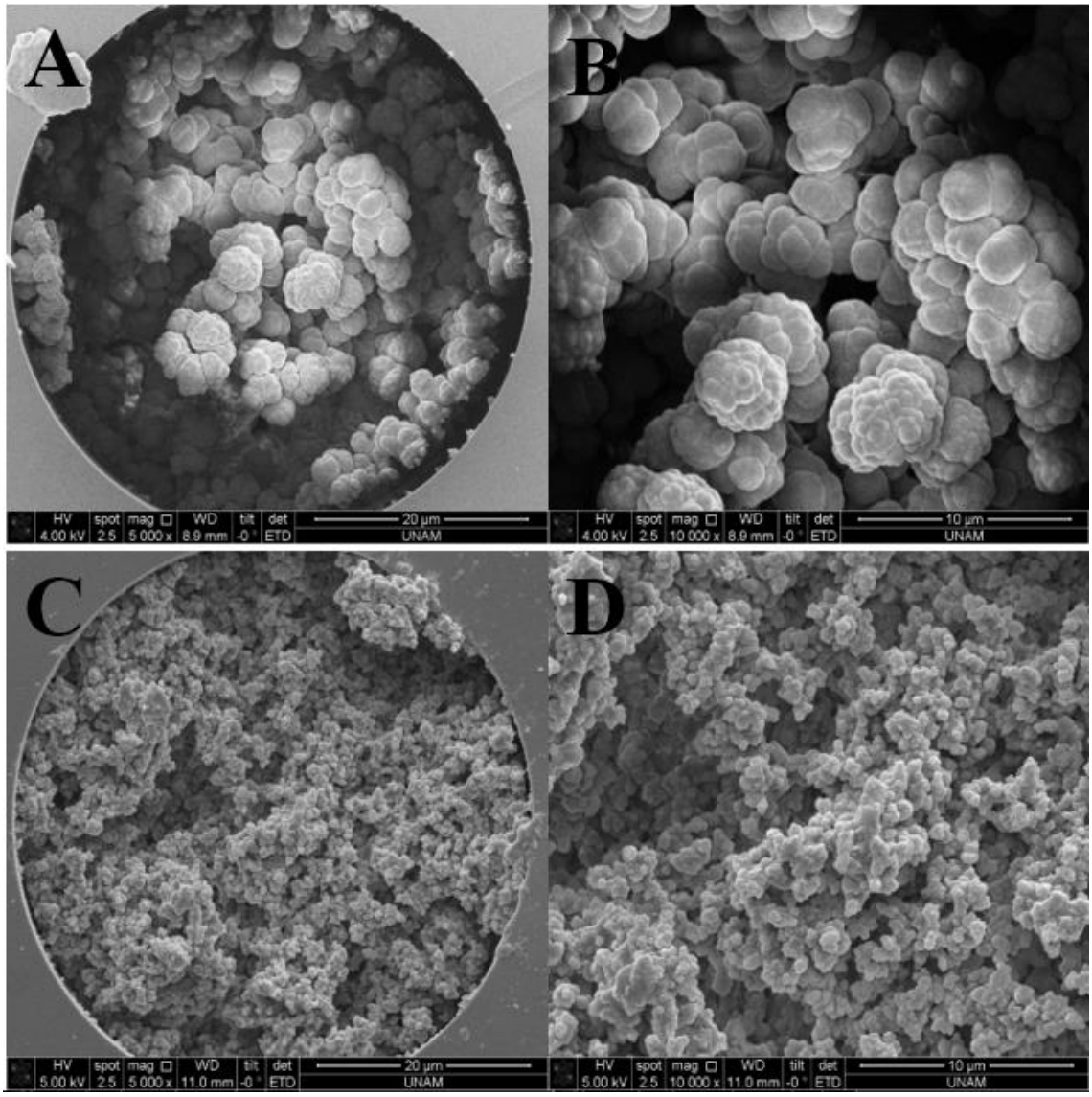
Çözücü sisteminin seçimi, monolitik nano-kolonun ayırma kapasitesini optimize etmek için MGONP'lerin polimerizasyon çözeltisine dağılması için önemli olan MGONP modifiye monolitin hazırlanmasında önemlidir. Bu bağlamda 2-propanol/dodekanol, sikloheksanol/dodekanol gibi çeşitli solvent bileşimleri kullanılmıştır ve bu solvent bileşimleri çok düşük dağılabilirlik göstermiştir. Bu sonuçlar ışığında, MGONP'lerin çözünürlüğü dikkate alınarak porojenik çözücü bileşimi olarak DMF ve su karışımı seçilmiştir ve detaylı çalışılmıştır. Bu amaç için Bandelin sonikatör kullanımının çözeltide MGONP'lerin homojen dağılımına etki ettiği vurgulanmalıdır.

Porojenik solvent karışımındaki yüksek DMF içeriği, 860 bar'ı aşan yüksek geri basınç vermiştir, porojen oranları Tablo 3.1 de verilmiştir. Optimizasyondan sonra, MGONP'ler, BMA ve EDMA ile polimerizasyon çözeltisi DMF/su içinde iyi bir şekilde çözünmüştür. Buna bağlı olarak homojen polimerizasyon karışımı elde edildi. Monolitik yapıdaki konsantrasyonu optimize etmek için TMSPM ile etkileşimi sağlanarak elde edilen koyu süspansiyonlu MGNOP'ların farklı miktarlarda kullanıldı. (%0,81, 1,60, 3,44, 5,21 ve 7,10 (w/w)) Farklı MGONP içeriğine sahip kolonların geri basıncı ve geçirgenliği de incelenmiştir.




Şekil 4.1. Metakriloil grafen oksit nanopartiküllerinin (MGONP'ler) nihai monolitin şematik reaksiyonu

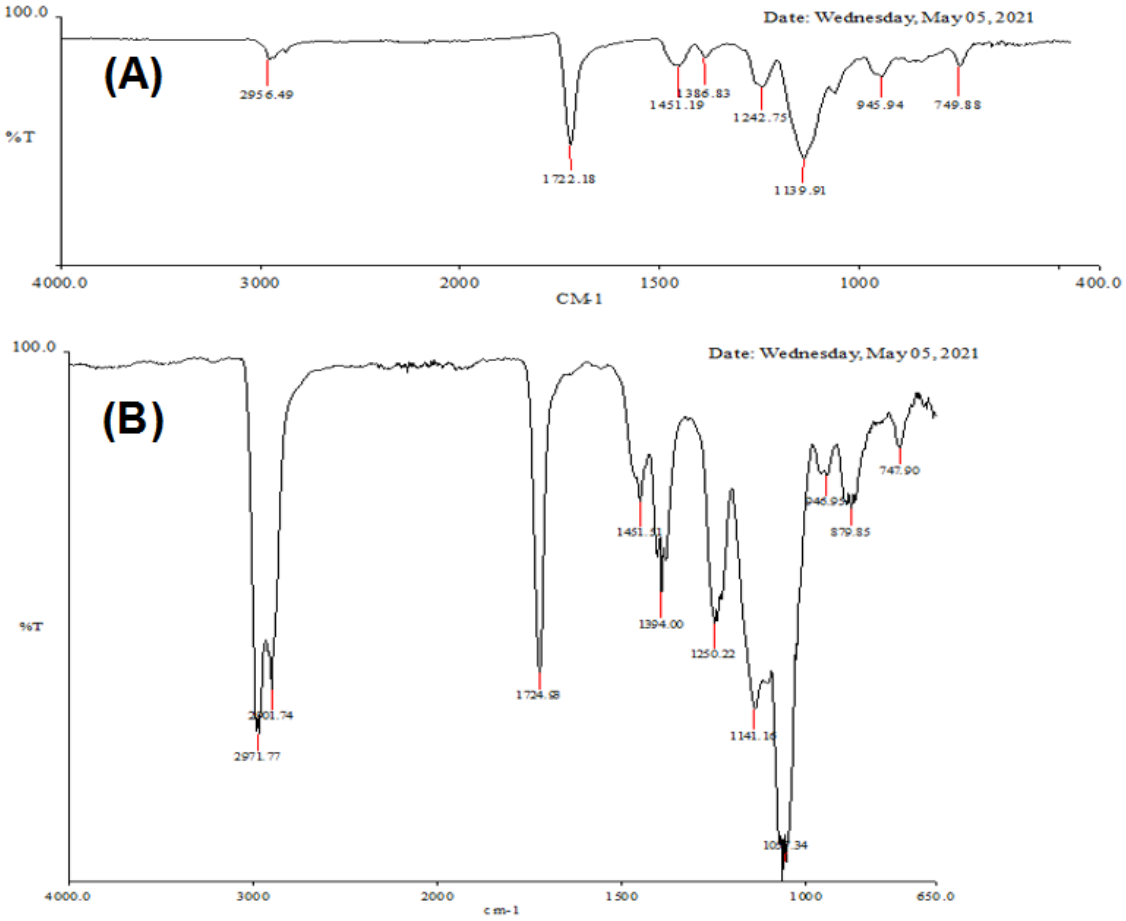
Reaksiyon şeması Şekil 4.1 de verilmiştir. MGONP içeriği artırıldığında elde edilen monolit, polimerizasyonu etkileyen MGONP içeriğinin yüksek olması nedeniyle istenilen geçirgenliği gösterememiş, bu nedenle toplam polimerizasyon karışımına göre ağırlıkça %3,44 düzeyinde optimize edilmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi, elde edilen nano-kolon, etkin bir ayırma ve hidrofobik analitler (örneğin protein ayrımı) için kritik olan yüksek hidrofobik yüzey elde etmek DODCS ile de modifiye edildi. MGONP'leri, epoksi grupları, bazal düzlemde hidroksil grupları ve ayrıca kenarlarında karboksilik asit grupları gibi reaktif oksijen fonksiyonel grupları içermektedir. Bu gruplar, halka açılmasıyla (örneğin epoksi grupları) kolaylıkla modifiye edilebilir. Literatüre göre GO için çeşitli modifikasyon yaklaşımları başarıyla uygulandı (Chen et al., 2012). Kolon etkinliğini artırmak için monolitik kolon DODCS ile modifiye edildi. DODCS'nin monolitik yapı ile reaksiyonu, yüksek oranda hidrofobik yüzey sağlayan DODCS ligandlarının kovalent bağlanmıştır.




