

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERİSİTLERİN FARKLILAŞMA KAPASİTELERİNİN  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERLE KARŞILAŞTIRILMALI  
OLARAK İNCELENMESİ**

**Selen POLAT**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

**BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır.

**KOCAELİ**

**2018**



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERİSİTLERİN FARKLILAŞMA KAPASİTELERİNİN  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERLE KARŞILAŞTIRMALI  
OLARAK İNCELENMESİ**

**Selen POLAT**

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

**BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Yusufhan YAZIR

T.C.  
Kocaeli Üniversitesi

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Belge No: KÜ GOKAEK  
2017/179

**KOCAELİ**

**2018**

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

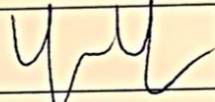
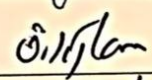
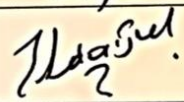
Tez Adı: Perisitlerin Farklılaşma Kapasitelerinin Mezenkimal Kök Hücrelerle Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi

Tez Yazarı: Selen POLAT

Tez savunma tarihi: 05.06.2018

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yusufhan YAZIR

İş bu çalışmada jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Jüri Üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	Doç. Dr. Yusufhan YAZIR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Özlem Sağlam UÇAR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Seda HALBUTOĞULLARI	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... / .... / 2018

Prof.Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

**Amaç:** Kök hücreler günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin farklı dokulara farklılaşma kapasiteleri ve kendilerini yenileme özellikleri rejeneratif tıpta kullanılmasında iki önemli yapıtaşını oluşturmaktadır. Fakat mezenkimal kök hücrelerin insan vücudunda çok fazla sayıda bulunmaması ve her dokudan elde edilen kök hücrenin istenilen doku tipine farklılaştırılmaması yeni kaynakların araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu yüzden kan damarlarının çevresinde bulunan özelleşmiş hücre topluluklarından biri olan perisitlerin bu çalışmada alternatif bir kaynak olabilir mi sorusuna yanıt aranmaktadır. Böylece mezenkimal kök hücrelerin sınırlı kaldığı alanlarda damar çevresinde bulunan bu hücrelerin kullanılabilmesinin önü açılacaktır.

**Yöntem:** Perisitler plasentadan izole edilmiş ve pasaj 3'te karakterize edilmiştir. Kemik iliği mezenkimal kök hücreler ise KÖGEM'de bulunan hücre hatlarından kullanılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin de karakterizasyonu pasaj 3'te gerçekleştirilmiştir. Bu iki hücrenin pluripotensi kapasiteleri gen ekspresyon analiziyle karşılaştırılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise hücreler osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaya alınmıştır. Hücreler 7, 14., ve 21. günlerde gözlemlenerek hem gen ekspresyonu açısından hem de immunohistokimyasal yöntemlerle farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Plasental perisitlerin ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin pluripotensi özelliklerinin karşılaştırılması sonucunda pluripotensi genleri olan Lin28, ZPF42, FoxD3, UTF1 ve Sox2' de anlamlı bir yükeliş meydana gelmiştir. GATA6, Nr6a1, Msx1 ve Pdx1 genlerinde ise her iki hücre tipinde de anlamlı bir üretim gözlemlenmemiştir. Ayrıca perisitlerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma gösterdikleri gözlemlenmiştir. Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerde de olduğu gibi osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaya gidebildikleri gözlemlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışma sonucunda perisitlerin de mezenkimal kök hücreler gibi farklılaşma kapasitelerinin yüksek olduğu ayrıca çoğalma kapasitelerinin yüksek olması sonucunda mezenkimal kök hücreler gibi rejeneratif tıpta ve doku mühendisliğindeki birçok çalışmada kullanılabilceği gösterilmiştir. Böylece mezenkimal kök hücrelerin yetersiz kaldığı alanlarda ve çalışmalarda perisit alternatif bir hücre kaynağı olarak kullanılabilir.

**Anahtar sözcükler:** Plasental Perisitler, iKİ-MKH, Pluripotensi, Farklılaşma



## ABSTRACT

**Objective:** Stem cells are currently used in the treatment of many diseases. The differentiation capacities of the mesenchymal stem cells to different tissues and their renewal properties constitute two important building blocks in the use of regenerative epithelium. However, the fact that mesenchymal stem cells are not found in the human body in large numbers and the fact that the root cell from each tissue can not be differentiated to the desired tissue type has necessitated the search for new sources. Therefore, the question is whether pericytes, one of the specialized cell circles around the blood vessels, can be an alternative source in this study. Thus, in areas where mesenchymal stem cells are limited, these cells in the vicinity of the vessel may be used.

**Method:** Pericytes were isolated from placenta and passage 3 was characterized. Bone marrow mesenchymal stem cells were used from the cell line found in KÖGEM. Characterization of mesenchymal stem cells was carried out in passage 3. The pluripotency capacities of these two cells were compared by gene expression analysis. In the second phase of the study, cells were differentiated into osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. Cells were observed at days 7, 14, and 21, and the differentiation capacities for both gene expression and immunohistochemical methods were compared.

**Result:** Comparison of the pluripotency properties of placental pericytes and bone marrow mesenchymal stem cells resulted in a significant increase in the pluripotency genes Lin28, ZPF42, FoxD3, UTF1 and Sox2. In GATA6, Nr6a1, Msx1 and Pdx1 genes, no significant production was observed in both cell types. It has also been observed that pericytes show osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. It has been observed that osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation can occur as well as in bone marrow mesenchymal stem cells.

**Conclusion:** As a result of this study, it has been shown that pericytes have high differentiation capacities, such as mesenchymal stem cells, and that their reproductive capacity is high, which can be used in many studies in regenerative tissue and tissue engineering, such as mesenchymal stem cells. Thus, pericytes can be used as an alternative cell source in areas where mesenchymal stem cells are insufficient and in studies.

**Key words:** Placental Pericytes, hBM-MSC, Pluripotency, Differentiation





## TEŞEKKÜR

Tez alıőmamda bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan, yol gösteren değerli danıőmanım Kk Hücre AD baőkanı Do. Dr. Yusufhan YAZIR'a teőekkr ederim.

Eęitim sürecimde ve çalıőmalarımda derin bilgileriyle her konuda yardımcı olan sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU, Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR ve Dr. Öğr. Üyesi Z. Seda HALBUTOğULLARI'na sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Eęitim hayatım boyunca maddi, manevi desteğiyle her zaman yanımda olan **CANIM AİLEM'e**; mutlu ve sıkıntılı her anımda yanımda olarak beni destekleyen sevgili eőim **Caner POLAT**'a teşekkür eder ve sevgilerimi sunarım.

## TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

..... / ..... / 2018

Selen POLAT

İmza

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	x
TEŞEKKÜR.....	xii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ .....	xiii
İÇİNDEKİLER .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ .....	1
1.1.Perisitler .....	1
1.1.1. PDGF-B/PDGFR $\beta$ Yolağı.....	3
1.1.2. TGF- $\beta$ .....	4
1.1.3. Angiopietin-Tie2 .....	5
a) <i>Vasküler greftler</i> .....	6
b) <i>İskelet ve Kardiyak Kas Greftleri</i> .....	6
c) <i>Kemik Yenilenmesi</i> .....	6
d) <i>Deri Yenilenmesi</i> .....	7
1.2 Kök Hücreler .....	7
2. AMAÇ.....	9
3. YÖNTEM.....	10
3.1.Perisit izolasyonu .....	10
3.2.Mezenkimal Kök Hücre Kültürü.....	11
3.3.Perisit karakterizasyonu .....	11
3.3.1. Akış sitometri ile karakterizasyon.....	11
3.3.2. İmmünfloresan boyama ile karakterisasyon.....	12
3.4.Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu.....	12
3.4.1. Akış Sitometrisi ile Karakterizasyon.....	13
3.4.2 İmmünfloresan boyama ile karakterisasyon.....	13
3.4.3. Deney Gruplarının Oluşturulması .....	14
3.5.Perisitlerin ve iKİ-MKH'lerin <i>In-vitro</i> Osteojenik Farklılaştırılması.....	14
3.6.Perisitlerin ve iKİ-MKH'lerin <i>In-vitro</i> Adipojenik Farklılaştırılması .....	15
3.7.Perisitlerin ve iKİ-MKH'lerin <i>In-vitro</i> Kondrojenik Farklılaştırılması .....	15
3.8.Hücrelerden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi .....	15

3.9. Gen Ekspresyon Analizi .....	16
3.10. İmmünfloresan Boyama .....	17
3.11. İstatiksel analiz .....	18
4. BULGULAR .....	19
4.1. Plasentadan Elde Edilen Perisitlerin Karakterizasyonu .....	19
4.2. iKİ-MKH'lerin Kültürü ve Karakterizasyonu .....	20
4.3. iKİ-MKH'ler ile Perisitlerin Karşılaştırılması .....	23
4.4. Plasental Perisitlerin ve Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Pluripotent Kapasitelerinin Karşılaştırılması .....	24
4.5. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Plasental Perisitlerin Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Karşılaştırılması .....	26
4.6. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Plasental Perisitlerin Adipojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Karşılaştırılması .....	30
4.7. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Plasental Perisitlerin Kondrojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Karşılaştırılması .....	31
5. TARTIŞMA .....	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	39
KAYNAKÇALAR DİZİNİ .....	40
EKLER .....	45

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

MKH (MSCs): Mezenkimal Kök Hücre

iKİ-MKH (hBM-MSCs): İnsan Kemik İliği Kaynaklı-Mezenkimal Kök Hücre



## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1 Perisit ve endotel hücre ilişkisi.....	3
Çizim 1.2 Perisitler ve endotel hücrelerindeki hücre yolağı ilişkisi.....	4
Çizim 1.3 Perisitler üzerinde Angiopoietin etkisi.....	5
Çizim 4.1 Akış Sitometrisi ile perisit (P4) karakterizasyonu.....	19
Çizim 4.2 Plasental Perisit İmmunfloresan Boyamaları.....	20
Çizim 4.3 Akış Sitometrisi ile Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre (P4) karakterizasyonu.....	21
Çizim 4.4 MKH İmmunfloresan Boyamaları.....	22
Çizim 4.5 Perisitler ve iKİ-MKH'lerin 4., 6. ve 8.günlerdeki hücre kültür görüntüleri..	23
Çizim 4.6 İlerleyen pasajlarda perisitlerdeki pluripotensi gen ifadelerinin analizi.....	24
Çizim 4.7 İlerleyen pasajlarda perisitlerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi.....	25
Çizim 4.8 İlerleyen pasajlarda iKİ-MKH pluripotensi gen ifadelerinin analizi.....	25
Çizim 4.9 İlerleyen pasajlarda perisitlerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi.....	25
Çizim 4.10 İlerleyen pasajlarda perisitlerin ve iKİ-MKH'larda PDGFRB gen ifadesi analizi.....	26
Çizim 4.11 Perisit ve iKİ_MKH'lerin osteojenik farklılaştırma sonrası Alizarin Red S boyamalarının görüntüleri.....	27
Çizim 4.12 Perisitlerin 7., 14. ve 21. günde osteojenik gen ekspresyon analizleri.....	28
Çizim 4.13 Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 7., 14. ve 21. günde osteojenik gen ekspresyon analizleri.....	28
Çizim 4.14 Plasental Perisit ve iKİ-MKH Osteojenik Farklılaşma İmmunfloresan Boyamaları.....	29
Çizim 4.15 Plasental Perisitlerin ve iKİ-MKH'ların 21. Gün Adipojenik Farklılaşma Oil Red O Boyaması.....	30
Çizim 4.16 Plasental perisit ve iKİ-MKH hücrelerinin adipojenik farklılaşmada gen ekspresyon analizleri.....	31
Çizim 4.17 Plasental perisitlerin kondrojenik farklılaşma gen ekspresyon analizleri.....	32
Çizim 4.18 iKİ-MKH'ların kondrojenik farklılaşma gen ekspresyon analizleri.....	32
Çizim 4.19 Plasental Perisit ve iKİ-MKH'ların Kondrojenik Farklılaşma sonrası 21. Gün Kolajen ve SOX9 boyaması.....	33

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Deney grupları.....	14
Çizelge 3.2 Gen ekspresyonu analizi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri.....	17



# 1. GİRİŞ

## 1.1.Perisitler

Perisitlerin keşfi Fransız bilim insanı Charles Marie Benjamin Rouget tarafından 1873 yılında yapılmıştır. Rouget'a göre bu hücreler küçük kan damarlarında endotel hücrelerinin çevresinde bulunurlardı (Rouget,1873). Ayrıca bu hücrelerin kasılma özellikleri mevcuttu. Fakat bu hücrelerin asıl keşfi Eberth tarafından iki sene önce 1871 yılında gerçekleştirilmiştir (Eberth,1871). Bu hücrelerin tanımlaması daha sonraki yıllarda birçok şekilde gerçekleştirilmiştir. Fakat işlevleri ve tamamen saf kültür olarak elde edilmesi tamamiyle başarılamamıştır. Daha sonraları Zimmermann bu hücrelere Rouget hücreleri dediyse de bu hücrelerin isimlendirilmesi perisit olarak gerçekleştirilmiştir (Zimmermann, 1923). Fakat daha sonraki yıllarda da bu hücrelerin doğru tanımlaması gerçekleştirilememiştir.

Bu hücrelerin tamamen saf olarak elde edilememesinin nedenlerinden biri de vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar ve epitel hücreleriyle karıştırılabiliyor olmalarıdır. Perisitlerin diğer hücrelerden tamamiyle ayırt edilebilecek hücre belirteci bulunmamaktadır. Bu yüzden de perisitlerin ayrıştırılmasında sorunlar yaşanmaktadır. Bu bağlamda birden fazla hücre belirteci ile birlikte perisitler karakterize edilebilmektedir.

Günümüzde yapılan bazı çalışmalarda mural hücrelerin mezenkimal kök hücrelerden köken aldığı söylenmiştir. Ayrıca mural hücrelerin birden fazla gelişim tabakasından köken aldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalara göre, baş bölgesindeki merkezi sinir sistemi mural hücrelerinin kökeni nöral krestten, akciğer, karaciğer damar yapılarındaki mural hücrelerin kökeni mezotelden gelmektedir. Perisitlerin morfolojileri tanımlanması moleküler seviyede de yapılabilir fakat halen perisitlere özelleşmiş hücre belirteçleri tanımlanamamıştır. Aynı zamanda perisitlerin gen ekspresyon seviyeleri organlarda ve gelişim sürecine göre farklılık gösterdiği için tam anlamıyla bir tanımlama yapılamamaktadır.

Perisitlerin tanımlanmasında PDGFRB, NG2, CD146 ve CD13 hücre belirteçlerinin birlikte gözlemlenmesi önemlidir. (Armulik A, 2011)



Ayrıca yapılan çalışmalarda perisitlerin sınıflandırıldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalara göre perisitler iki gruba ayrılmaktadırlar. Bu iki grup hücre belirteçlerine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca bu iki hücre tipinin farklı hücre tiplerine farklılaşma kapasiteleri mevcuttur.

Perisit morfolojisi türler, dokular ve damar yapısına göre farklılık gösterir. Ayrıca hücre büyüklükleri vücudun çeşitli bölgelerinde farklılık göstermektedir. Bu hücreler lenfatik damarların çevresinde bulunmadıkları gibi küçük kan damarlarının çevresinde bulunurlar. Perisitlerin hücre yapısını gözlemleyecek olursak büyük bir çekirdek ve az miktarda sitoplazma görülür. Ayrıca abluminal endotel duvarını sarmak için uzantıları mevcuttur.

Perisit ve endotel hücreler aynı mikroçevreyi paylaşırlar ve bu etkileşim bazal membran yapısını oluşturmaktadır. Perisit endotel etkileşimlerinin sayısı ve büyüklükleri dokular arasında değişiklik gösterir (Armulik, A., 2005). Bazal membran yapısında endotel hücreler ve perisitlerin etkileşimleri: "Peg-socket", adezyon plakları, oluklu bağlantı ve yakın bağlantılar olmak üzere sınıflandırılabilir. Peg-socket etkileşiminde endotel hücrelerinin sitoplazmik yapıları perisitlerin hücre yapısının içine doğru girinti yapar. Bu bölgede bazal membran yapısı gözlemlenmez. Adezyon plaklarında perisit plazma membran ve endotel sitoplazmasının etkileşimi olarak gözlemlenir. Bu yapıda fibronektin bağlantıları görülür ve bu alanlar N-cadherin bağımlı bağlantıları oluşturur. Ayrıca adezyon plakları mikrofilament demetlerdir. Oluklu bağlantılar da endotel hücresi ve perisitler arasında gözlemlenir. Oluklu bağlantı benzeri bu yapılar in vivo ortamda gözlemlenmezken in vitro ortamda gözlemlenir. Endotel ve perisit arasında Tgf $\beta$ 'nın üretilmesi bu bağlantıyı gerektirir. 'Close occluding' bağlantılarda ise perisit ve endotel hücrelerinin birbirine çok yakın alanlar söz konusudur. Bu bağlantılar daha çok perisitlerin köşe yapılarında gözlemlenirken bağlantı özelliği önemli bir yer kaplamaktadır (Diaz-Flores at al., 2009).

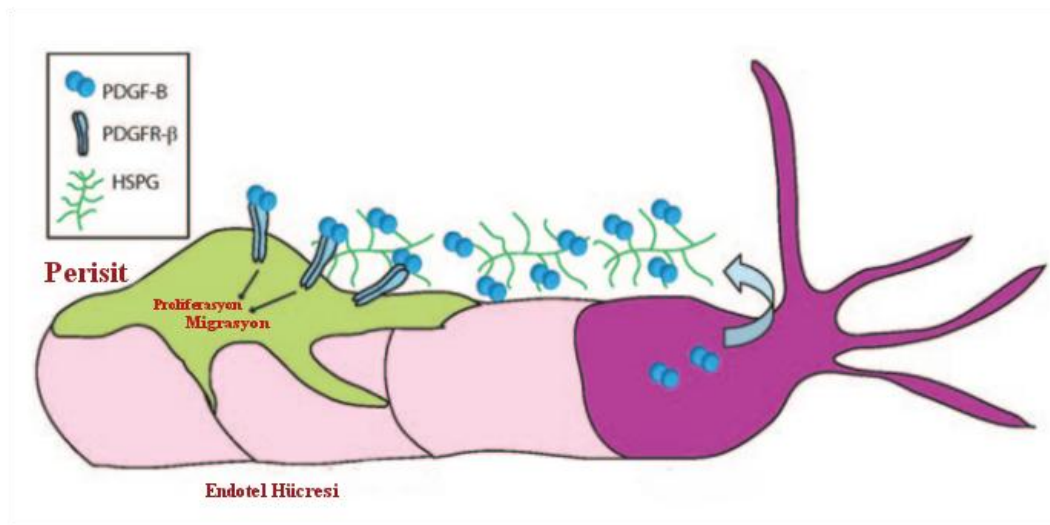
Perisitlerin buldukları alanlar damar yapısına göre farklılık göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı küçük damarlarda endotel yapısının abluminal yüzeyinde bulunur. Arteriollerin çevresindeki yapılar ise vasküler düz kas hücreleridir. Bu hücreler sitoplazmik yapısı az olan düz ve iğsi görünümündeki yapılardır. Prekapiller arteriollerde ise perisit hücre gövdesi dışı çıkık yapılar gösterir ve endotel tabakasını saran yapılar mevcuttur. Kapillerlerin dallanma bölgelerinde perisitlerin soma denilen bölümleri

mevcuttur. Bu damarlarda perisitler yuvarlak hücre şeklindedir ve perisitlerin bu yapıları endotel tabakası boyunca hareket etmelerini sağlamaktadır. Post-kapiller venüllerde ise hücre gövdesi yassı şekil alır ve ince ağı yapılar oluşur. Bu bölgede perisitler daha büyük yapılardır. Venüllerde ise düz kas hücreleri bulunmaktadır. Bu hücreler büyük ve yıldız şeklindedir. Ayrıca hücre gövdelerinin birden fazla uzantısı mevcuttur. Düz kas hücreleri arteriollerden farklı olarak endotel tabakasını dairesel olarak sarmazlar (Gerhardt et al., 2000).

Perisitler ve endotel hücreler paylaştıkları bazal membrandaki etkileşimleri birçok moleküler mekanizmanın da paylaşılmasını sağlar. Bu moleküler mekanizmalarla birlikte birçok hücre işlevi gerçekleştirilmektedir.

### 1.1.1. PDGF-B/PDGFR $\beta$ Yolağı

Anjiyogenez sırasında PDGF-B endotel hücreleri PDGFR $\beta$  ise mural hücreler tarafından üretilir. Üretilen PDGF-B gelişmekte olan perisitlerin yüzeyindeki PDGFR $\beta$  proteinine bağlanır. Ayrıca PDGF-B/PDGFR $\beta$  yolağı yeni oluşan damarlarda rol alır (Soriano, 2011). Ayrıca perisitlerin proliferasyonunda ve göçünde görev alır. Bir diğer görevde de PDGF-B aortik ve venöz farklılaşması ve differensiasyonunda rol alır. Ayrıca gelişmekte olan arterlerde PDGF-B ekspresyon seviyeleri yüksektir (Leveen et al., 1994).

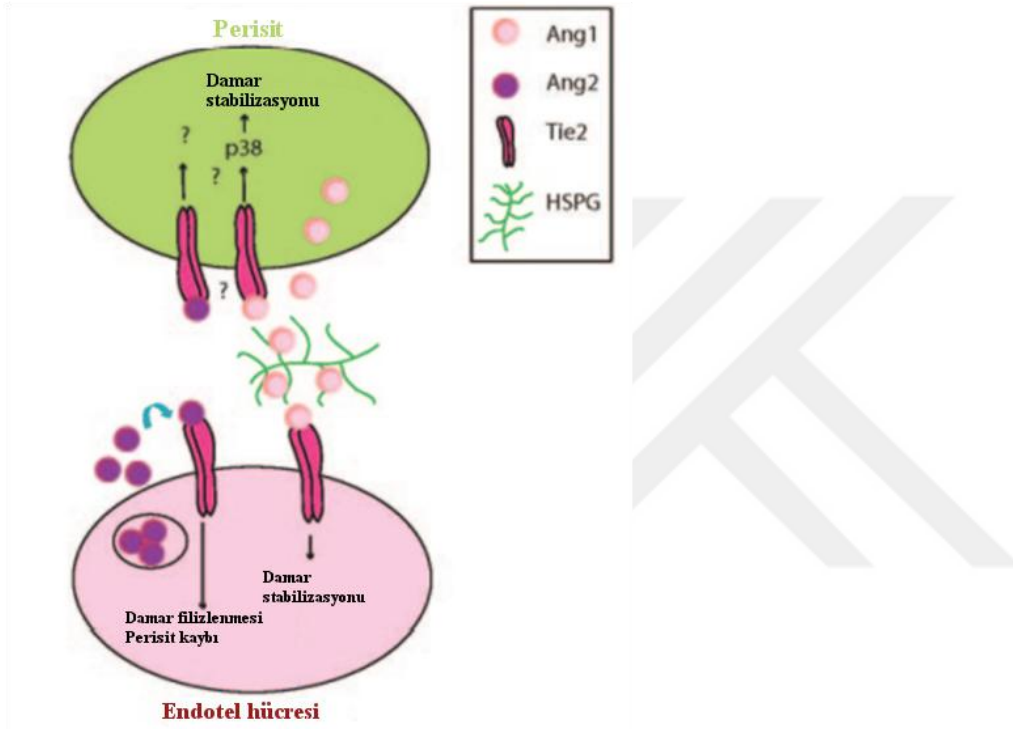


**Çizim 1.1** Perisit ve endotel hücre ilişkisi (Armulik,2005)



### 1.1.3. Angiopoietin-Tie2

Bu sinyal yolağı endotel hücrelerle perisitler arasında iletişimi sağlar. Bu sinyal yolağında Ang1 endotel hücre tabakası için perisitler tarafından üretilen parakrin bir sinyaldir (Davis et al., 1996). Damar olgunlaşması ve damarın stabil durumda kalması için Ang1/Tie2 etkileşimi gerekmektedir (Falcon et al., 2009). Ang2/Tie2 yapısı ise antagonist olarak çalışarak damarın stabil yapısının kaybolmasına sebep olmaktadır(Sundberg et al.,2002)



**Çizim 1.3** Perisitler üzerinde Angiopoietin etkisi. (Armulik,2005)

Mezenkimal kök hücrelerin damar yapısının yanında bulunması vücuttaki çoğu dokudan elde edilebilmesini açıklamaktadır. Perisitler mezenkimal kök hücrelere benzer yapıdadırlar. Bu yüzden mezenkimal kök hücrenin öncü yapısı olabilecekleri ortaya atılmıştır (Nombela-Arrieta, C. et al., 2011). Ayrıca perisitlerin hematopoetik kök hücre nişinin devamlılığını sağlamaya yardımcı olabildikleri söylenmektedir. Damar duvarlarındaki mezenkimal kök hücrelerle perisitler arasındaki ilişki üzerine çalışmalar da mevcuttur (Caplan, AI., 2008). Perisit tanımlanmasında perisitlerin buldukları bölgeler, morfolojileri ve gen/protein ekspresyon analizleri kullanılmaktadır. Ayrıca perisitler vasküler gelişimde ve homeostazında fizyolojik roller üstlenirler (Petrova et al., 2004).

Yetişkin doku tamirinde kök hücre ve öncül hücre kaynağı olarak kullanılabilirler. Perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin de bulunduğu perivasküler hücreler birçok organ ve dokudan elde edilebilir. Perisitler kan akışı düzenlenmesi, enflamasyon, immün sistem, yara iyileşmesi, damarsal gelişim ve anjiyogenez, dokuya özel görevlere sahiptirler (Dudek, 2009).

Elde edilen bu hücreler doku yenilenmesi ve anjiyogenezde önemli rol oynarlar. Perisitlerle yapılan çalışmalar kas, kemik ve deri yenilenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Perivasküler hücreler doku mühendisliğinde dokunun ve organın yenilenmesi için kullanılması hedeflenir (Tavazoie et al., 2008). Kalp, iskelet kası, kemik ve cilt yaralarını onarmaya yönelik farklı stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejilerden bazıları şu şekilde sıralanmaktadır;

***a) Vasküler greftler:***

Perisitler damarsal yapıları oluşturmada iyi bir seçenek olduğu bilinmektedir. Bu hücreler aynı anatomik yapıdan köken aldıkları için damar kasılmasını geliştirebilir. Aynı zamanda perisitler ve endotel hücreler arasındaki etkileşim endotel hücrelerin proliferasyonunu ve göçünü hızlandırabilir. Vasküler yapılarda en çok tercih edilen hücre tipi geniş damarlardaki düz kas hücrelerdir. Perisitlerle ilgili doku mühendisliği çalışmaları artmaktadır.

***b) İskelet ve Kardiyak Kas Greftleri:***

Kalp krizi vakalarının sonrasında kök hücre transplantasyonları uygulanmaktadır. Bu uygulamalarda perisitlerin de kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda perisitlerin kullanıldığı bölgelerde kardiyak fonksiyonlarında artma ve etkilenen kısmın boyutunda azalma görülmüştür (Diaz-Flores et al., 2009).

***c) Kemik Yenilenmesi:***

Kemik iliğinden elde edilen kök hücreler kemik yenilenmesi için en çok tercih edilen hücrelerdir. Yapılan çalışmalarda insan yağ dokusundan elde edilen perivasküler hücrelerin osteoblastlara ve osteositlere farklılaşma kapasiteleri vardır. Umbilikal korddan

elde edilen perivasküler hücrelerin kemik yenilenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Diaz-Flores et al., 2009).

#### ***d) Deri Yenilenmesi:***

Deri yenilenmesinde kullanılan yöntemlerde başarı sağlanamamıştır. Umbilikal korddan elde edilen perivasküler hücreler yara iyileşmesinde olumlu etki gösterdiği bulunmuştur. Perisitlerin kemik iliğinden elde edilen hücrelerden daha fazla iyileştirme gücü olduğu gösterilmiştir (Dai et al., 2009).

### **1.2 Kök Hücreler**

Kök hücreler vücudumuzun çeşitli bölgelerinde bulunan farklılaşma kapasiteleri yüksek ve kendilerini yenileme özellikleri olan hücre topluluklarıdır. Bu hücre toplulukları keşfedildiği günden bu yana birçok hastalığın tedavisinde ve doku rejenerasyonunda kullanılmaktadır. Kök hücrelerin birçok özelliği bu şekilde kullanılmasını sağlamaktadır. Bunlardan ilki kök hücrelerin kendini yenileyebilme ve bölünme özelliklerinin diğer hücrelerden daha gelişmiş olmasıdır. Ayrıca bu hücre grubu herhangi bir hücreden farklılaşmadığı gibi farklı hücre gruplarına farklılaşma özelliklerinin mevcudiyeti söz konusudur. Bu hücre topluluğunun her üç germ tabakasına farklılaşabilme kapasiteleri kendilerini yenilemeyen doku ve organların yerine geçebilecek yeni doku ve organların oluşturulması hedeflenebilmektedir. Bu hücreler diğer hücrelerden belirli hücre belirteçleriyle ayrılmaktadırlar. Kök hücreler potenslerine göre sınıflandırılabilirler.