Şekil 4.2. Metakriliol grafen oksit nanopartikülleri (MGONP) içeren (C ve D) ve içermeyen (A ve B) monolitlerin SEM görüntüleri

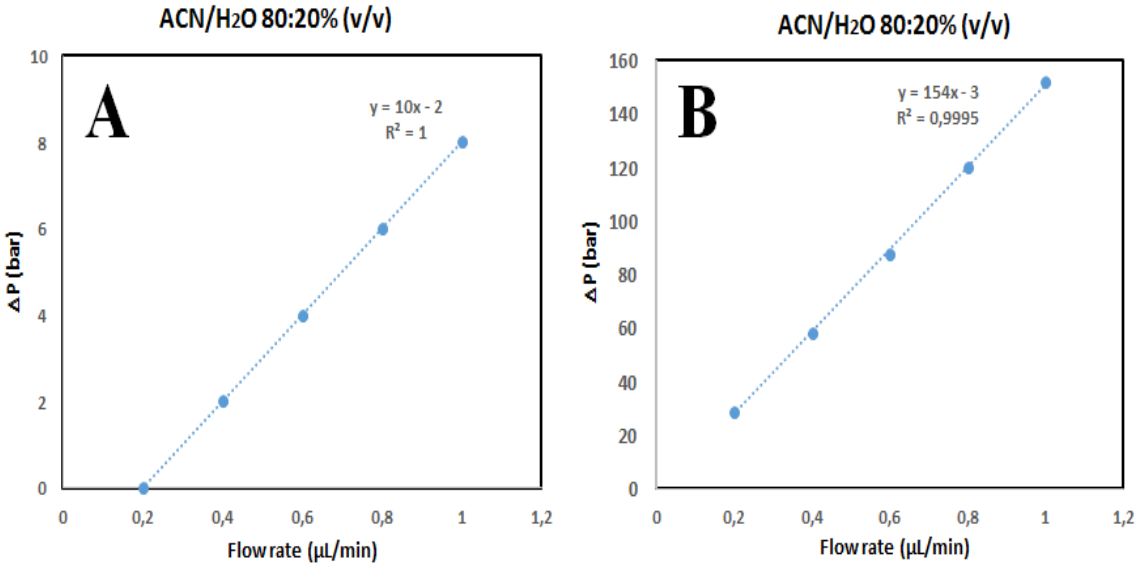
Şekil 4.2A-B de MGONP içermeyen ve 4.2C-D de MGONP içeren monolitik nano-kolonların SEM görüntüleri verilmiştir. MGONP modifiye edilmemiş monolitik kolon daha büyük porlar oluştururken, MGONP içeren kolon küçük çaplı bir makro gözenek oluşumuna yol açmıştır. Nano kolonların, eksozomların kromotografik ayırımında kritik olan yüksek hidrofobik yüzey elde etmek için DODC ile modifiye edilmiştir (Şekil 4.1). Monolitik nankolonların mekanik stabilitesini gösteren karşı basınç değerleri ve akış hızları arasındaki doğrusal ilişkiyi ifade eden $R^2$ değerleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Bu prosedür, Yang et al. (2009)' e göre gerçekleştirildi (Yang et al., 2009).

Şekil 4.3A, C3 MGONP içermeyen kolonunun FT-IR spektrumlarını gösterirken, Şekil 4.3B, GO ile modifiye edilmiş C6 kolonunun FT-IR spektrumları verilmiştir. Şekil 4.3B FT-IR spektrumuna göre, 2901,74 ve 2971,77 $cm^{-1}$'de görülen kayma ve MGONP'lerin kolonun kolonun yapısına katıldığını göstermektedir.




Şekil 4.3. Monolitik kolonların (A) MGONP içeremeyen ve B) MGONP içeren FT-IR spektrumları

Monolitik nanokolonların gözenek boyutunun ve spesifik yüzey alanının ölçümü nitrojen fizisorpsiyonu kullanılarak yapılırken, kolonların spesifik yüzey alanlarını hesaplamak için Brunauer-Emmett-Teller yöntemi kullanıldı. C3 ve C6 kolonlarının yüzey alanı sırasıyla 71,2 ve 402,5$m^2/g$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç ile MGONP'leri ile modifiye edilmiş kolon, boş monolit kolona göre spesifik yüzey alanının altı kattan fazla arttığı görüldü.



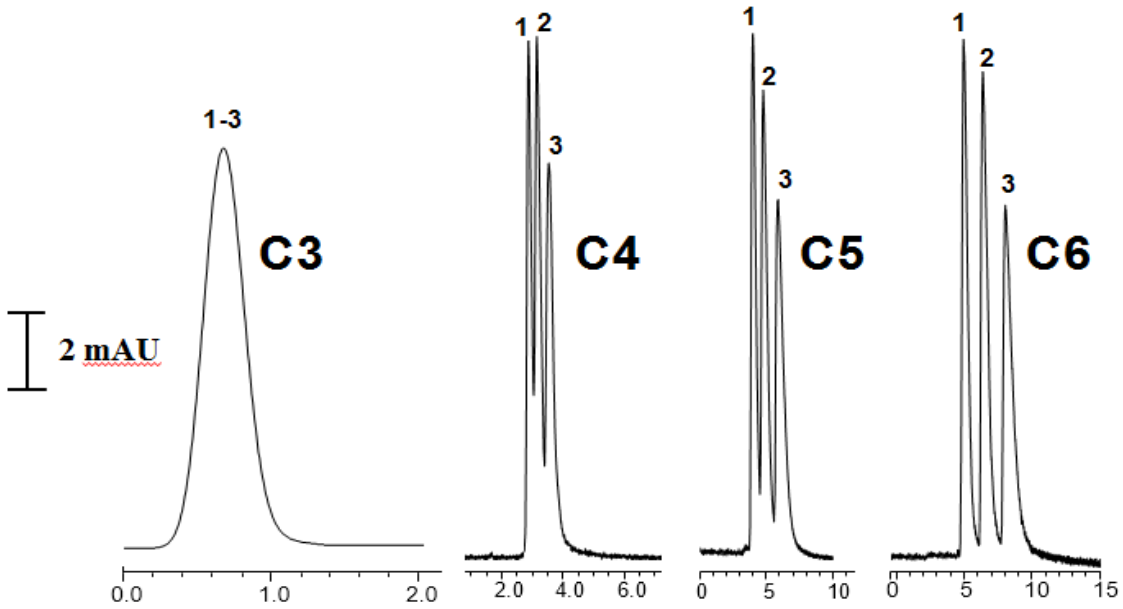

Şekil 4.4. Monolitik kolonların geri basıncına karşı akış hızının kalibrasyon grafiği, (A) C3 kolonu (B) C6 kolonu