***Totipotent Kök Hücreler:*** Bu hücre topluluğu embriyo blastomerlerinde bulunmaktadır. Döllenme oluştuktan sonraki 8 hücreli aşamada bu hücrelerin varlığı bilinmektedir. Bu hücreler tüm organizmayı ekstra embriyonik dokularla birlikte oluşturabilme kapasitesine sahiptirler. Ayrıca bu hücreler tüm hücrelere farklılaşma kapasitelerine sahiptir.

***Pluripotent Kök Hücreler:*** Bu hücreler döllenme sonrasında 16 hücreli blastokist yapısının iç kısmında bulunmaktadır. Bu hücreler tüm organizmayı oluşturabilme kapasiteleri olmasa da üç germ yaprağına da farklılaşabilme kapasiteleri mevcuttur. Burdaki kök hücreler embriyonik kök hücre olarak adlandırılmaktadır.

**Multipotent Kök Hücreler:** Bu hücreler kendi elde edildikleri dokudaki hücelere farklılaşabilirler. Bu hücrelerin farklılaşma kapasiteleri mevcuttur fakat embriyonik kök hücrelerde olduğu gibi her doku ve organa farklılaşma kapasiteleri mevcut değildir.

**Oligopotent Kök Hücreler:** Bu hücre topluluğunun farklılaşma kapasiteleri çok yüksek değildir. Sadece belirli tipteki hücelere farklılaşabilirler.

**Unipotent Kök Hücreler:** Bu hücreler sadece buldukları organda kendi özelliğindeki hücelere kendini yenileme şeklinde farklılaşabilirler.

Kök hücreler potensileri haricinde ayrıca embriyonik ve yetişkin canlıların dokularında buldukları yere göre de sınıflandırılmaktadır. Embriyoda; plasenta, göbek kordonu ve jarton jelinde Embriyonik Kök Hücreler bulunabilirken yetişkinlerde; kemik iliği, yağ dokusu, periferik kan, süt dişi ve birçok organda organa özgü kök hücreler bulunmaktadır.

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) yetişkinlerde özellikle kemik iliği olmak üzere, yağ dokusunda, kas dokusunda ve periferik kanda bulunabilmektedir. Kemik iliğinde hematopoetik kök hücreler ile aynı nişi paylaşan MKH'ler, kan hücreleri meydana getiren hematopoetik kök hücrelerden farklı olarak mezenkimal dokusundan köken alan hücreleri meydana getirebilmektedirler. Uluslar arası Hücre Terapi Topluluğu 2001 yılında MKH'leri tanımlamak için bazı standartlar belirlemiştir. Buna göre;

- Plastik kültür kabına yapışan,
- İn vivo ortamda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaya gidebilen ve
- CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerini taşıyan, CD45, CD34, CD11b, CD31 ve HLA-DR belirteçlerine sahip olmayan her hücre mezenkimal kök hücre olarak adlandırılabilir. (Gnecchi 2016)

Kök hücrelerin görevleri arasında immün sistemi düzenleme görevleri de mevcuttur. Bu nedenle artık doku ve organ naklini konu alan birçok çalışmada mezenkimal kök hücreler de immün sistemi düzenleyen faktörler olarak hastaya verilmektedir.

Doku mühendisliği çalışmalarında yeni doku ve organ yapımında da kök hücrelerin farklılaştırılarak yeni doku ve organlara farklılaştırılabilmesi de ilerde bilim dünyasında yenidünyaların açılacağı söz konusudur.

## 2. AMAÇ

Günümüzde hem rejeneratif tıpta hem de birçok hastalığın tedavisinde farklı yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Fakat kaybolan ya da yitirilen bir olgunun insan vücudunda yerine konulabilmesi yeterince kolay değildir. Bu yüzden birçok çalışmada kaybedilen özelliğin farklı yöntemlerle yerine konulması amaçlanmaktadır. Bu çalışmalarda artık günümüzde hücre bazlı çalışmalar önem kazanmaktadır. İnsan vücudunda zaten halihazırda bulunan hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve bir diğer hücrenin yerine konulabilmesi hastalıkların tedavisinde önemli denilecek bir adım oluşturmuş olmaktadır.

Kök hücreler günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin farklı dokulara farklılaşma kapasiteleri ve kendilerini yenileme özellikleri tedavi amaçlı kullanılmasında iki önemli yapıtaşını oluşturmaktadır. Fakat mezenkimal kök hücrelerin insan vücudunda çok fazla sayıda bulunmaması ve her dokudan elde edilen kök hücrenin istenilen doku tipine farklılaştırılmaması yeni kaynakların araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu yüzden kan damarlarının çevresinde bulunan özelleşmiş hücre topluluklarından biri olan perisitler bu çalışmada kullanılmıştır. Perisitler insan vücudundaki kan damarlarının etrafında bulunmaktadırlar. Ayrıca yapılan birçok çalışmada bu hücrelerin rejeneratif özellikleri ve kök hücreye benzer özellikleri olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan literatürdeki çalışmalardan yola çıkarak iki hücre tipinin farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılacaktır. Farklılaşma kapasitelerini ortaya koymak için hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaları gözlemlenecektir. Ayrıca iki hücre tipinin de pluripotensi özellikleri de karşılaştırılacaktır. Böylece tedavide ve kök hücre ile ilgili yapılacak çalışmalarda hangi hücrelerin daha iyi bir kaynak olacağı seçilmesi amaçlanmaktadır.



### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Perisit izolasyonu

Yapılan çalışmada kullanılan perisit hücreleri, insan plasenta dokusundan izole edilmiştir. Sezaryen doğum yapan kadın bireyin plasentasının alınması hususunda onam formu ile izni alınmış ve birey bilgilendirilmiştir. Alınan plasenta dokusundan, perisitlerin genel olarak lokalize olduğu küçük damarların yoğun olarak bulunduğu göbek kordonu etrafı tespit edilerek alındı. Damarlarca zengin bu bölgeden hem mekanik yöntem ile hem de enzimatik yöntem ile izolasyon işlemi yapıldı. Plastik petri kabı içine alınan doku, bistüri yardımı ile mekanik olarak küçük parçalara ayrıldı. Dokuların parçalanıp, hücrelerin açığa çıkmasını sağlayabilmek için parçalara ayrılan dokular Kollajenaz/Tripsin enzimleri kullanıldı. Deney tüplerine aktarılan doku parçalarının üzerine 3mg/ml oranında Kollajenaz ve 1mg/ml oranında Tripsin enzimi ilave edilerek 37°C'da 2 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında dokulardan ayrılmış olan hücreleri elde edebilmek amacıyla kimyasal olarak da parçalanan doku, 100µm'lik steril hücre filtresinden geçirildi. Elde edilen hücreler bakımından zengin bu kısım, 50 ml'lik tüpte toplandı ve üzerine bazal bir besi ortamı olan Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) eklendi. Daha sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapıp sıvı kısım atıldı. Bu şekilde enzimi uzaklaştırmak için iki defa bazal besi ortamı kullanılarak hücreler yıkama işlemine tabi tutuldu. Son yıkama işleminin ardından sıvı kısım atıldıktan sonra kalan hücre peleti 1ml bazal besi ortamı ile süspanse edilerek, %1 penisilin-streptomisin (10.000 U/ml) ve %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren DMEM-F12 besi ortamına ekildi. Hücrelerin besi ortamı, iki ila üç günde bir PBS ile yıkandıktan sonra yeni besi ortamı ile değiştirildi. Hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler kültür kabınının %70 ila %80'ini doldurduklarında %0,25 Tripsin/EDTA ile kaldırılarak pasajı yapıldı (tüm malzemeler Thermo Fisher Scientific'den alınmıştır).

Perisitlerin damar etrafında yer alması nedeniyle damarca zengin bir dokudan izolasyon işlemi gerçekleştirildiği için elde edilen hücreler içinde eritrositler de bulunmaktadır. Bu nedenle izolasyon sonrasında ekilen hücreler, ilk üç gün sonrasında besi ortamı değiştirildikten sonra PBS ile yıkandıktan sonra bir defaya mahsus olmak üzere yeni besi ortamlarına 1x yoğunlukta eritrosit patlatma solüsyonu ilave edildi. Bu şekilde

hazırlanan besi ortamında kültür edilen hücreler iki ila üç gün sonra tekrar PBS ile yıkanarak çalışma boyunca standart olarak kullanılan %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM-F12 besi ortamı kullanılarak kültür edilmiştir. Eritrositlerden temizlenen kültür ortamında bulunan perisitlerin karakterizasyonunun yapılması için 4.pasaja kadar kültürü devam ettirildi. Hücreler pasaj 4, pasaj 6 ve pasaj 8 de ışık mikroskobu ile görüntülendi.

### **3.2.Mezenkimal Kök Hücre Kültürü**

Yapılan çalışma boyunca kullanılan insan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler, KÖGEM hücre koleksiyonunda bulunan, daha önceden etik kurul onayı alınmış olan hücrelerdir. MKH'ler %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM-F12 besi ortamı kullanılarak kültür edildi (tüm malzemeler Thermo Fisher Scientific'den alınmıştır). Hücreler, iki ila üç gün ara ile mevcut besi ortamını uzaklaştırıp PBS ile yıkanarak yeni besi ortamında 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültürü devam ettirildi. Kültür kabının %70-%80 'ini dolduracak kadar çoğaldıktan sonra hücreler Tripsin /EDTA kullanılarak bulunduğu kültür kabı yüzeyinden kaldırılarak pasajı yapıldı. Hücreler pasaj 4, pasaj 6 ve pasaj 8 de ışık mikroskobu ile görüntülendi.

### **3.3.Perisit karakterizasyonu**

Yapılan bu çalışmada, insan plasenta dokusundan izole edilen hücrelerin perisit olduklarını kanıtlamak için 4. pasaja kadar kültürü yapılan hücreler akış sitometri yöntemi ve immünfloresan boyama tekniği kullanılarak karakterize edildi.

#### **3.3.1. Akış sitometri ile karakterizasyon**

Kültürü 4. Pasaja kadar yapılan perisitler, %70 ila %80 konfluensiye ulaştıklarında %0.25'lik Tripsin/EDTA ile kültür kabından kaldırıldı. Süspansede halindeki hücreler FBS yardımıyla enzim inaktivasyonu sağlandıktan sonra 50 ml'lik deney tüpüne aktararak santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında sıvı kısım atılarak pelet halindeki hücreler 1ml bazal besi ortamı kullanılarak süspansede edildi ve 0,15 ml ependorf tüpe alınıp üzerine aynı miktarda tripan blue boyası ilave edilerek thoma lamında sayıldı.  $2,2 \times 10^6$  hücre ayrılarak 9 ml bazal besi ortamına aktarıldı ve tekrar homojen bir karışım olması için tekrar süspansede

edildi. Süspanse hale getirilen hücreler PDGFRB, CD146, NG2 ve  $\alpha$ SMA gibi perisit belirteçleri olan antikora floresan boya bağlanması sonrasında hücreler akış sitometri cihazında okutularak CellQuest software (Becton Dickinson) ile akış sitometrik analizi yapılarak değerlendirildi.

### **3.3.2. İmmü floresan boyama ile karakterisasyon**

Akış sitometri için ayrılan hücreler haricinde kalan hücrelerden 20.000'i yuvarlak cam lamele ekilerek bir gün boyunca yüzeye yapışmaları için kültür edildi. Daha sonra hücrelerin yapıştığı yuvarlak cam lamel kültür kabından alınarak PBS ile üç kez yıkandı. Ardından %4'lük paraformaldehit ile 15-20 dk oda sıcaklığında fikse edildi. Daha sonra fiksatif deiyonize su ile uzaklaştırıldı ve yaklaşık 7-10 dk TritonX uygulaması yapılarak hücrelerin geçirgenliği artırıldı. Tekrar PBS ile TritonX uzaklaştırıldıktan sonra uygun orandaki blok serum ile hücreler yaklaşık olarak 30 dk üstleri parafilm ile kapatılarak bekletildi. Sonrasında fazla serum alınarak perisit belirteçleri olan PDGFRB, CD146, NG2 ve  $\alpha$ SMA antikora ile üretici talimatlarına uygun şekilde seyreltilerek cam lameller üzerine damlatıldı. Antikora hücrelere daha iyi nüfus edebilmesi amacıyla cam lamellerin üzerleri parafilm ile kapatılarak +4°C'de gece boyu bekletildi. Daha sonra primer antikora uygun olarak seçilmiş sekonder antikora, üretici firmanın talimatları doğrultusunda seyreltildi ve cam lameller üzerine damlatılarak karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. Son olarak lameller nükleer boya içeren kapatma solüsyonu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatılarak floresan mikroskopta görüntüledi ve fotoğrafları çekildi (DMI 4000 Microsystems, Leica, Wetzlar, İsviçre).

### **3.4. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu**

Bu çalışmada, insan kemik iliğinden daha önceden izole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduklarını kanıtlamak için 4.pasaja kadar kültürü yapılan hücreler akış sitometri yöntemi ve immü floresan boyama tekniği kullanılarak karakterize edildi.

### **3.4.1. Akış Sitometrisi ile Karakterizasyon**

Kültürü 4. Pasaja kadar yapılan mezenkimal kök hücreler, %70 ila %80 konfluensiye ulaştıklarında %0.25'lik Tripsin/EDTA ile kültür kabından kaldırıldı. Süspansede halindeki hücreler FBS yardımıyla enzim inaktivasyonu sağlandıktan sonra 50ml'lik deney tüpüne aktarılıp santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında sıvı kısım atılarak pelet halindeki hücreler 1ml bazal besi ortamı kullanılarak süspansede edildi ve 0,15 ml ependorf tüpe alınıp üzerine aynı miktarda tripan blue boyası ilave edilerek thoma lamında sayıldı.  $2,2 \times 10^6$  hücre ayrılarak 9 ml bazal besi ortamına aktarıldı ve tekrar homojen bir karışım olması için tekrar süspansede edildi. Süspansede hale getirilen hücreler CD90, CD73, CD105 gibi kök hücre belirteçleri olan antikörlere floresan boya bağlanması sonrasında hücreler akış sitometri cihazında okutulup CellQuest software (Becton Dickinson) ile akım sitometrik analizi yapılarak değerlendirildi.