Şekil 4.4'de nano-LC sisteminde %80:20 ACN/$H_2O$ mobil fazı ile farklı akış oranlarında kolon geri basıncının ($\Delta P_{kolon}$) ölçülmesi ile kolonun mekanik stabilitesi değerlendirildi. Bir kolonda, akış hızının arttırılması geri basıncın artmasıyla sonuçlanır. Her adımda basınçta oluşan benzer artışlar kolonun mekanik dayanımının iyi olduğunu gösterir. Akış hızı ve kolon basıncı arasındaki ilişki $R^2$ ile verilir. C3 kolonu C6 kolonuna göre daha iyi stabilite göstererek $R^2$:1 olarak elde edilirken C6 kolonu ise $R^2$:0,9995 olarak ölçüldü (Tablo 3.1). MGONP içeriği kolonun basıncına doğrudan etkisi vardır. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi C3 kolonu 1 µL akış hızında yaklaşık 8 bar geri basınç gösterirken, GO katılmış GO kolonunun geri basıncı >140 bar geri basınç göstermiştir. MGONP içeriği arttıkça polimer sıvısının rengi koyulaşmıştır ve kolonun geri basıncı doğrusal olarak artmıştır. Geri basıncın artması MGONP'nin monolit kolonun yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir. Dolayısıyla MGONP'nin monolit kolon hazırlamada uygun bir monomer olarak kullanılabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

Monolit kolon üretilmesinin en önemli gerekliliğinden biri kolon tekrarlanabilirliğidir. Kolonların takrarlanabilirliğini test etmek amacıyla %60 ACN mobil faz oranında propilbenzen analiz edildi. Kolon tutuma faktörünün RSD değeri hesaplanarak ölçüldü. RSD değerleri sırasıyla %2,2, 2,5 ve ve 3,2'den az (n=5) olarak görülmüştür.

### 4.3. Kromatografik Karakterizasyonlar

Monolitik nanokolonların kromatografik karakterizasyonu, alkilbenzen (AB) homologları; propilbenzen, butilbenzen ve pentilbenzen kullanılarak yapıldı. %88:12 (v/v) ACN/$H_2O$ mobil faz karışımı ile MGONP olmayan C3 kolonu AB'ler için tatmin edici bir alıkonma sağlamazken, DODCS ile modifiye edilmiş MGONP'li C4, C5 ve C6 monolitik nanokolonlar kullanılarak AB'lerin kromatografik ayırımı yapıldı.




Şekil 4.5. Monolitik kolonlarda (C3, C4, C5 ve C6) analizi yapılan alkilbenzenlerin (ABs) kromatogramları. Mobil faz karışımı, %88:12 ACN/$H_2O$ (v/v); pik sırası, (1) propilbenzen, (2) butilbenzen, (3) pentilbenzen. Akış hızı, 400 nL / dak; dalga boyu, 200 nm; konsantrasyon, 0,02 µL/mL

Şekil 4.5'de hazırlanan nano kolonlardaki artan MGONP içeriğine göre ayırma kromatogramlarının değişimini gösterilmektedir. Diğer kolonlar ile karşılatırıldığında, C6 kolonu ile alkilbenzenlerin nano-LC'de temel ayrımını gösteren yüksek rezolüsyonlu kromotogramlar elde edilmiştir.

### 4.4. Eksozom Ekstraksiyon ve Karakterizasyon Çalışmaları

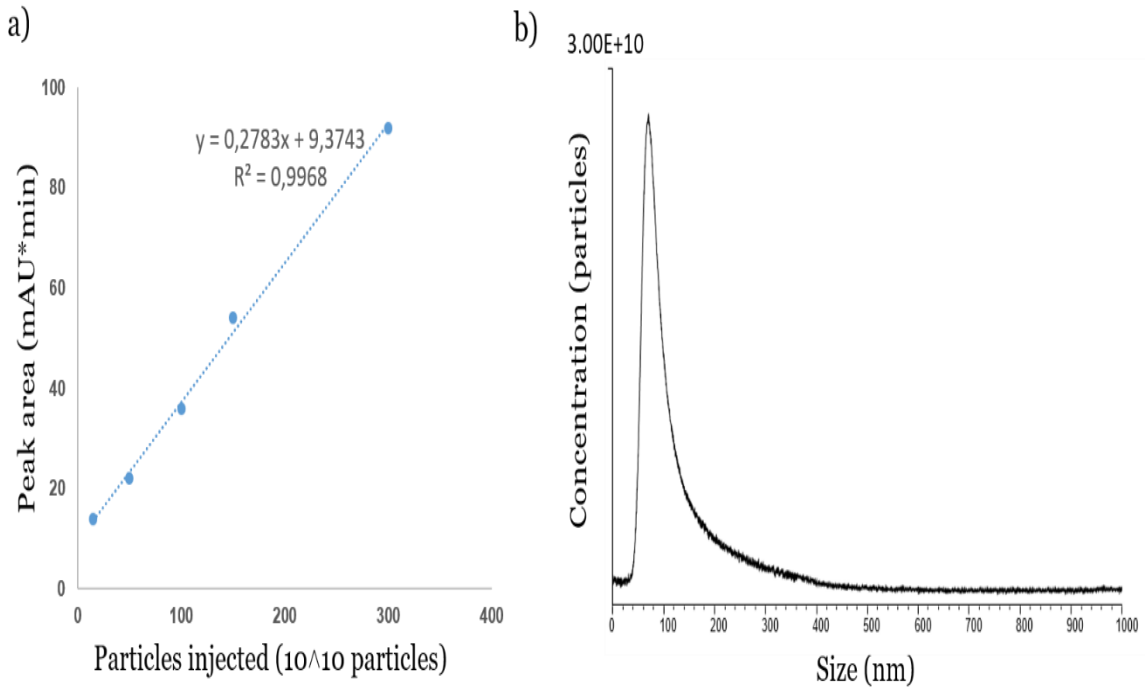
Süt numunesinden eksozomların ekstraksiyonu soğutmalı ultrasantrüfüj yöntemi ile gerçekleştirildi. İzole edilen eksozom numuneleri PBS tamponunda – 18 °C'de muhafaza edildi. Eksozomların karakterizasyonu, boyut, protein ve lipid içeriği ile yapılmaktadır.

Genellikle eksozomlar yüzey morfolojisi, vezikül boyutu ölçülmesi sureti ile tanımlanmaktadır. İzole edilmiş eksozomlar üzerinde partikül boyutu ve/veya konsantrasyonu hakkında fikir veren fiziksel analiz, nano partikül izleme analizi (NTA) kullanılır. Morfoloji temelli karakterizasyonda SEM yaygın kullanımı mevcuttur (Bruce et al., 2019).

Bu çalışma kapsamında eksozomların detaylı karakterizasyonunda nano-LC analizi, NTA ve SEM ile karşılaştırmalı analizleri yapıldı. Bunun yanında hazırladığımız monolitlerle beraber eksozom numunesi kullanılarak hazırlanan monolitlerin karşılaştırmalı FT-IR analizi yapılmıştır.

### 4.4.1. Eksozomların NTA Analizi

NTA, eksozomların konsantrasyonlarının ve boyut dağılımlarının karakterizasyonu ve sınıflandırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. NTA analizi ile bir karışımdaki partiküllerin mutlak boyut dağılımını ölçerek 50-1000 nm arasındaki polidispers vezikül örneklerini analiz ettiği bildirilmiştir (Van Der Pol et al., 2010; Wang L. et al., 2019). Bu nedenle eksozomların tanımlanması ve boyutlarının doğrulanması için ticari eksozom standart numunesinin NTA analizi yapıldı.

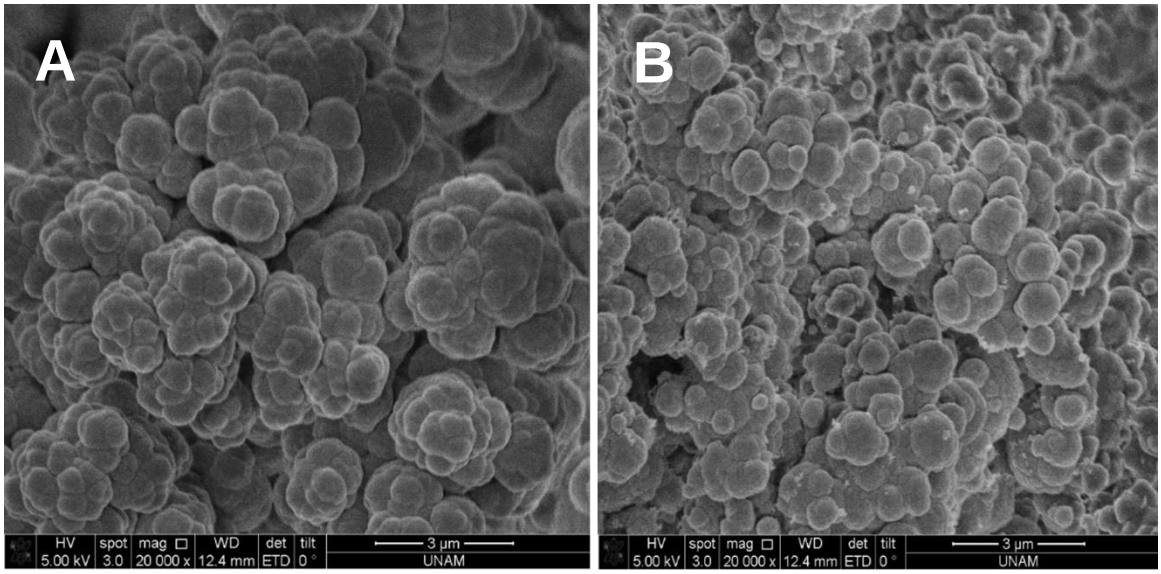



Şekil 4.6. Eksozom standart numunesine ait kalibrasyon eğrisi ve NTA ölçümü; a) 1 µl enjeksiyon hacmi ile 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan sığır sütünden türetilen ticari eksozom standardına ait kalibrasyon eğrisi; kolona enjekte edilen eksozom miktarı ile pik alanına karşılık bir eğri çizilir. b) Süt eksozom numunesine ait NTA ölçümü

5 farklı konsantrasyonda hazırlanan eksozom standardına ait kalibrasyon eğrisi ve ilgili enjeksiyon hacmi ve absorbans verimleri Şekil 4.6a'da verilmiştir. $R^2$ = 0,9968 elde edilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi eksozom konsantrasyonunun artmasıyla doğru orantılı olarak pik alanı artmıştır. NTA ayrıca partikül konsantrasyonunun ve boyutunun doğrudan analiz edilmesini sağlar. NTA ile yapılan analiz sonucuna göre Şekil 4.6b'de elde edilen konsantrasyona karşılık eksozom boyutunun dağılımı verilmiştir. NTA sonucuna göre, 100 nm'ye karşılık en yüksek tepe yüksekliği partiküllerin büyük kısmının 30-200 nm aralığında olduğu görülmüştür.

### 4.4.2. Eksozomların SEM Analizi

Eksozomların varlığını ve bütünlüğünü doğrulamak ve monolit yapı ile nasıl etkileşime girdiklerini araştırmak için boş kolon ve süt numunesi uygulanmış monolitlerin SEM görüntüleri alındı.

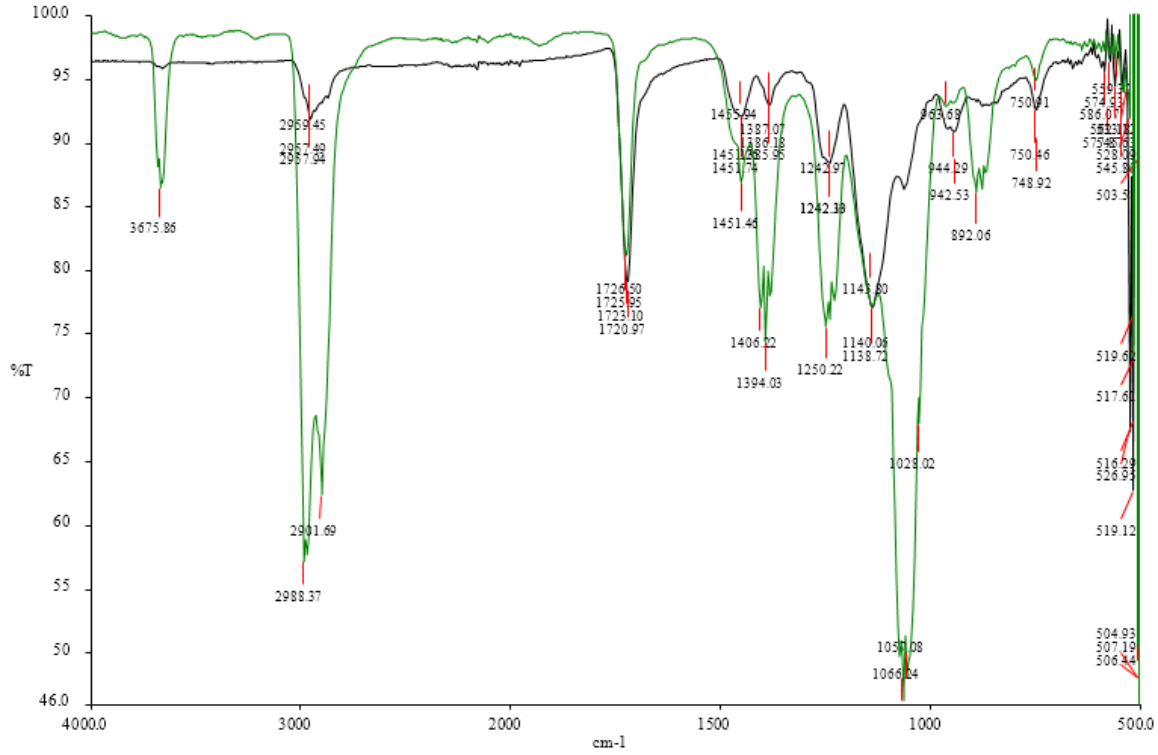



Şekil 4.7. Eksozom numunesi katılarak hazırlanan ve boş hazırlanan kolonların ×20 000 magnifikasyon ile elde edilen SEM görüntüleri; A) Boş monolitik kolonu (numune uygulanmamış) B) Ekstraksiyondan sonra süt numunesi uygulanmış monolit

Şekil 4.7A dan görüleceği üzere numune uygulanmamış kolon üzerinde 30-200 nm düzeylerinde herhangi nano yapı görünmemesine karşılık, süt numunesi uygulanan Şekil 4.7B de yaklaşık 100 nm boyutlu nano yapıların varlığı net olarak görülmektedir. Dolaysıyla eksozomların monolitik kolon yüzeyine etkin olarak tutunduğunu göstermektedir. Eksozomların kolon yüzeyine tutunması, SEM görüntüleme ile doğrulanmıştır. SEM görüntülerinde (Şekil 4.7B), izole edilen eksozomlar yaklaşık 30-150 nm çapında, bozulmamış yapısı ve karakteristik küre şeklindeki morfolojileri tespit edilmiştir.

### 4.4.3. FT-IR Analizi

FT-IR analizi için boş polimer monolit ve ekstrakte edilen eksozom numunesi ile hazırlanan polimer monolitler hazırlanmıştır. Bu monolitler 65 ℃'de 20 saat polimerizasyona bırakıldı. FT-IR ölçümleri yapılmak üzere elde edilen polimer monolit yapı kurutularak toz haline getirildi.