### **3.4.2 İmmünfloresan boyama ile karakterizasyon**

Akış sitometri için ayrılan hücreler haricinde kalan hücrelerden 20.000'i yuvarlak cam lamele ekilerek bir gün boyunca yüzeye yapışmaları için kültür edildi. Daha sonra hücrelerin yapıştığı yuvarlak cam lamel kültür kabından alınarak PBS ile üç kez yıkandı. Ardından %4'lük paraformaldehit ile 15-20 dk oda sıcaklığında fikse edildi. Daha sonra fiksatif deiyonize su ile uzaklaştırıldı ve yaklaşık 7-10 dk TritonX uygulaması yapılarak hücrelerin geçirgenliği artırıldı. Tekrar PBS ile TritonX uzaklaştırıldıktan sonra uygun orandaki blok serum ile hücreler yaklaşık olarak 30 dk üzerleri parafilm ile kapatılarak bekletildi. Sonrasında fazla serum alınarak perisit belirteçleri olan CD73, CD90 ve CD105 antikörları ile üretici talimatlarına uygun şekilde seyreltilerek cam lameller üzerine damlatıldı. Antikörların hücrelere daha iyi nüfus edebilmesi amacıyla cam lamellerin üstleri parafilm ile kapatılarak +4°C'de gece boyu bekletildi. Daha sonra primer antikörlara uygun olarak seçilmiş sekonder antikörlar, üretici firmanın talimatları doğrultusunda seyreltildi ve cam lameller üzerine damlatılarak karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. Son olarak lameller nükleer boya içeren kapatma solüsyonu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatılarak floresan mikroskopta görüntüledi ve fotoğrafları çekildi (DMI 4000 Microsystems, Leica, Wetzlar, İsviçre).

### 3.4.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Yapılan çalışmada, deney grupları Çizim 3.1’de gösterilmiş olduğu gibi oluşturuldu.

Çizelge 3.1 Deney grupları

	Plasental Perisit			Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre		
<b>Adipojenik Farklılaşma</b>	7. gün Farklılaşma	14. gün Farklılaşma	21. gün Farklılaşma	7. gün Farklılaşma	14. gün Farklılaşma	21. gün Farklılaşma
	7. gün Kontrol	14. gün Kontrol	21. gün Kontrol	7. gün Kontrol	14. gün Kontrol	21. gün Kontrol
<b>Osteojenik Farklılaşma</b>	7. gün Farklılaşma	14. gün Farklılaşma	21. gün Farklılaşma	7. gün Farklılaşma	14. gün Farklılaşma	21. gün Farklılaşma
	7. gün Kontrol	14. gün Kontrol	21. gün Kontrol	7. gün Kontrol	14. gün Kontrol	21. gün Kontrol
<b>Kondrojenik Farklılaşma</b>	7. gün Farklılaşma	14. gün Farklılaşma	21. gün Farklılaşma	7. gün Farklılaşma	14. gün Farklılaşma	21. gün Farklılaşma
	7. gün Kontrol	14. gün Kontrol	21. gün Kontrol	7. gün Kontrol	14. gün Kontrol	21. gün Kontrol

### 3.5. Perisitlerin ve iKİ-MKH’lerin *In-vitro* Osteojenik Farklılaştırılması

Kültür kabının 1 cm<sup>2</sup>’sinde yaklaşık olarak 3x10<sup>3</sup> adet hücre olacak şekilde iKİ-MKH’lar ve perisitler yuvarlak cam lameller koyulmuş olan kültür kablını üzerine ekilerek ilk üç gün boyunca normal besi ortamlarında kültür edildi. Böylece hücrelerin yüzeye tutunmaları ve buldukları ortama uyum sağlayarak hücresel faaliyetlerini normal düzeye getirmeleri beklendi. Ardından hücreler üç hafta boyunca, 100 nM dexamethasone, 0,05 µM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS eklenmiş DMEM-F12 ile hazırlanmış osteojenik farklılaştırmayı indükleyici besi ortamı ile kültür edildi. 21 gün sonunda hücrelerin farklılaşmasını tespit etmek için Alizarin Red S boyaması ve gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi.

### **3.6. Perisitlerin ve iKİ-MKH'lerin *In-vitro* Adipojenik Farklılaştırılması**

Kültür kabının 1 cm<sup>2</sup>'sinde yaklaşık olarak 3x10<sup>3</sup> adet hücre olacak şekilde iKİ-MKH'lar ve perisitler yuvarlak cam lameller koyulmuş olan kültür kablari üzerine ekilerek ilk üç gün boyunca normal besi ortamlarında kültür edildi. Ardından hücreler üç hafta boyunca 1mM deksametazon, 0,5mM isobutilmetilksantin (IBMX), 50µM indometazin, %1 pen.strep. ve %10 FBS içeren DMEM-F12 besi ortamında kültür edildi. 21 günün sonunda lameller kültür ortamından alınıp üç kez PBS ile yıkanıp metanol ile fiske edildi. Ardından hücre içerisindeki yağ veziküllerinin görünmesini sağlayan Oil Red O boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda görüntülendi.

### **3.7. Perisitlerin ve iKİ-MKH'lerin *In-vitro* Kondrojenik Farklılaştırılması**

Kültür kabının 1 cm<sup>2</sup>'sinde yaklaşık olarak 3x10<sup>3</sup> adet hücre olacak şekilde iKİ-MKH'lar ve perisitler kültür kablari üzerine ekilerek ilk üç gün boyunca normal besi ortamlarında kültür edildi. Ardından hücreler 14 gün boyunca farklılaşmayı indüklemesi adına %1 İnsülin-Transferin-Selenyum (ITS) eklentisi, 100 nM deksametazon, 0.1 mM askorbat-2-fosfat, 1 mM sodum prüvat ve 10 ng/ml dönüştücü büyüme hormonu-β (TGF-β) ve %1 pen.step. içeren DMEM-F12 besi ortamında kültür edildi. 21. günün sonunda hücreler gen ifadesi analizi yapılmak üzere hücreler kaldırılarak pelet haline getirilip -80°C de muhafaza edildi.

### **3.8. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi**

Her bir deney grubuna ait olan hücreler, farklılaştırma işlemlerinden sonra PBS ile yıkandıktan sonra buldukları kültür kabından kaldırılmış ve santrifüj edilip sıvı kısım uzaklaştırılarak hücre peletleri -80°'de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu yapılacağı zaman hücreler oda sıcaklığında çözünmesi için bekletildi ve ardından "High Pure RNA Isolation Kit"(Roche) ile üreticinin önerdiği izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Kısaca; hücreler 200 µl PBS ilave edilerek yeniden süspanse hale getirildi. Ardından üzerine 400 µl Lysis/Binding Buffer ilave edildi ve vorteks yardımıyla hücrelerin sindirilmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra örnekler bir toplama tüpünün içine geçirilmiş olan filtre tüpün üzerine pipet vasıtasıyla aktarıldı ve 8000g'de 15 s santrifüj edildi. Daha sonra her bir örneğin üzerine 90µl DNaseI Incubation Buffer ve 10µl DNaseI enzimi ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra ortamdaki istenmeyen organik ya da inorganik kalıntılardan kurtulmak için yıkama solüsyonu 1 ile bir kez ve yıkama solüsyonu 2 ile iki

kez yıkandı. İşlemler sonunda filtrelili tüplerin filtresine takılmış olan RNA'ları elde edebilmek amacıyla, toplama tüpleri atılarak eppendorf tüplerin içine filtrelili tüpler geçirilir ve ardından 30 µl Elution Buffer filtre kısmın üzerine gelecek şekilde ilave edilerek 2 dk 8000g'de santrifüj edildi. İşlem sonucunda hücrelerden toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen örnekler cDNA sentezi işlemi yapılana dek -80°'de muhafaza edilir.

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezini yapabilmek için "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit" (Roche) ürünü kullanılmıştır. İşlemler, üretici firmanın tarif ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Her gruba ait RNA örnekleri oda sıcaklığında eridikten sonra buz üzerinde tutuldu ve her birinden 10,4µl alınarak PCR tüplerine aktarılıp üzerlerine 1µl oligo-dT eklendi. Tüpler 65°C'da 10 dk olacak şekilde PCR cihazına (Takara, Tokyo, Japonya) yerleştirildi. Bu aşamada RNA'nın ikincil yapısının denatürasyonu yapılarak örnekler hemen tekrar buz üzerine alındı. Ardından ters transkriptaz reaksiyon için gereken diğer reaktifler tarif edildiği ölçülerde karıştırılarak her bir örneğin üzerine 8,6 µl olacak şekilde ilave edildi ve PCR cihazına yeniden yerleştirildi. Bu aşamadan sonra örnekler 55°C'de 30 dk uzama aşaması, hemen ardından 85°C'de 5 dk enzimin inaktivasyonu sağlandı. Son olarak tüm örnekler buz üzerine alındı ve gen ekspresyonu analizi yapılana dek -20°C'de muhafaza edildi.

### **3.9. Gen Ekspresyon Analizi**

Perisitlerin ve mezenkimal kök hücrelerin hem pluripotensi özelliklerinin hem de farklılaşma kapasitelerinin gen düzeyinde incelenebilmesi için Real Time PCR (LightCycler-II 480, Roche, Mannheim, Almanya) yapılmıştır. Bu yöntem ile hücrelerdeki farklılaşma ve pluripotensi belirteçleri olarak belirlenen proteinlerin gen ekspresyon miktarı kantitatif olarak tespit edilmiştir.

Real Time PCR yapılırken SYBR Green master karışımı (Jena Biotechnology, Jena, Almanya) ve aşağıdaki listede yer alan farklılaşmaya ait bazı genlerin primerleri (Çizelge 3.3) ile daha önceden elde edilen cDNA'lar karıştırılarak reaksiyon kurulmuştur. 96 well plate'lere kurulan reaksiyonlar 480 nm dalga boyunda okutulmuş ilgili genlerin çoğalmaları takip edilmiş ve sonrasında çıkan Cp sonuçları doğrultusunda analizleri yapılmıştır.

**Çizelge 3.2** Gen ekspresyonu analizi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Primerler	Açık İsmi	Baz Dizilimleri (5'→3')
Lin28	Lin-28 Homolog A	f- CTGGAATCCATCCGTGTCA
		r- TCTAGACCTXXACAGTTGTAG
ZPF42	Zinc Finger Protein 42	f- TCTGAGTACATGACAGGCAAG
		r- TCTGATAGGTCAATGCCAGGT
GATA6	GATA Binding Protein 6	f- AATACTTCCCCACAACACAA
		r- CTCTCCCGCACCAGTCAT
Pdx1	Pancreatic And Duodenal Homeobox 1	f- CCTTTCCCATGGATGAAGTC
		r- TTCAACATGACAGCCAGCTC
Oct4	Octamer-Binding Protein 4	f- TTTCTGCAGAGCTTTGATGTTC
		r- TGCCGTGAAACTGGAGAAG
Msx1	Msh Homeobox 1	f- GAAACTGAGGGCAGAGAGGT
		r- TGGCCTCTAGCTCTGTTC AAC
Nr6a1	Nuclear Receptor Subfamily 6 Group A Member 1	f- CAACGGTTTCTGTCAGGATG
		r- GTTGTT CAGCCCGATCATCT
TerT	Telomerase Reverse Transcriptase	f- GCCTTCAAGAGCCACGTC
		r- CCACGAACTGTCGCATGT
Sox2	Sex Determining Region Y-Box 2	f- ATGGGTTCGGTGGTCAAGT
		r- GGAGGAAGAGGTAACCACAGG
UTF1	Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1	f- ACAAGTTCTTAAAGACAAGT
		r- GGATCTGCTCGTCGAAGG
Rex1	RNA Exonuclease 1 Homolog	f- TCTGAGTACATGACAGGCAAG
		r- TCTGATAGGTCAATGCCAGGT
FoxD3	Forkhead Box D3	f- GAAGCCGCCTTACTCGTACA
		r- CGCTCAGGGTCAGCTTCTT
Actβ	Actin Beta	f- TTCTACAATGAGCTGCGTGTG
		r- GGGGTGTTGAAGGTCTCAA

### 3.10. İmmünfloresan Boyama

Perisit belirteçlerinin tespiti ve pluripotensi seviyesinin saptanması için immün floresan olarak PDGFRB, CD146, NG2 ve αSMA antikoları (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Almanya) ile boyama yapılmıştır. Bunun için 6 kuyucuklu kültür kablalarının içlerine cam lameller yerleştirilmiş ve her bir kuyucuğa 4.pasaja ait 50.000 perisit ekildi. Hücreler %1 pen.strep ve %10 FBS içeren DMEM-F12 besi ortamı ile iki ila üç gün boyunca kültür edildi. Ayrıca osteojenik ve kondrojenik farklılaşma tepiti için sırasıyla



osteocalcin, BMP2 ve SOX9, COL2 boyamaları yapılmıştır. Bunun için 6 kuyucuklu kültür kablalarının içlerine cam lameller yerleştirilmiş ve her bir kuyucuğa 4. Pasaja ait mezenkimal kök hücre ve perisit ekilmiştir. Farklılaşma besiyerleri içerisinde 21 gün kültüre edilmiştir.

Daha sonra cam lameller alınarak üçer defa PBS ile yıkanıp ardından %4'lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edildi. Ardından fiksatif, deiyonize su ile uzaklaştırıldı ve yaklaşık 7-10 dk TritonX uygulaması yapılarak hücrelerin geçirgenliği artırıldı. Tekrar PBS ile TritonX uzaklaştırıldıktan sonra uygun orandaki blok serum ile hücreler yaklaşık olarak 30 dk üstleri parafilm ile kapatılarak bekletildi. Sonrasında fazla serum alınarak perisitler için karakteristik olan belirteçlerin primer antikoları (PDGFRB, CD146, NG2 ve  $\alpha$ SMA) cam lameller üzerine damlatıldı ve üzerleri parafilm ile kapatılarak +4°C'de gece boyu bekletildi. Daha sonra primerlere uygun olarak seçilmiş olan sekonder antikolar üretici firmanın talimatları doğrultusunda seyreltildi ve cam lameller üzerine damlatılarak oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bir saat inkübe edildi. Son olarak ise lameller DAPI ihtiva eden kapatma solüsyonu ile kapatılarak floresan mikroskopta görüntülendi ve fotoğrafları çekildi (DMI 4000 Microsystems, Leica, Wetzler, İsviçre).