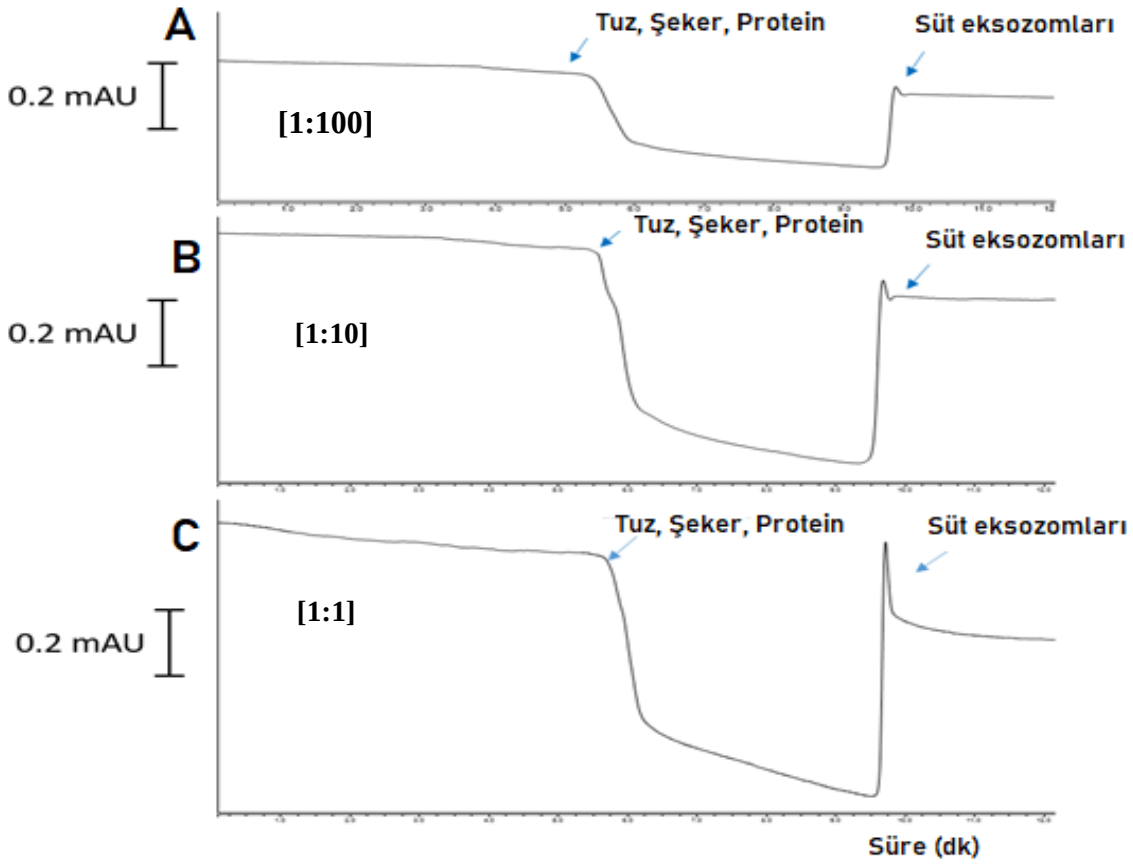

4.8. Monolitlerin FT-IR spektrumları, a) Eksozom ile hazırlanmış monolite ait yeşil bant b) Boş monolite ait siyah bant

Boş monolit ve ekstrakte edilen süt numunesi uygulanarak hazırlanan monolite ait FT-IR spektrumlara bakıldığında, boş monolitik kolon ve numune uygulanmış kolonun FT-IR bantları arasında önemli ölçüde kaymanın olduğu görülmektedir. Bu sonuç bize monolitik yapıda farklı eksozom gibi yapıların olduğunu göstermektedir.

### 4.4.4. Gradient Nano-LC ile poli(BMA-EDMA-MGONP) Monolitik Kolonu Kullanılarak Süt Numunesinden Eksozomların İzolasyonu ve Analizi

Süt numunesinden izole edilen eksozom yapılarını doğrulamak ve potansiyel olarak tespitini daha kolay gözlemlemek için, kromotografik analizi önemlidir. Literatürde eksozomların sıvı kromotografisi analizin üzerine yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur (Almughlliq et al., 2018; Bruce et al., 2019; Dufresne et al., 2018; Li M. et al., 2021; Wang L.et al., 2019; Zhu et al., 2021). Monolitik kolon bazlı nano-LC de eksozom analizine dair literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında yeni bir yaklaşım olarak yüksek hidrofobik yapıdaki MGONP bazlı monolitik nanokolonlar hazırlanmış ve süt numunesinden ekstrakte edilen eksozomların kromotografik

karakterizasyonunda kullanılmıştır. Literatür çalışmaları dikkate alınarak, 216 nm dalga boyu kullanılmıştır ve eksozomlar bu dalga boyunda absorbans vermektedir (Huang et al., 2019, 2020, 2021).




Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan eksozom numunesinin poli(BMA-EDMA-MGONP) monolit kolon (C6) ile kromotografik analizi. Analiz koşulları; 1 µL/dk akış hızı, 216 nm dalga boyu. Gradient koşulları (A:%100 $H_2O$ / B:% 80 ACN), 0-4 dk % 10 B, 4-16 dk % 90 B

Eksozom numuneleri bir UV-Vis dedektörüne bağlı ProFlow-nano-LC-UV sistemine enjekte edildi. Dedektörde 45 nL flow cell kullanılmıştır. İzole edilen eksozomlar sentezlenen 50 µm i.d. × 12 cm'lik poli(BMA-EDMA-MGONP) monolitik kolon ile 1 µL/dk akış hızı ve 216 nm dalga boyunda analiz edildi. İzolatların kromotografik karakterizasyonunda mobil faz olarak ACN/H2O tercih edildi. Analiz boyunca 0-4 dk %10 B, 4-16 dk %90 B (A: $H_2O$B: %80 ACN) gradient elüsyonu uygulandı. Numuneler 1:100 (Şekil 4.9A), 1:10 (Şekil 4.9B) ve 1:1 (Şekil 4.9C) oranında seyreltilerek kromotografik analizi yapıldı. Eksozomlara ait pikler 9-10 dk arasında elde edilirken eksozom dışındaki sütte bulunan şeker, tuz ve proteinler gibi kirleticiler geniş bir pik tabanı ile karakterize edildi.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış süt numunesinden izole edilen eksozom numunesinin kromotografik analizine ait kromotogramlar (Şekil 4.9), süt numunesinden eksozomların başarılı bir şekilde izole edildiği ve hazırladığımız poli(BMA-EDMA-MGONP) monolitik kolonda başarılı bir şekilde tutulduğu görülmektedir. Poli(BMA-EDMA-MGONP) monolit kolonu yapısındaki grafen oksitin katılmasıyla berbaber arttırılmış hidrofobik özelliği ile eksozomların yapı ile etkileşimini arttırmıştır. Kolonun yüksek yüzey alanı mobil faz içindeki numunenin sabit faz ile etkileşim şansını arttırır.

# 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son zamanlarda, yeni analitik tekniklerin gelişmesiyle birlikte, eksozomların işlevi, yapısı ve salınım stratejileri üzerine araştırmalar artmaktadır. Özellikle süt eksozomlarının izolasyonuna yönelik araştırmalar önem kazanmıştır. Eksozomlar gerek teşhis amaçlı kullanımı gerekse ilaç olarak, ayrıca yurt dışında eksozom üzerine 20'den fazla şirket kurulması ve endüsrtiyel uygulama alanları bağlamında önem arzetmektedir. Eksozomlar ayrıca gıdalarda besin değerini gösterebilen önemli veziküllerdir. Literatürde süt numunelerinde eksozomlar çalışılmıştır. İnek sütü çoklu üretim için ölçeklenebilir bir eksozom kaynağıdır. Ek olarak sütten izole edilen eksozomların biyouyumluluğu, süt eksozomlarını oldukça değerli kılmaktadır. Bununla birlikte, hammaddelerin karmaşıklığı nedeniyle saf vezikülleri inek sütünden izole etmek hala zordur. Eksozomların fiziksel koşullar altında çalışılmasındaki zorluklar, bu çalışma özelinde süt dahil olmak üzere çeşitli ortamlardan eksozom izolasyonu ve sonrasında karakterizasyonu için kullanılan protokollerin standardizasyonunda yoğunlaşmaktadır. Eksozomlar üzerine yapılan araştırmaların ve potansiyel uygulamalarının büyümeye devam etmesi için, daha düşük maliyetli, daha fazla zaman kazandıran eksozom izolasyon ve karakterizasyon yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında eksozomların izolasyonunda yeni yaklaşımla hidrofobik etkileşim sureti ile monolitik nano-LC kullanımı literatürde ilk olarak yapılmıştır. Eksozomların karakterizasyonunda faklı yöntemlerde kullanılmış ve nano-LC temelli çeşitli prosedürler ve teknolojik çözümler önerilmiştir. Nano-LC, 100 µm i.d ve altı i.d.'ye sahip nano kolonların kullanıldığı gelişmiş kromotografik tekniklerden biridir. Bu teknik daha düşük kimyasal tüketimi, daha yüksek hassasiyet, çözünürlük ve daha düşük akış hızı aralıkları gibi birçok avantaja sahiptir. Bu çalışmada, geniş yüzey alanın sahip MGONP ile poli(BMA-EDMA-MGONP) monolitik kolon başarıyla hazırlanmıştır ve hidrofobik nano-LC ile eksozomların ayrılması için sabit faz olarak kullanılmıştır. Kolon, alkilbenzen türevlerine karşı iyi bir tutma ve seçicilik sergilemiştir (Şekil 4.5). Eksozomların hızlı analizinin gerekli olduğu özel alanlar göz önüne alındığında, geliştirdiğimiz yüksek hidrofobik yapılı poli(BMA-EDMA-MGONP) monolitik kolonu ile eksozomların 9-10 dk gibi kısa bir sürede analiz edildiği görüldü. Bu tez çalışmasında SEM, FT-IR ve nano-LC kromotografik analizlerin sonuçları,

eksozomların sütten izolasyonunu doğrulamıştır. Bu prosedürlerin eş zamanlı uygulanması ve izolasyon prosedürlerinin standardizasyonu başarılı tanımlama için oldukça önemlidir. Elde edilen sonuçlar özellikle küçük ve büyük moleküllerin nano-LC analizi için umut verici olması tez sonuçlarının çıktısını genişletmektedir. Bu çalışmada eksozomların nano-LC de monolitik nano kolonlarla kısa sürede, hassas ve doğru analiz edilmesini sağlayan, küçük hacimlerde numune gerektiren birçok alan için değerli olacak bir bakış açısı getirmiş ve literature önemli katkı yapılmıştır. İlerleyen çalışmalar da kullanılan prosedürler geliştirilerek eksozomlar gibi yapıların kapsamlı nano-LC analizlerinin yapılabilmesi öngörülmektedir.