### **3.11. İstatiksel analiz**

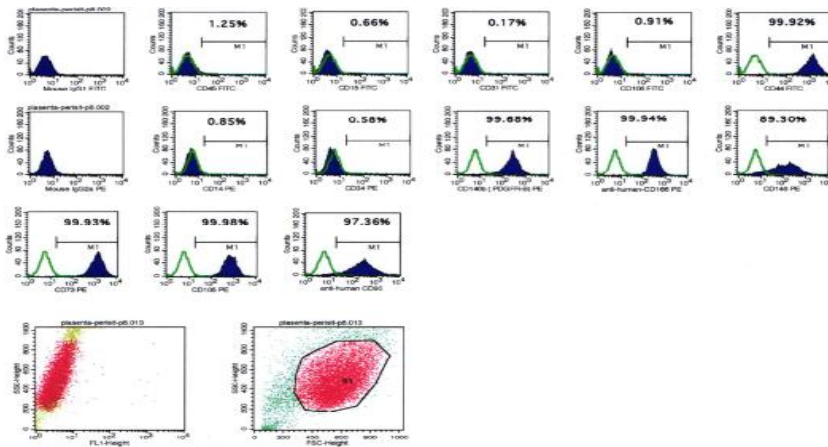
Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı ile yapılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman-Keuls metodu ile test edilmiştir. Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark  $p<0,05$  olduğunda anlamlı ve  $p<0,01$  olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edilmiştir.

## 4. BULGULAR

Mezenkimal kök hücreler günümüzde hastalıkların tedavisinde ve doku yenilenmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin üç germ yaprağından köken alan dokulara farklılaşma kapasiteleri ve hızlı çoğalmaları bu hücrelerin birçok alanda kullanılmasını sağlamıştır. Fakat halen mezenkimal kök hücrelerin gerçek kapasitesi ve nerden köken aldıkları bilinmemektedir. Ayrıca yüksek verimlilikte hücre her zaman elde edilememektedir. Son çalışmalarda artık bilim insanları çoğalma kapasitesi yüksek alternatif kaynakların bulunmasına yönelmiştir. Bu yüzden yapılan çalışmada alternatif kaynak olarak insan plasentasından elde edilen perisitler kullanılmıştır. Perisitlerin mezenkimal kök hücrelerin de farklılaşabildiği üç germ yaprağına farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca perisitlerin pluripotensi özellikleri mezenkimal kök hücrelerle karşılaştırılmıştır.

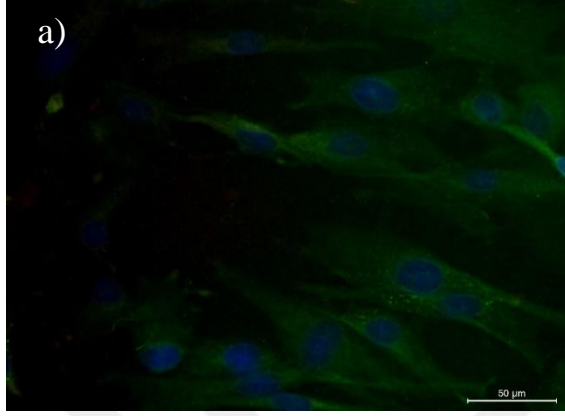
### 4.1.Plasentadan Elde Edilen Perisitlerin Karakterizasyonu

İnsan plasentasından elde edilen hücrelerin çoğalması P4'e kadar devam ettirilmiştir. Pasaj 4'teki perisitler akış sitometrisi için besiyeri içinde analize edilirken fikse edilen hücreler immunfloresans boyama ile karakterize edilmiştir. Akış sitometrisinde perisit paneli oluşturularak hücreler karakterize edilmiştir (Çizim 4.1).

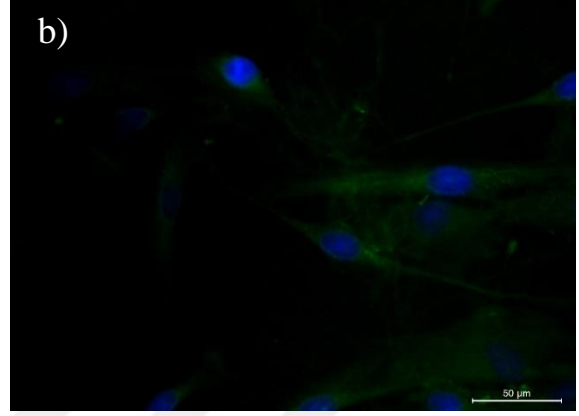


Çizim 4.1 Akış Sitometrisi ile perisit (P4) karakterizasyonu.

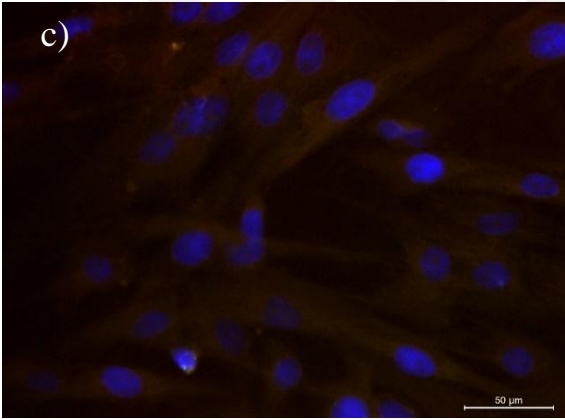
İmmunfloresan yöntemde ise hücreler PDGFRB, CD146, NG2 ve  $\alpha$ SMA ikili boyamaları gerçekleştirilmiştir (Çizim 4.2).



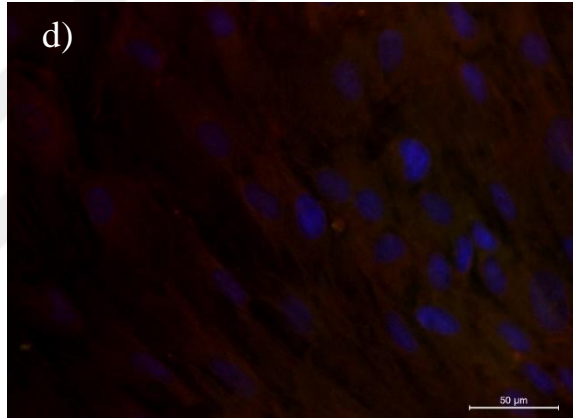
Primer Antikor: PDGFR $\beta$   
Seconder Antikor: FITC



Primer Antikor:  $\alpha$ SMA  
Seconder Antikor: FITC



Primer Antikor: PDGFR $\beta$ +CD146  
Seconder Antikor: FITC+TR



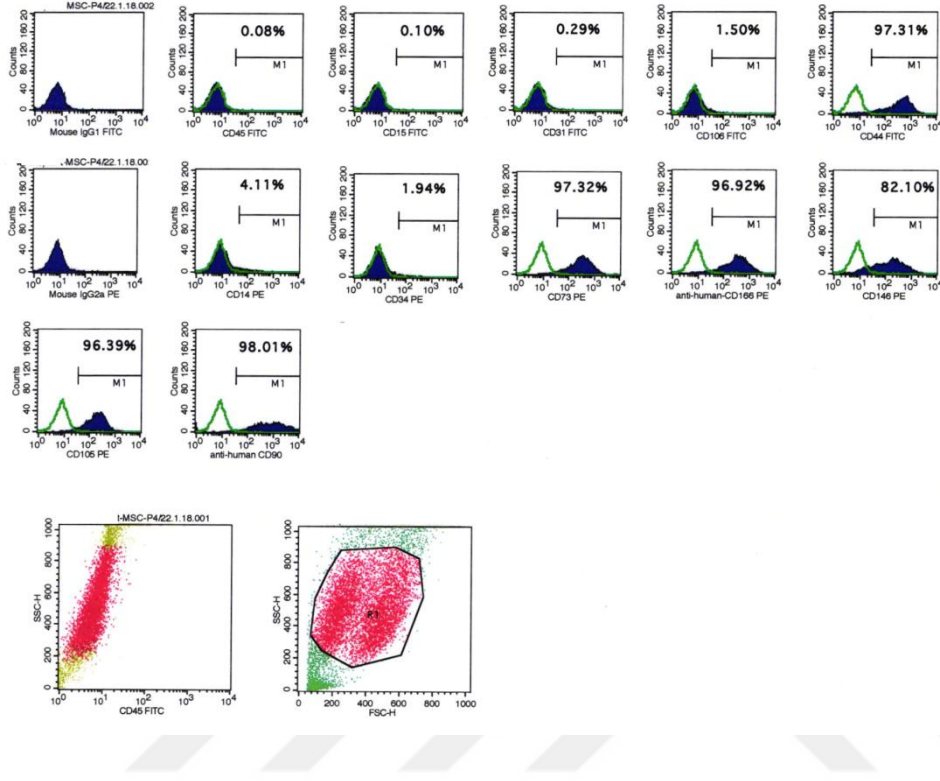
Primer Antikor: PDGFR $\beta$ +NG2  
Seconder Antikor: FITC+TR

**Çizim 4.2** Plasental Perisit İmmunfloresan Boyamaları. a)PDGFRB(FITC) b)PDGFRB(FITC)+NG2(TR) c)CD146(FITC)+ $\alpha$ SMA(TR) d)PDGFRB+NG. Çekirdek boyası: DAPI(mavi) ve Ölçüm çubuğu: 50 $\mu$ m.

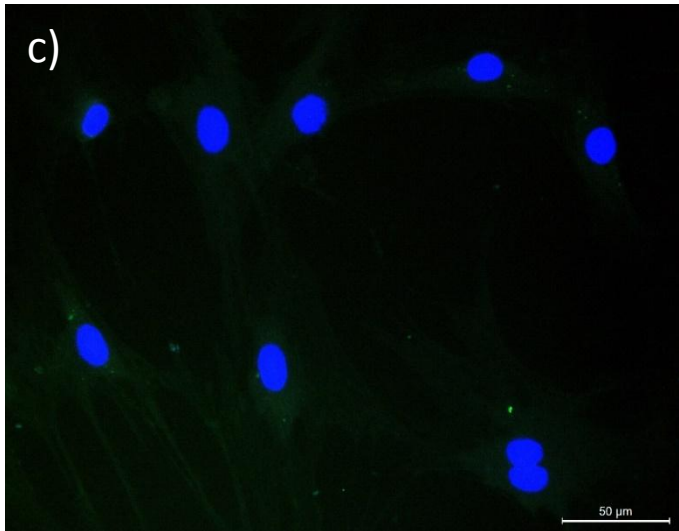
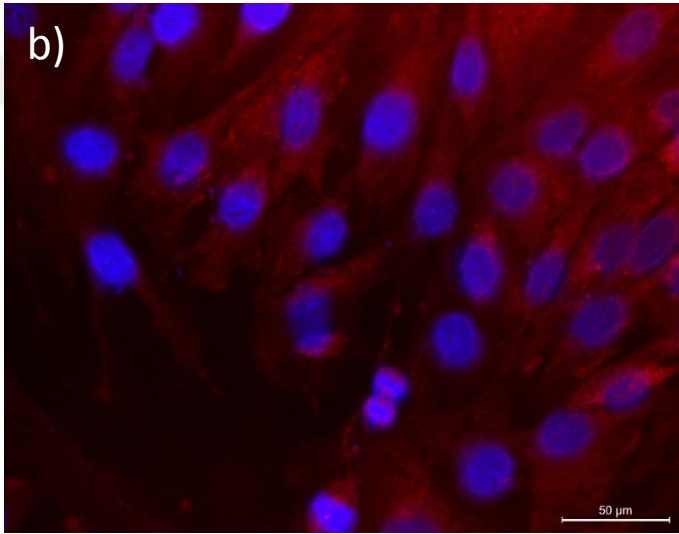
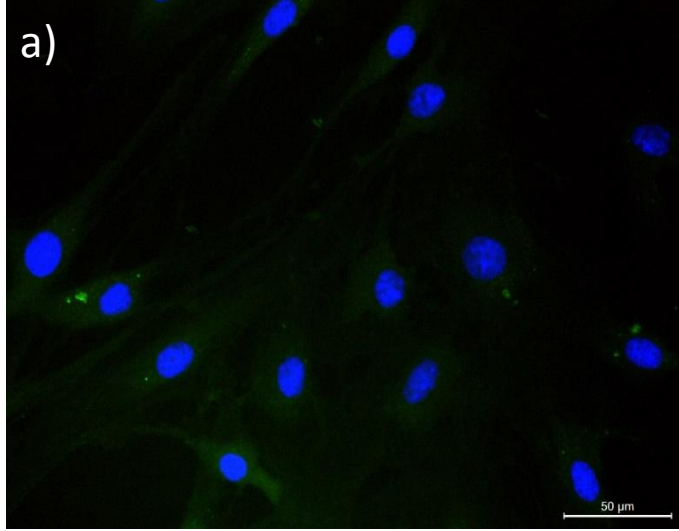
#### 4.2. İKİ-MKH'lerin Kültürü ve Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler daha önce etik kurulu alınmış KÖGEM'e ait hücre stoğundan kullanılmıştır. Bu hücrelerin karakterizasyonları perisitlerde olduğu gibi akış sitometrisi ve immünfloresan yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrisinde karakterizasyonlar mezenkimal kök hücre

paneliyle gerçekleştirilmiştir (Çizim 4.3). İmmünfloresan yöntemde ise mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD90, CD73 ve CD105 kullanılmıştır (Çizim 4.4).



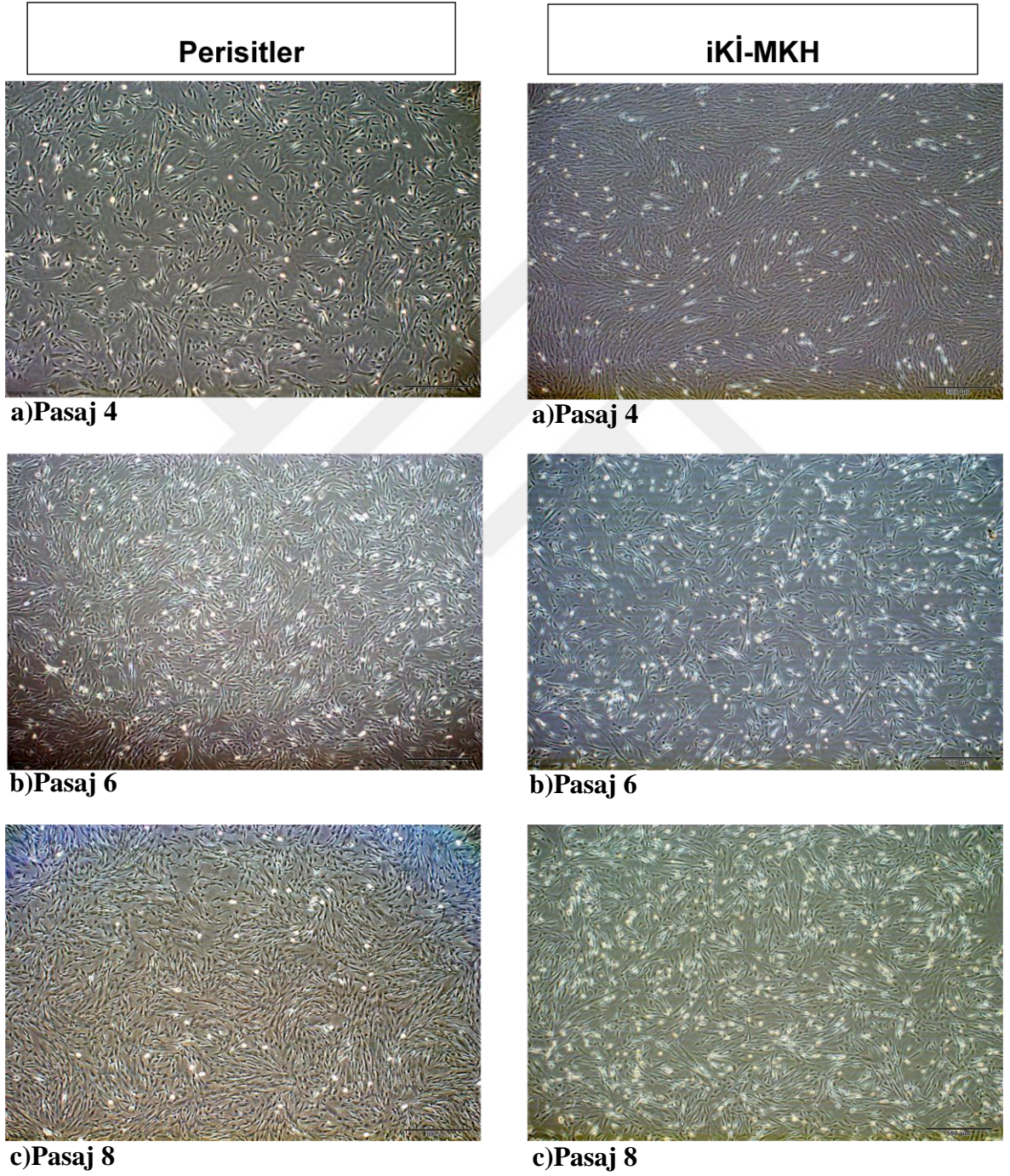
**Çizim 4.3** Akış Sitometrisi ile Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre (P4) karakterizasyonu.



**Çizim 4.4** MKH İmmunfloresan Boyamaları. a)CD73(FITC) b)CD90(TR) c)CD105(FITC)  
Çekirdek boyası: DAPI(mavi) ve Ölçüm çubuğu: 50µm.

### 4.3. iKİ-MKH'ler ile Perisitlerin Karşılaştırılması

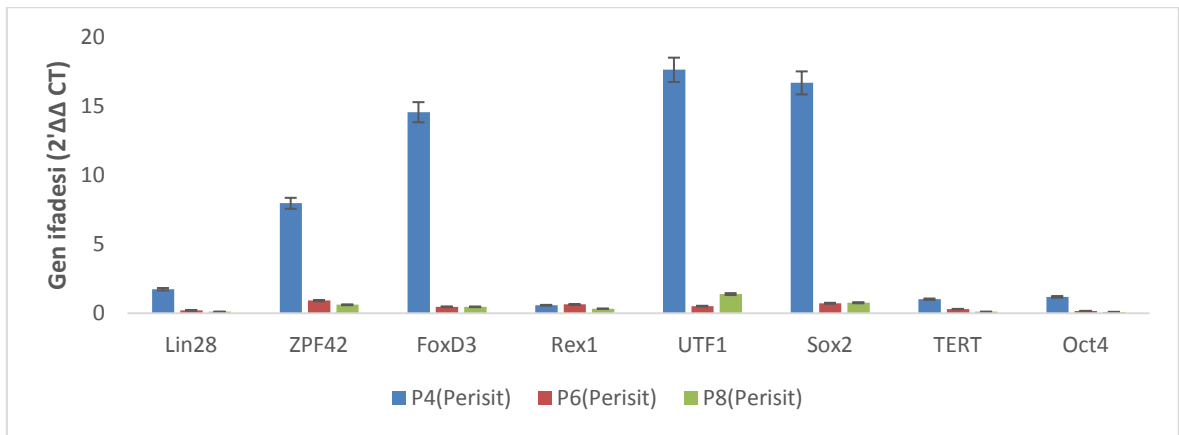
Yapılan çalışmada, insan plasenta dokusundan izole edilen perisitleri ile insan kemik iliğinden izole edilmiş olan MKH'ler 4. 6. ve 8. Pasajlarda ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (Çizim 4.5).



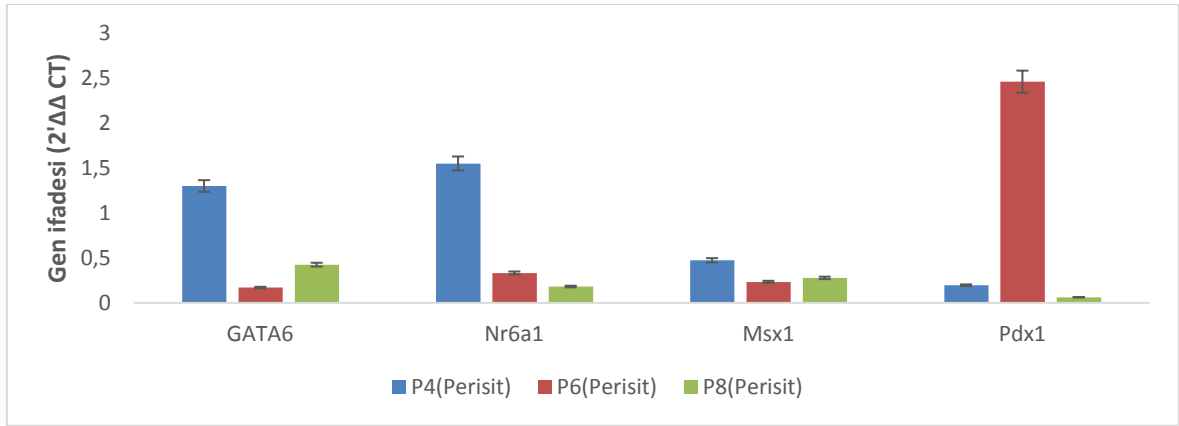
**Çizim 4.5** Perisitler ve iKİ-MKH'lerin 4., 6. ve 8.günlerdeki hücre kültür görüntüleri. Ölçüm çubuğu 500 µm.

#### 4.4. Plasental Perisitlerin ve Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Pluripotent Kapasitelerinin Karşılaştırılması

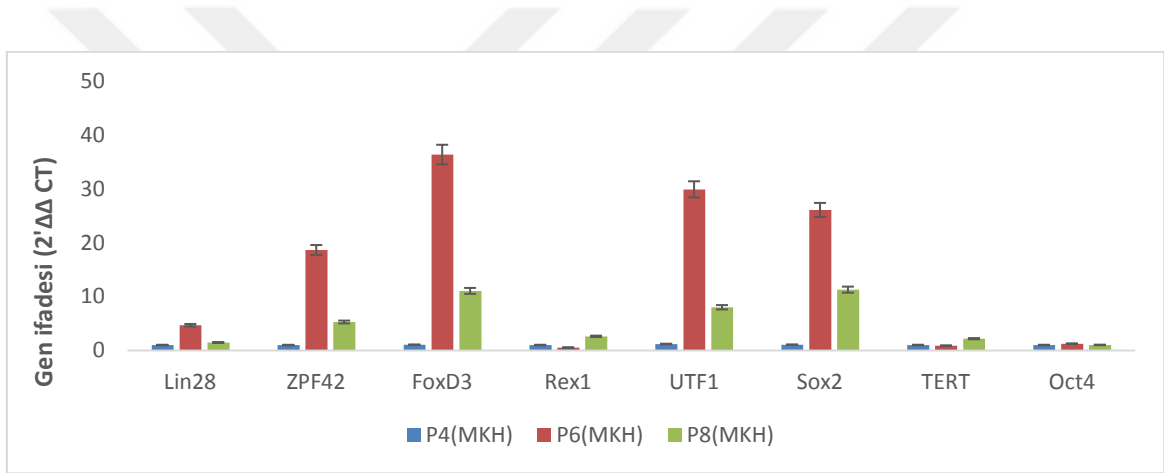
Kültürde davranışları izlenen perisitlerin çoğalma kapasitelerinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden bu hücrelerin pluripotent özellik gösterebileceği düşünülmüştür. Çizim 4.5'te gözlemlenebileceği gibi hücrelerin morfolojilerinde kültür ortamında pasaj ilerledikçe anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu gözlemin sonunda hücrelerin mezenkimal kök hücrelerle pluripotent özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Böylece hangi hücre tipinin daha iyi çoğalma ve daha fazla hücre tipine farklılaşabilme özelliği gen düzeyinde gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada iKİ-MKH'lerin plasental perisitlerle pluripotensilerinin karşılaştırılması amacı ile pluripotensi özellikleri gösteren genlerin hücre bazında üretimine bakılmıştır. Bu amaçla hücreler farklı pasajlarda gen ekspresyon analizi için toplanmıştır. Bu deney için pasaj 4, pasaj 6 ve pasaj 8 hücreleri gen ekspresyon analizi için seçilmiştir. Gen ekspresyon paneli olarak Lin 28, ZPF42, GATA6, Pdx1, Oct4, Msx1, Nr6a1, TerT, Sox2, UTF1, Rex1 ve FoxD3 seçilmiştir. Analiz sonuçları perisit ve kemik iliği mezenkimal kök hücre için ayrı ayrı yapılmıştır. Her iki hücre tipinde de farklı pasajlardaki gen ekspresyon analizleri gözlemlenmiştir. Plasental perisitlerin pluripotensi ve farklılaşma gen ekspresyon analizleri Çizim 4.5' te ve Çizim 4.6'da gösterilmiştir. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin pluripotensi ve farklılaşma gen ekspresyon analizleri ise Çizim 4.8'te ve Çizim 4.9'da gösterilmiştir. Ayrıca hem perisitlerde hem de iKİ-MKH'lerde PDGFRB gen ekspresyon analizleri Çizim 4.10'da gösterilmiştir.



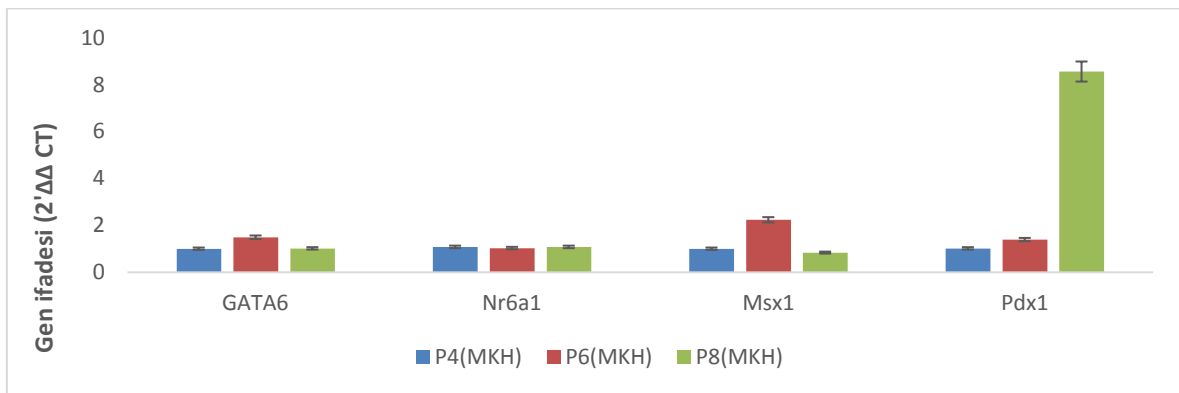
**Çizim 4.6** İlerleyen pasajlarda perisitlerdeki pluripotensi gen ifadelerinin analizi.