# KAYNAKLAR

Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P. A., Scheynius, A. and Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *The Journal of Immunology*, *179*(3), 1969 1978. https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969.

Akao, Y., Iio, A., Itoh, T., Noguchi, S., Itoh, Y., Ohtsuki, Y. and Naoe, T. (2011). Microvesicle-mediated RNA Molecule Delivery System Using Monocytes/Macrophages. *Molecular Therapy*, *19*(2), 395–399. https://doi.org/10.1038/mt.2010.254.

Akuma, P., Okagu, O. D. and Udenigwe, C. C. (2019). Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *3*, 23. https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00023.

Almughlliq, F. B., Koh, Y. Q., Peiris, H. N., Vaswani, K., McDougall, S., Graham, E. M., Burke, C. R., Arachchige, B. J., Reed, S. and Mitchell, M. D. (2018). Proteomic content of circulating exosomes in dairy cows with or without uterine infection. *Theriogenology*, *114*, 173–179. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.03.024.

Altgelt, K. H., and Gouw, T. H. (1979). Chromatography in petroleum analysis.

Arrua, R. D., Causon, T. J. and Hilder, E. F. (2012). Recent developments and future possibilities for polymer monoliths in separation science. *The Analyst*, *137*(22), 5179. https://doi.org/10.1039/c2an35804b.

Asensio-Ramos, M., D'Orazio, G., Hernandez-Borges, J., Rocco, A. and Fanali, S. (2011). Multi-walled carbon nanotubes–dispersive solid-phase extraction combined with nano-liquid chromatography for the analysis of pesticides in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*(4), 1113–1123. https://doi.org/10.1007/s00216-011-4885-7.

Asensio-Ramos, M., Fanali, C., D'Orazio, G. and Fanali, S. (2017). Nano-liquid chromatography. In *Liquid Chromatography*, p. 637–695. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00027-0.

Aslan, H., Günyel, Z., Sarıkaya, T., Golgiyaz, S. and Aydoğan, C. (2022). Determination of the geographic origin of 52 honey samples based on the assessment of anionic content profiling with a new algorithm using monolithic column-based micellar nano-liquid chromatography. *Journal of Food Science*, *87*(10), 4636–4648. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16310.

Aydoğan, C. (2016). Boronic acid-fumed silica nanoparticles incorporated large surface area monoliths for protein separation by nano-liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9968-z.

Aydoğan, C. (2019). Nanoscale separations based on LC and CE for food analysis: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *121*, 115693. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115693.

Aydoğan, C., Aslan, H., Günyel, Z., Demir, N., Erdoğan, İ. Y., Alharthi, S. and El Rassi, Z. (2021). Graphene oxide-octadecylsilane incorporated monolithic nano-columns with 50 μm id and 100 μm id for small molecule and protein separation by nano-liquid chromatography. *Electrophoresis*, *42*(24), 2637–2646. https://doi.org/10.1002/elps.202100050.

Aydoğan, C., Karakoç, V. and Denizli, A. (2015). Chiral ligand-exchange separation and determination of malic acid enantiomers in apple juice by open-tubular capillary electrochromatography. *Food Chemistry*, *187*, 130–134. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.062.

Baddela, V. S., Nayan, V., Rani, P., Onteru, S. K. and Singh, D. (2016). Physicochemical Biomolecular Insights into Buffalo Milk-Derived Nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *178*(3), 544–557. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1893-7.

Baier, S. R., Nguyen, C., Xie, F., Wood, J. R. and Zempleni, J. (2014). MicroRNAs Are Absorbed in Biologically Meaningful Amounts from Nutritionally Relevant Doses of Cow Milk and Affect Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells, HEK-293 Kidney Cell Cultures, and Mouse Livers. *The Journal of Nutrition*, *144*(10), 1495–1500. https://doi.org/10.3945/jn.114.196436.

Ballard, O. and Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition. *Pediatric Clinics of North America*, *60*(1), 49–74. https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002.

Bankar, N., Kandisa, R. V. And Chekuri, D. K. (2022). *Isolation, Purification, Characterization and Drug Loading Techniques of Exosomes: A Review*. *1*(1), 10.

Bedair, M. and El Rassi, Z. (2005). Affinity chromatography with monolithic capillary columns. *Journal of Chromatography A*, *1079*(1–2), 236–245. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.084.

Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G. and Théry, C. (2011). Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic*, *12*(12), 1659–1668. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x.

Boehmer, J. L. (2011). Proteomic Analyses of Host and Pathogen Responses during Bovine Mastitis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *16*(4), 323–338. https://doi.org/10.1007/s10911-011-9229-x.

Bruce, T. F., Slonecki, T. J., Wang, L., Huang, S., Powell, R. R. and Marcus, R. K. (2019). Exosome isolation and purification via hydrophobic interaction chromatography using a polyester, capillary-channeled polymer fiber phase. *Electrophoresis*, *40*(4), 571–581. https://doi.org/10.1002/elps.201800417.

Cabrera, K., Lubda, D., Eggenweiler, H.-M., Minakuchi, H.and Nakanishi, K. (2000). A New Monolithic-Type HPLC Column For Fast Separations. *Journal of High Resolution Chromatography*, *23*(1), 93–99. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(20000101)23:1<93: AID-JHRC93>3.0.CO;2-2.

Chen, D., Feng, H. and Li, J. (2012). Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications. *Chemical Reviews*, *112*(11), 6027–6053. https://doi.org/10.1021/cr300115g.

Chervet, J. P., Ursem, M. and Salzmann, J. P. (1996). Instrumental Requirements for Nanoscale Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, *68*(9), 1507–1512. https://doi.org/10.1021/ac9508964.

Collins, D. A., Nesterenko, E. P., Brabazon, D., and Paull, B. (2012). Controlled Ultraviolet (UV) Photoinitiated Fabrication of Monolithic Porous Layer Open Tubular (monoPLOT) Capillary Columns for Chromatographic Applications. *Analytical Chemistry*, *84*(7), 3465–3472. https://doi.org/10.1021/ac203432p.

Cvjetkovic, A., Lötvall, J. and Lässer, C. (2014). The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*(1), 23111. https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111.

Deterding, L. J., Moseley, M. A., Tomer, K. B. and Jorgenson, J. W. (1991). Nanoscale separations combined with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *554*(1–2), 73–82. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88438-7.

Dong, M. W. (2019). *HPLC and UHPLC for practicing scientists* (Second ed). Wiley.
Dufresne, J., Florentinus-Mefailoski, A., Bowden, P. and Marshall, J. G. (2018). A method for the extraction of the endogenous tryptic peptides (peptidome) from human EDTA plasma. *Analytical Biochemistry*, *549*, 188–196. https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.02.025.

El Rassi, Z. and Horváth, C. (1986). Tandem columns and mixed-bed columns in high-performance liquid chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*, *359*, 255–264. https://doi.org/10.1016/0021-9673(86)80079-6.

Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., André, F., Caby, M. P., Novault, S., Flament, C., Leboulaire, C., Borg, C., Amigorena, S., Boccaccio, C., Bonnerot, C., Dhellin, O., Movassagh, M., Piperno, S., Robert, C., Serra, V., Valente, N., Le Pecq, J.-B., Zitvogel, L. (2005). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: Results of thefirst phase I clinical trial. *Journal of Translational Medicine*, *3*(1), 10. https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-10.

Ettre, L. S. (1971). Development of chromatography. *Analytical Chemistry*, *43*(14), 20A –31a. https://doi.org/10.1021/ac60308a022.

Fanali, S. (2017). Nano-liquid chromatography applied to enantiomers separation. *Journal of Chromatography A*, *1486*, 20–34. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.028.

Fanali, S., Camera, E., Chankvetadze, B., D'Orazio, G. and Quaglia, M. G. (2004).Separation of tocopherols by nano-liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *35*(2), 331–337.https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00646-0.

Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. and Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, *87*(6), 1641–1674. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6.

Gandham, S., Su, X., Wood, J., Nocera, A. L., Alli, S. C., Milane, L., Zimmerman, A., Amiji, M. and Ivanov, A. R. (2020). Technologies and Standardization in Research on Extracellular Vesicles. *Trends in Biotechnology*, *38*(10), 1066–1098. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.05.012.

Gao, W. (Ed.). (2015). Graphene Oxide. *Springer International Publishing*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15500-5.

Golay, M. J. E. (1958). *Gas chromatography*, p. 36–55.