**Çizim 4.7** İlerleyen pasajlarda perisitlerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi.

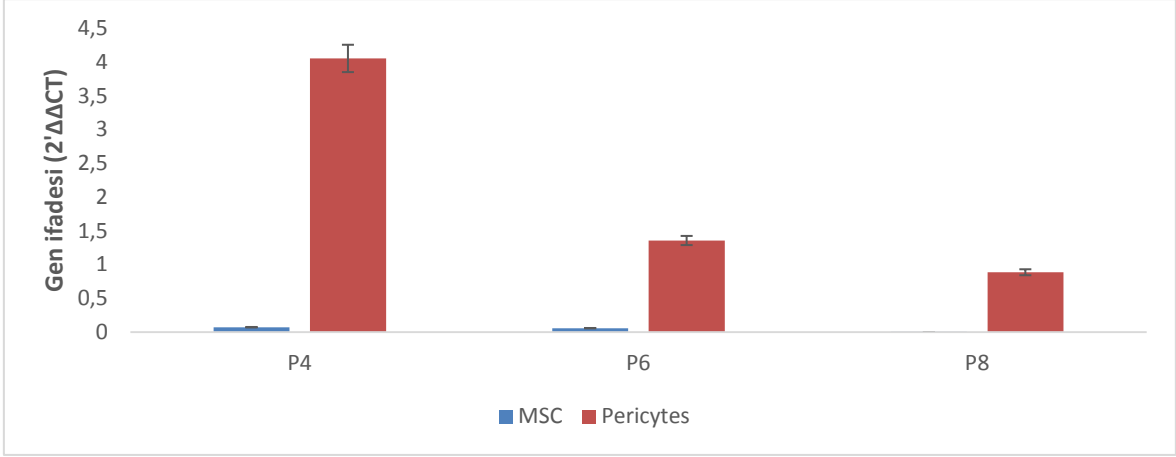


**Çizim 4.8** İlerleyen pasajlarda iKİ-MKH pluripotensi gen ifadelerinin analizi.



**Çizim 4.9** İlerleyen pasajlarda perisitlerin farklılaşma gen ifadelerinin analizi.





**Çizim 4.10** İlerleyen pasajlarda perisitlerin ve iKİ-MKH'larda PDGFRB gen ifadelesi analizi.

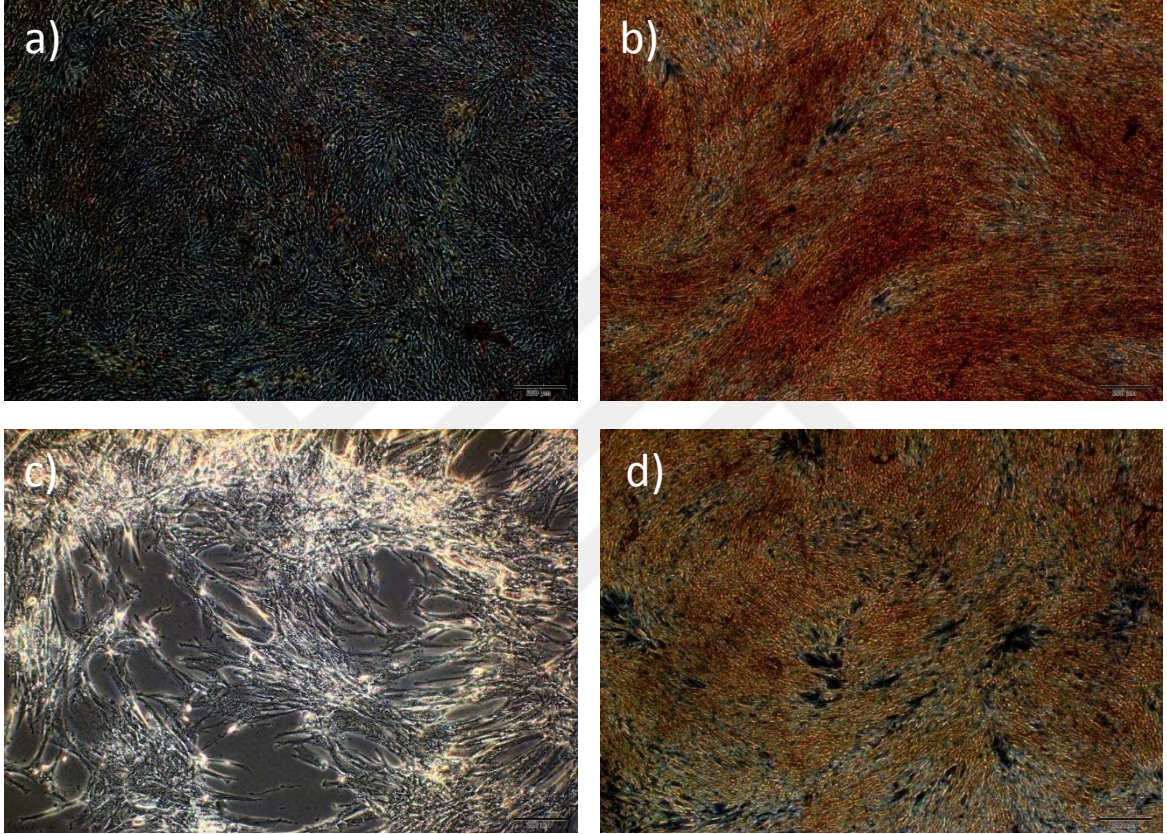
Plasental perisitlerin pasaj 4'teki Lin28, ZPF42, GATA6, FoxD3, UTF1, Sox2, TerT, Nr6a1, Oct4 gen ekspresyonlarında anlamlı bir yükseklik gözlemlenmiştir. Ayrıca perisit belirteci olan PDGFRB gen ekspresyonu perisitlerde her pasajda gözlemlenmiştir. Bu da elde edilen hücrelerin perisit özelliklerinin ilerleyen pasajlarda da devam ettiğini göstermektedir.

Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin pluripotensi gen ekspresyonlarının pasaj 6'da daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Pasaj 6'da mezenkimal kök hücrelerin Lin28, ZPF42, FoxD3, UTF1 ve Sox2 gen düzeylerinde anlamlı bir yükselme gözlemlenmiştir. Pdx geninde ise pasaj 8'de yükselme gözlemlenmiştir. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerde PDGFRB gen düzeyinde anlamlı bir yükseliş gözlemlenmemiştir.

#### **4.5. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Plasental Perisitlerin Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Karşılaştırılması**

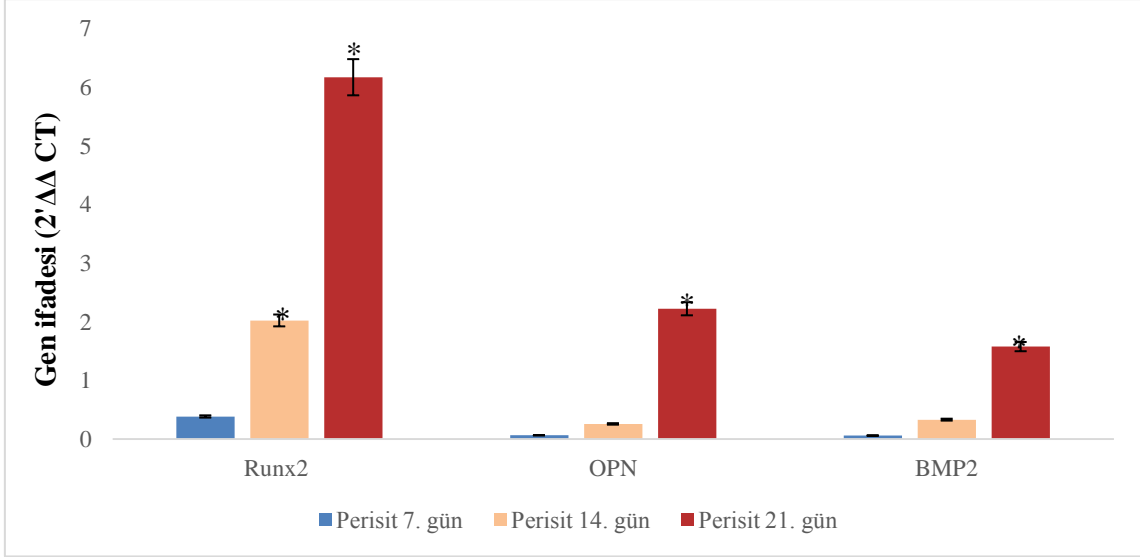
Bu çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve plasental perisitlerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılabilmesi için her iki hücre tipi de hücre kaplarına ekilmiştir. Osteojenik farklılaşma besiyerinde hücreler 21 gün kültüre edilmiştir. Bu süre zarfında 7. gün, 14. gün ve 21. günde hücreler gözlemlenmiştir. Gen ekspresyon analizi ve immünfloresan analiz için 7., 14., ve 21. günde örnekler toplanmıştır.

İmmünohistokimyasal analizler için sadece 21. örnekleri toplanmıştır. Hücre kültüründe hücrelerin osteojenik farklılaşmaya gittikleri morfolojilerindeki değişimlerle birlikte ışık mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Çizim 4.11 'de gözlemlendiği üzere osteojenik farklılaşma sırasında hücrelerin morfolojilerinde değişimler görülmüş ve hücre dışı matris yapısında birikme mevcuttur.



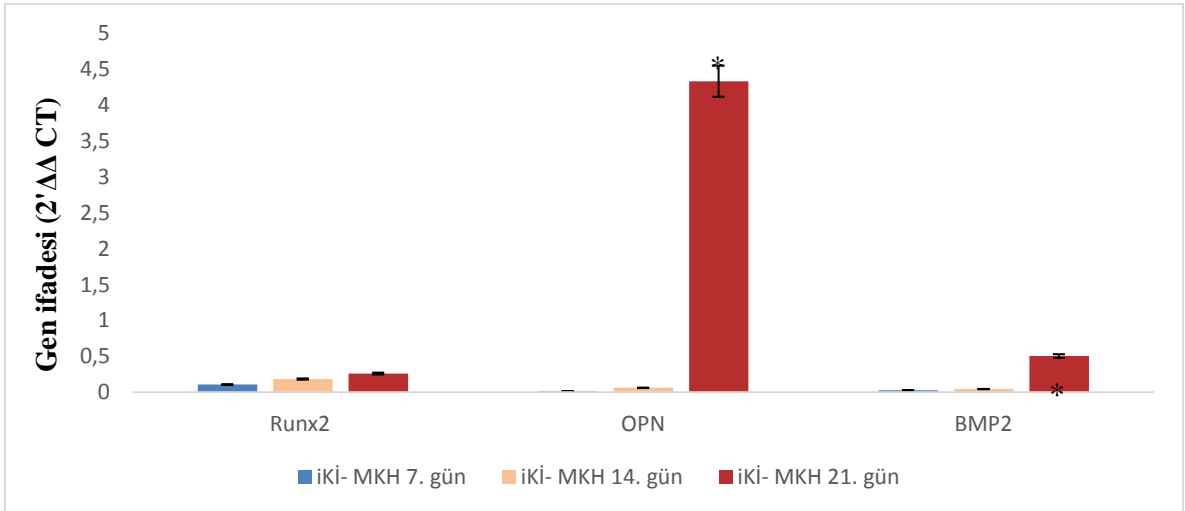
**Çizim 4.11** Perisit ve iKİ\_MKH'lerin osteojenik farklılaştırma sonrası Alizarin Red S boyamalarının görüntüleri. a) perisit kontrol, b) farklılaştırılmış perisit, c) iKİ-MKH kontrol, d) farklılaştırılmış iKİ-MKH. Ölçek çubuğu: 500µm

Hücrelerin osteojenik farklılaşmaları gen düzeyinde Runx2, Osteopontin, BMP2 ve osteonectin primerleriyle bakılmıştır. Çizim 4.12'de de görüldüğü üzere perisitlerin osteojenik farklılaşma genlerinde gün artışına bağlı olarak anlamlı bir yükseliş meydana gelmiştir.



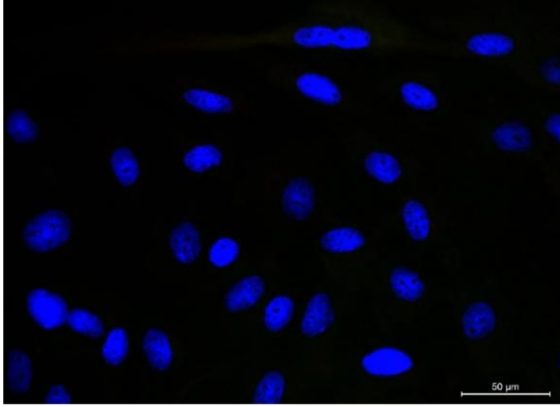
**Çizim 4.12** Perisitlerin 7., 14. ve 21. günde osteojenik gen ekspresyon analizleri ( $p<0.05$ ).

Aynı zamanda Çizim 4. 13' de de görüldüğü üzere kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin de farklılaştırmaya gittiği aynı zamanda Runx2 ve BMP2 düzeylerinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca osteopontin gen ekspresyonunun 21. Günde yükükleşi perisitlerden daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür.

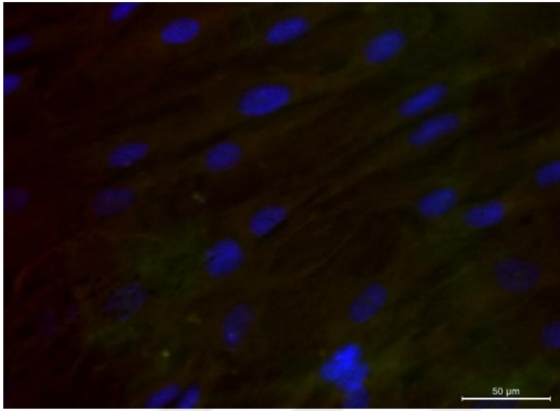


**Çizim 4.13** Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 7., 14. ve 21. günde osteojenik gen ekspresyon analizleri ( $p<0.05$ ).