Groenen, M. A. M. and van der Poel, J. J. (1994). Regulation of expression of milk protein genes: A review. *Livestock Production Science*, *38*(2), 61–78. https://doi.org/10.1016/0301-6226(94)90051-5.

Gu, Y., Li, M., Wang, T., Liang, Y., Zhong, Z., Wang, X., Zhou, Q., Chen, L., Lang, Q., He, Z., Chen, X., Gong, J., Gao, X., Li, X. and Lv, X. (2012). Lactation-Related MicroRNA Expression Profiles of Porcine Breast Milk Exosomes. *PLoS ONE*, *7*(8), e43691. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043691.

Günyel, Z., Aslan, H., Demir, N. and Aydoğan, C. (2021). Nano-liquid chromatography with a new nano-structured monolithic nanocolumn for proteomics analysis. *Journal of Separation Science*, *44*(21), 3996–4004. https://doi.org/10.1002/jssc.202100454.

Gusev, I., Huang, X. and Horváth, C. (1999). Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, *855*(1), 273–290. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00697-4.

Hansen, M. S., Gregersen, S. B. and Rasmussen, J. T. (2022). Bovine milk processing impacts characteristics of extracellular vesicle isolates obtained by size-exclusion chromatography. *International Dairy Journal*, *127*, 105212. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105212.

Harding, C., Heuser, J. and Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *Journal of Cell Biology*, *97*(2), 329–339. https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329.

Hata, T., Murakami, K., Nakatani, H., Yamamoto, Y., Matsuda, T. and Aoki, N. (2010). Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *396*(2), 528–533. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.135.

Hong, T., Yang, X., Xu, Y. and Ji, Y. (2016). Recent advances in the preparation and application of monolithic capillary columns in separation science. *Analytica Chimica Acta*, *931*, 1–24. https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.013.

Horvath, C. G., Preiss, B. A. and Lipsky, S. R. (1967). Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Analytical Chemistry*, *39*(12), 1422–1428. https://doi.org/10.1021/ac60256a003.

Huang, S., Wang, L., Bruce, T. F., and Marcus, R. K. (2019). Isolation and quantification of human urinary exosomes by hydrophobic interaction chromatography on a polyester capillary-channeled polymer fiber stationary phase. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *411*, 6591-6601.

Huang, S., Wang, L., Bruce, T. F. and Marcus, R. K. (2020). Evaluation of exosome loading characteristics in their purification via a glycerol-assisted hydrophobic interaction chromatography method on a polyester, capillary-channeled polymer fiber phase. *Biotechnology Progress*, *36*(5), e2998.

Huang, S., Ji, X., Jackson, K. K., Lubman, D. M., Ard, M. B., Bruce, T. F., and Marcus, R. K. (2021). Rapid separation of blood plasma exosomes from low-density lipoproteins

via a hydrophobic interaction chromatography method on a polyester capillary-channeled polymer fiber phase. *Analytica chimica acta*, *1167*, 338578.
Hummers, W. S. and Offeman, R. E. (1958). Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, *80*(6), 1339–1339. https://doi.org/10.1021/ja01539a017.

Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T. and Takase, M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of Dairy Science*, *95*(9), 4831–4841. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5489.

Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, *262*(19), 9412–9420. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48095-7.

Karlsson, K. Erik. and Novotny, Milos. (1988). Separation efficiency of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with very small inner diameters. *Analytical Chemistry*, *60*(17), 1662–1665. https://doi.org/10.1021/ac00168a006.

Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L. and Mathivanan, S. (2016). ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *Journal of Molecular Biology*, *428*(4), 688–692. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.019.

Knob, R., Kulsing, C., Boysen, R. I., Macka, M. and Hearn, M. T. W. (2015). Surface-area expansion with monolithic open tubular columns. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *67*, 16–25. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.004.

Ladisch, M. and Zhang, L. (2016). Fiber-based monolithic columns for liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(25), 6871–6883. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9839-7.

Le, A., Barton, L. D., Sanders, J. T. and Zhang, Q. (2011). Exploration of Bovine Milk Proteome in Colostral and Mature Whey Using an Ion-Exchange Approach. *Journal of Proteome Research*, *10*(2), 692–704. https://doi.org/10.1021/pr100884z.

Li, M., Zheng, K., Song, W., Yu, H., Zhang, X., Yue, X. and Li, Q. (2021). Quantitative analysis of differentially expressed milk fat globule membrane proteins between donkey and bovine colostrum based on high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry proteomics. *Journal of Dairy Science*, *104*(12), 12207–12215. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20471.

Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. and Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, *7*(3), 789–804. https://doi.org/10.7150/thno.18133.

Liu, K., Aggarwal, P., Lawson, J. S., Tolley, H. D. and Lee, M. L. (2013). Organic monoliths for high-performance reversed-phase liquid chromatography: Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science*, *36*(17), 2767–2781. https://doi.org/10.1002/jssc.201300431.

Liu, Y., Wang, W., Jia, M., Liu, R., Liu, Q., Xiao, H., Li, J., Xue, Y., Wang, Y. and Yan, C. (2018). Recent advances in microscale separation. *Electrophoresis*, *39*(1), 8–33. https://doi.org/10.1002/elps.201700271.

Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V. and Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports*, *5*(1), 17319. https://doi.org/10.1038/srep17319.

Lobb, R. J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C. S. F., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A. and Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1), 27031. https://doi.org/10.3402/jev.v4.27031.

Lynch, K. B., Ren, J., Beckner, M. A., He, C. and Liu, S. (2019). Monolith columns for liquid chromatographic separations of intact proteins: A review of recent advances and applications. *Analytica Chimica Acta*, *1046*, 48–68. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.021.

Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E. and Simpson, R. J. (2012). ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D1241–D1244. https://doi.org/10.1093/nar/gkr828.

Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, *73*(10), 1907–1920. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006.

Mould, D. L. and Synge, R. L. M. (1952). Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large molecules. *The Analyst*, *77*(921), 964. https://doi.org/10.1039/an9527700964.

Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J. and Gupta, R. C. (2016). Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Letters*, *371*(1), 48–61. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.020.

Munir, J., Lee, M. and Ryu, S. (2020). Exosomes in Food: Health Benefits and Clinical Relevance in Diseases. *Advances in Nutrition*, *11*(3), 687–696. https://doi.org/10.1093/advances/nmz123.

Neal, A. C. (1995). Chapter 12 HPLC and column liquid chromatography. In *Journal of Chromatography Library*, *56*, 347–374. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)61291-9.

Nie, F.-Q., Macka, M., Barron, L., Connolly, D., Kent, N. and Paull, B. (2007). Robust monolithic silica-based on-chip electro-osmotic micro-pump. *The Analyst*, *132*(5), 417. https://doi.org/10.1039/b618386g.

Nischang, I. (2013). Porous polymer monoliths: Morphology, porous properties, polymer nanoscale gel structure and their impact on chromatographic performance. *Journal of Chromatography A, 1287*, 39–58. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.016.

Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V. and Firsov, A. A. (2004). Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science, 306*(5696), 666–669. https://doi.org/10.1126/science.1102896.

Novotny, M. V. (1996). Microcolumn liquid chromatography in biochemical analysis. In *Methods in Enzymology 270*, 101–133. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)70007-1.

Okanda, F. M. and El Rassi, Z. (2007). Biospecific interaction (affinity) CEC and affinity nano-LC. *Electrophoresis, 28*(1–2),89–98. https://doi.org/10.1002/elps.200600595.

Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. and Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, *101*(3), 942–948. https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942.

Pan, B.-T. and Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*, *33*(3), 967–978. https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5.

Qu, Q., Gu, C. and Hu, X. (2012). Capillary Coated with Graphene and Graphene Oxide Sheets as Stationary Phase for Capillary Electrochromatography and Capillary Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, *84*(20), 8880–8890. https://doi.org/10.1021/ac3023636.

Quan, S., Nan, X., Wang, K., Jiang, L., Yao, J. and Xiong, B. (2020). Characterization of Sheep Milk Extracellular Vesicle-miRNA by Sequencing and Comparison with Cow Milk. *Animals, 10*(2), 331. https://doi.org/10.3390/ani10020331.

Rahman, Md. M., Shimizu, K., Yamauchi, M., Takase, H., Ugawa, S., Okada, A. and Inoshima, Y. (2019). Acidification effects on isolation of extracellular vesicles from bovine milk. *PLOS ONE*, *14*(9),e0222613. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222613.

Raimondo, F., Morosi, L., Chinello, C., Magni, F. and Pitto, M. (2011). Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomic*, *11*(4), 709–720. https://doi.org/10.1002/pmic.201000422.

Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M. A., De Leo, G. and Alessandro, R. (2015). *Citrus limon* -derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, *6*(23), 19514–19527. https://doi.org/10.18632/oncotarget.4004.

Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, *183*(3), 1161–1172. https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161.

Rassi, Z. E. and Horváth, C. (1986). Hydrophobic Interaction Chromatography of t-RNA's and Proteins. *Journal of Liquid Chromatography*, *9*(15), 3245–3268. https://doi.org/10.1080/01483918608074181.

Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., Nonnecke, B. J. and Sacco, R. E. (2012). Bovine milk exosome proteome. *Journal of Proteomics*, *75*(5), 1486–1492. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.017.

Samuel, M., Chisanga, D., Liem, M., Keerthikumar, S., Anand, S., Ang, C.-S., Adda, C. G., Versteegen, E., Jois, M. and Mathivanan, S. (2017). Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Scientific Reports*, *7*(1), 5933. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06288-8.

Saunders, K. C., Ghanem, A., Boon Hon, W., Hilder, E. F. and Haddad, P. R. (2009). Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases: A review. *Analytica Chimica Acta*, *652*(1–2), 22–31. https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.043.

Šesták, J., Moravcová, D. and Kahle, V. (2015). Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1421*, 2–17. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.090.

Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L. and Mathivanan, S. (2009). Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Review of Proteomics*, *6*(3), 267–283. https://doi.org/10.1586/epr.09.17.

Snyder, L. R. and Kirkland, J. J. (1979). *Introduction to modern liquid chromatography* (2d ed). Wiley.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J. and Dolan, J. W. (2009). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/9780470508183.

Somiya, M., Yoshioka, Y. and Ochiya, T. (2018). Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*(1), 1440132. https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1440132.

Stassen, C., Desmet, G., Broeckhoven, K., Van Lokeren, L. and Eeltink, S. (2014). Characterization of polymer monolithic columns for small-molecule separations using total-pore-blocking conditions. *Journal of Chromatography A*, *1325*, 115–120. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.004.

Stremersch, S., De Smedt, S. C. and Raemdonck, K. (2016). Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles. *Journal of Controlled Release*, *244*, 167–183. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.054.

Svec, F. (2004). Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *Journal of Separation Science*, *27*(10–11), 747–766. https://doi.org/10.1002/jssc.200401721.

Svec, F. and Frechet, J. M. J. (1995). Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers. *Macromolecules*, *28*(22), 7580–7582. https://doi.org/10.1021/ma00126a044.

Svec, Frantisek. and Frechet, J. M. J. (1992). Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry*, *64*(7), 820–822. https://doi.org/10.1021/ac00031a022.

Takeuchi, T. and Ishii, D. (n.d.). *Liquid Chromatography*. 8.

Talebi, M., Nordborg, A., Gaspar, A., Lacher, N. A., Wang, Q., He, X. Z., Haddad, P. R. and Hilder, E. F. (2013). Charge heterogeneity profiling of monoclonal antibodies using low ionic strength ion-exchange chromatography and well-controlled pH gradients on monolithic columns. *Journal of Chromatography A*, *1317*, 148–154. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.061.

Tauro, Y. J. (n.d.). İzolasyon ve eksozomların karakterizasyonu. 180.

Théry, C. (2011). Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biology Reports*, *3*. https://doi.org/10.3410/B3-15.

Théry, C., Ostrowski, M. and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *9*(8), 581–593. https://doi.org/10.1038/nri2567.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. and Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, *9*(6), 654–659. https://doi.org/10.1038/ncb1596.

Van Der Pol, E., Hoekstra, A. G., Sturk, A., Otto, C., Van Leeuwen, T. G. and Nieuwland, R. (2010). Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes: Detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *8*(12), 2596–2607. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x.

Vasconcelos Soares Maciel, E., de Toffoli, A. L., Sobieski, E., Domingues Nazário, C. E. and Lanças, F. M. (2020). Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review. In *Analytica Chimica Acta*. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.064.

Vaswani, K., Mitchell, M. D., Holland, O. J., Qin Koh, Y., Hill, R. J., Harb, T., Davies, P. S. W. and Peiris, H. (2019). A Method for the Isolation of Exosomes from Human and Bovine Milk. *Journal of Nutrition and Metabolism*, *2019*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2019/5764740.

Vissers, J. P. C., Claessens, H. A. and Cramers, C. A. (1997). Microcolumn liquid chromatography: Instrumentation, detection and applications. *Journal of Chromatography A*, *779*(1–2), 1–28. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00422-6.

Vitha, M. F. (2016). *Chromatography Principles and Instrumentation*, *1*(185). John Wiley & Sons, Inc.

Wang, B., Zhuang, X., Deng, Z.-B., Jiang, H., Mu, J., Wang, Q., Xiang, X., Guo, H., Zhang, L., Dryden, G., Yan, J., Miller, D. and Zhang, H.-G. (2014). Targeted Drug Delivery to Intestinal Macrophages by Bioactive Nanovesicles Released from Grapefruit. *Molecular Therapy*, *22*(3), 522–534. https://doi.org/10.1038/mt.2013.190.

Wang, L., Bruce, T. F., Huang, S. and Marcus, R. K. (2019). Isolation and quantitation of exosomes isolated from human plasma via hydrophobic interaction chromatography using a polyester, capillary-channeled polymer fiber phase. *Analytica Chimica Acta*, *1082*, 186–193. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.035.

Wang, M.-M. and Yan, X.-P. (2012). Fabrication of Graphene Oxide Nanosheets Incorporated Monolithic Column via One-Step Room Temperature Polymerization for Capillary Electrochromatography. *Analytical Chemistry*, *84*(1), 39–44. https://doi.org/10.1021/ac202860a.

Wang, X., Guo, J., Yu, P., Guo, L., Mao, X., Wang, J., Miao, S. and Sun, J. (2021). The roles of extracellular vesicles in the development, microenvironment, anticancer drug

resistance, and therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *40*(1), 35. https://doi.org/10.1186/s13046-021-01840-x.

Welch, C. J., Wu, N., Biba, M., Hartman, R., Brkovic, T., Gong, X., Helmy, R., Schafer, W., Cuff, J. and Pirzada, Z. (2010). Greening analytical chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *29*(7), 667–680. https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.008.

Wilson, S. R., Olsen, C. and Lundanes, E. (2019). Nano liquid chromatography columns. *The Analyst*, *144*(24), 7090–7104. https://doi.org/10.1039/C9AN01473J.

Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T. and Ishiguro, N. (2012). Comparison of Methods for Isolating Exosomes from Bovine Milk. *Journal of Veterinary Medical Science*, *74*(11), 1523–1525. https://doi.org/10.1292/jvms.12-0032.

Yamauchi, M., Shimizu, K., Rahman, M., Ishikawa, H., Takase, H., Ugawa, S., Okada, A. and Inoshima, Y. (2019). Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *45*(3), 359–364. https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1539743.

Yang, H., Li, F., Shan, C., Han, D., Zhang, Q., Niu, L. and Ivaska, A. (2009). Covalent functionalization of chemically converted graphene sheets via silane and its reinforcement. *Journal of Materials Chemistry*, *19*(26), 4632. https://doi.org/10.1039/b901421g.

Yi, L., Piehowski, P. D., Shi, T., Smith, R. D. and Qian, W. J. (2017). Advances in microscale separations towards nanoproteomics applications. In *Journal of Chromatography A*. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.055.

Zajickova, Z. (2017). Advances in the development and applications of organic–silica hybrid monoliths. *Journal of Separation Science*, *40*(1), 25–48. https://doi.org/10.1002/jssc.201600774.

Žampachová, L., Aturki, Z., Mariani, F. and Bednář, P. (2021). A Rapid Nano-Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Cannabinoids in Cannabis sativa L. Extracts. *Molecules*, *26*(7), 1825. https://doi.org/10.3390/molecules26071825.

Zempleni, J., Aguilar-Lozano, A., Sadri, M., Sukreet, S., Manca, S., Wu, D., Zhou, F. and Mutai, E. (2017). Biological Activities of Extracellular Vesicles and Their Cargos from Bovine and Human Milk in Humans and Implications for Infants. *The Journal of Nutrition*, *147*(1), 3–10. https://doi.org/10.3945/jn.116.238949.

Zhang, H., Ou, J., Wei, Y., Wang, H., Liu, Z. and Zou, H. (2016). A hybrid fluorous monolithic capillary column with integrated nanoelectrospray ionization emitter for

determination of perfluoroalkyl acids by nano-liquid chromatography–nanoelectrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1440*, 66–73. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.025.

Zhu, J., Zhang, J., Ji, X., Tan, Z. and Lubman, D. M. (2021). Column-based Technology for CD9-HPLC Immunoaffinity Isolation of Serum Extracellular Vesicles. *Journal of Proteome Research, 20*(10), 4901–4911. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00549.