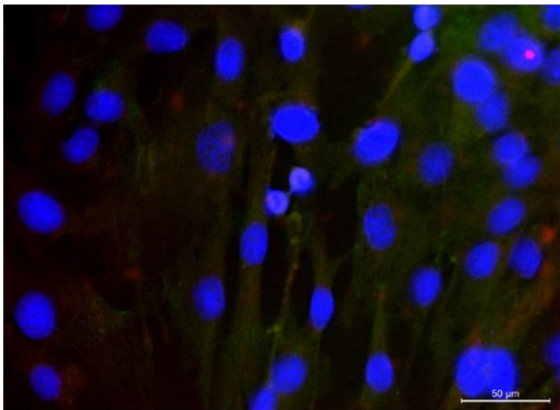
## Perisitler



a) 7. gün

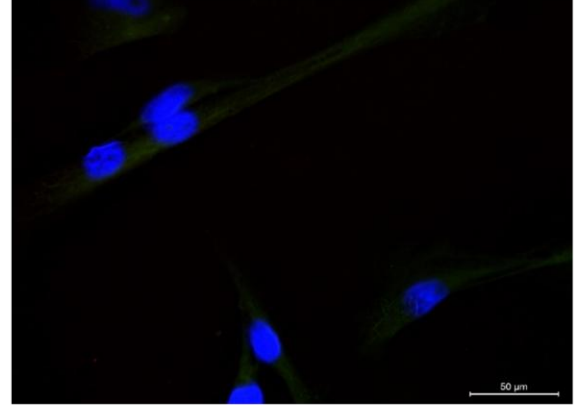


b) 14. gün

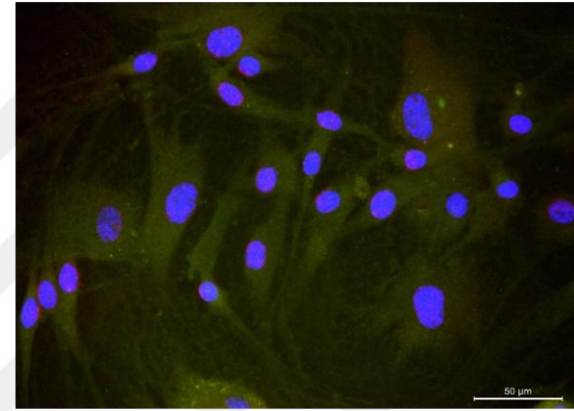


c) 21. gün

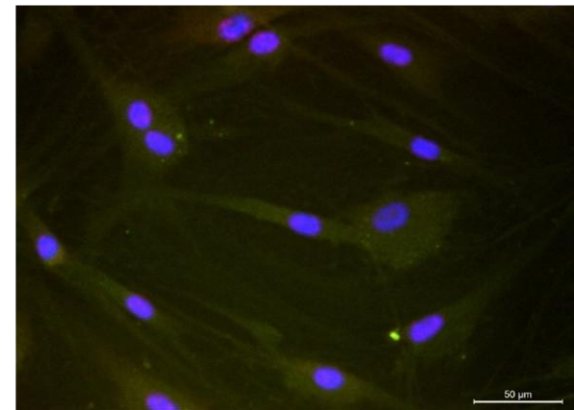
## iKİ-MKH



d) 7. gün



e) 14. gün

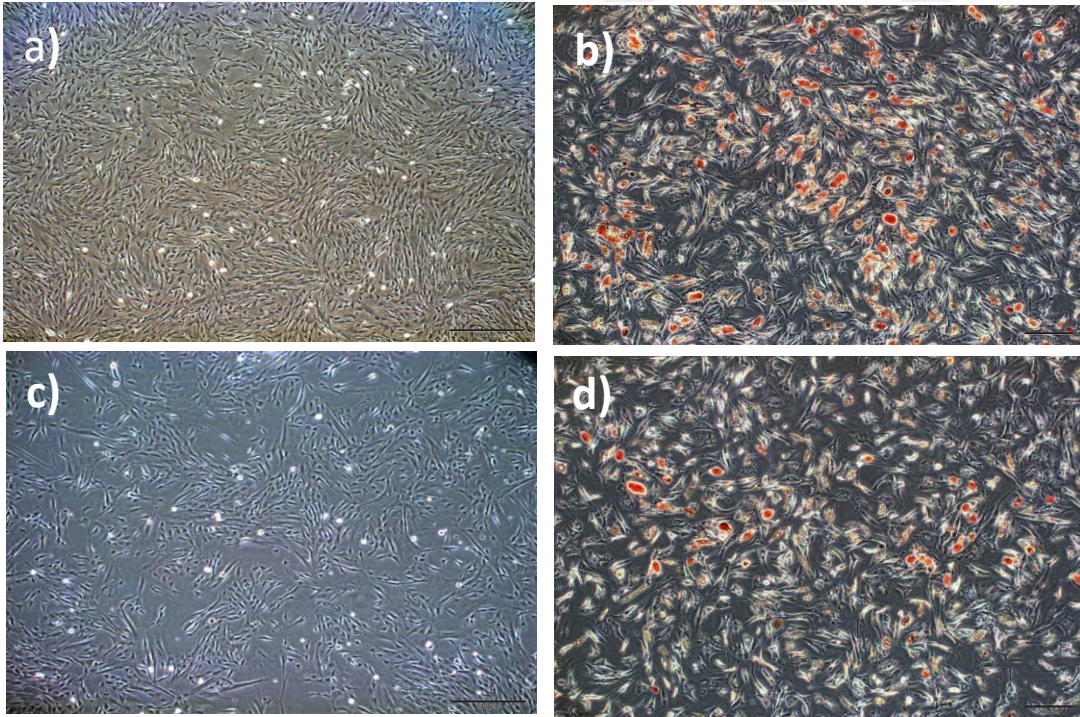


f) 21. gün

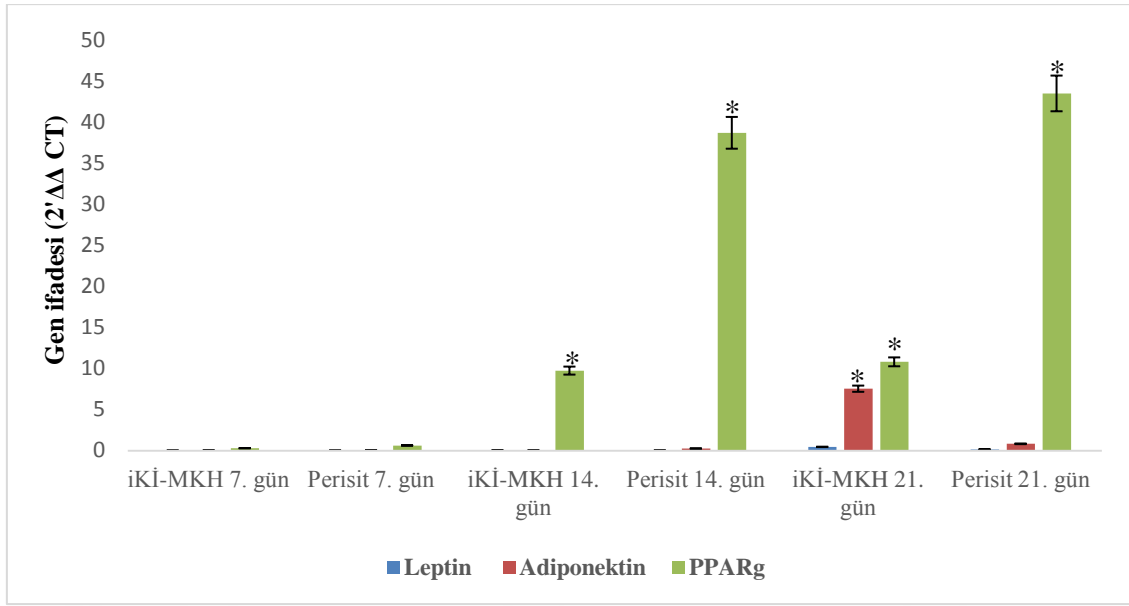
**Çizim 4.14** Plasental Perisit ve iKİ-MKH Osteojenik Farklılaşma Immunfloresan Boyamaları. a) Perisit 7. Gün Osteocalcin(FITC)+BMP2(TR) b) Perisit 14. Gün Osteocalcin(FITC)+BMP2(TR) c) Perisit 21. Gün Osteocalcin(FITC)+BMP2(TR) d) iKİ-MKH 7. Gün Osteocalcin(FITC)+BMP2(TR) e) iKİ-MKH 14. Gün Osteocalcin(FITC)+BMP2(TR) f) iKİ-MKH 21. Gün Osteocalcin(FITC)+BMP2(TR). Çekirdek boyası: DAPI(mavi) ve Ölçüm çubuğu: 50µm.

#### 4.6. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Plasental Perisitlerin Adipojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Karşılaştırılması

Bu çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve plasental perisitlerin adipojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılması için hücreler adipojenik besiyeri ile kültüre edilmiştir. Hücrelerden hem gen ekspresyon analizi için hem de immünohistokimyasal analizler için örnek toplanmıştır. Adipojenik farklılaşma 21 gün sürdürülmüştür. Kültüre edilen her iki hücre tipinin de morfolojik özellikleri belirli aralıklarla ışık mikroskopisi ile incelenmiştir. Hücrelerin çekirdek çevresindeki ve ekstraselüler matriksindeki yağ birikimleri 14. Günün sonunda gözlemlenmeye başlanmıştır. Gen ekspresyon analizleri adiponektin, leptin ve PPAR  $\gamma$  primerleri ile gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon analizleri sonucunda hem kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin hem de plasental perisitlerin gen düzeylerinde gün bazında artış gözlemlenmiştir. İmmünohistokimyasal analizlerde Oil Red O boyası kullanılmıştır. Bu boyamanın sonucunda 21. gün sonunda adipojenik farklılaşması sonucu oluşan yağ damlacıkları hücrelerin etrafında gözlemlenmiştir.



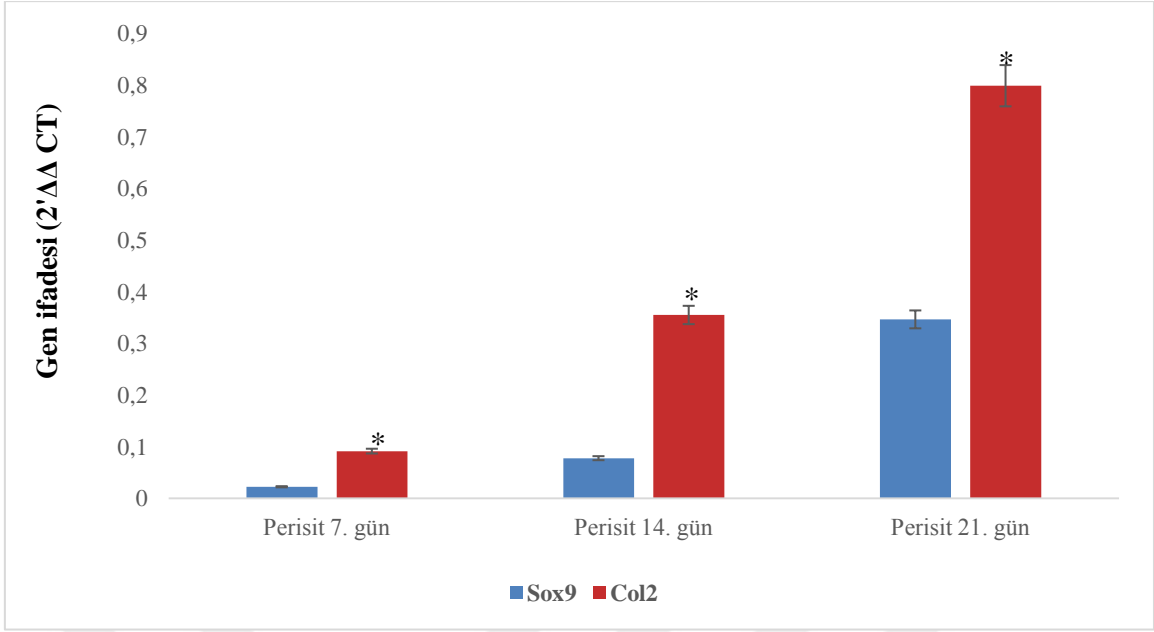
**Çizim 4.15** Plasental Perisitlerin ve iK1-MKH'ların 21. Gün Adipojenik Farklılaşma Oil Red O Boyaması. A) Plasental Perisit Kontrol, B) Plasental Perisit Adipojenik Farklılaşma 21. Gün C) iK1-MKH Kontrol, D) iK1-MKH Adipojenik Farklılaşma 21. Gün



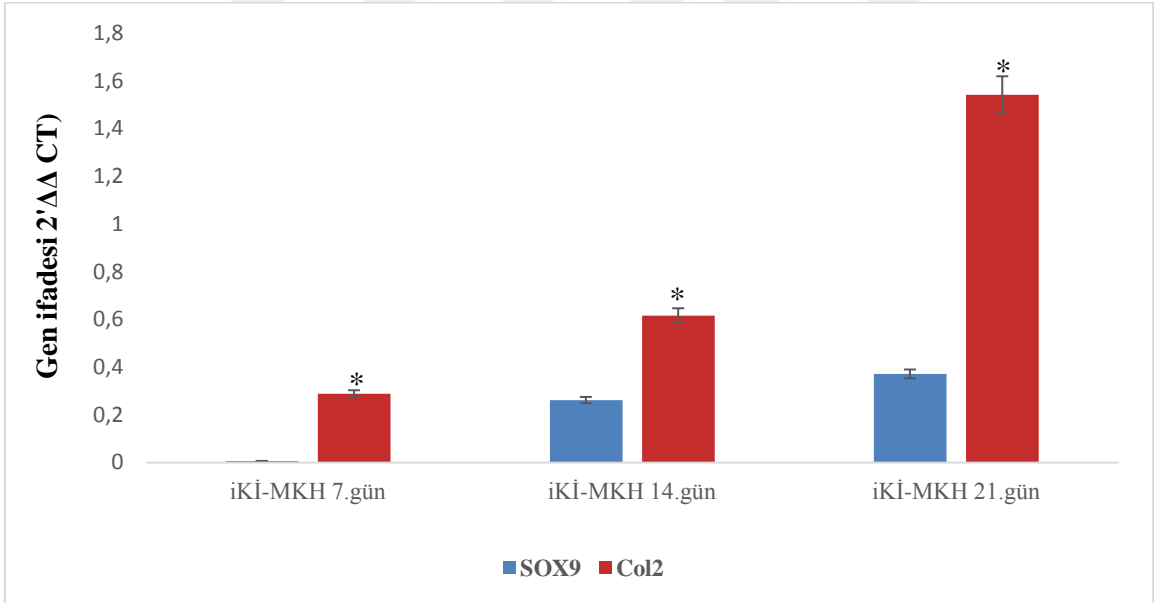
**Çizim 4.16** Plasental perisit ve iKİ-MKH hücrelerinin adipojenik farklılaşmada gen ekspresyon analizleri

#### 4.7. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Plasental Perisitlerin Kondrojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Karşılaştırılması

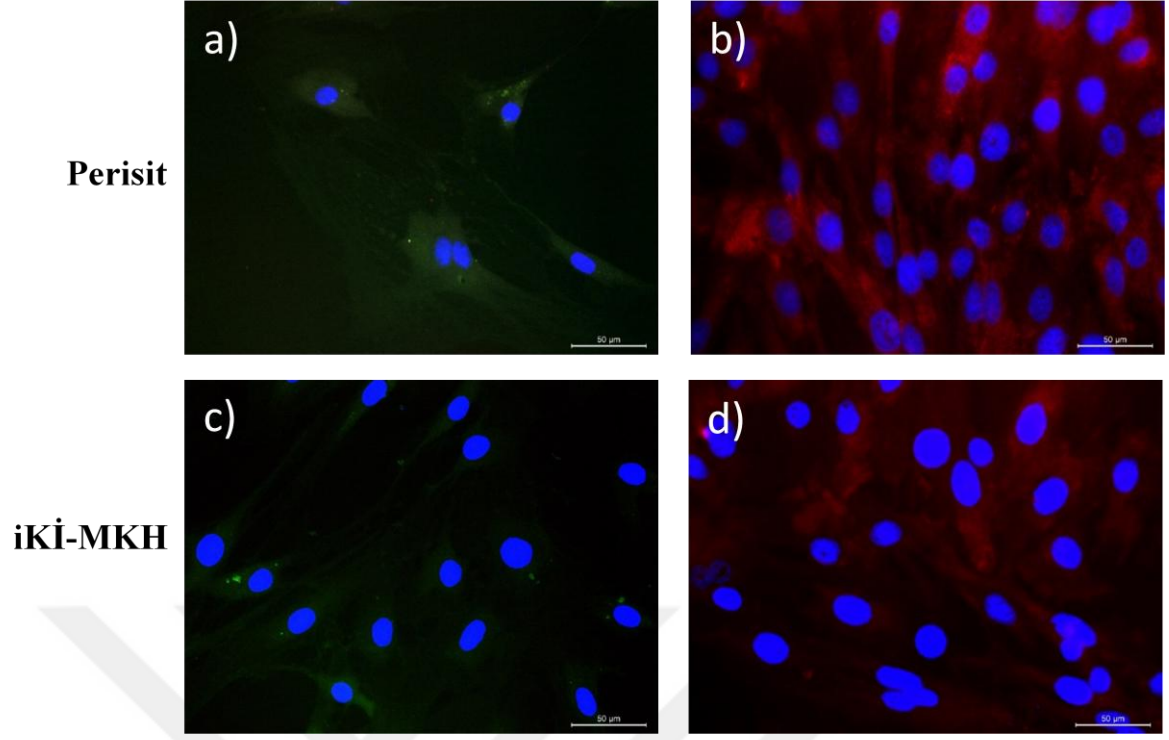
Bu çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve plasental perisitlerin kondrojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılabilmesi için hücreler kültür kabına ekilmiştir. Hücrelerden hem gen ekspresyon analizi hem de immünfloresan boyama için örnek toplanmıştır. Kondrojenik farklılaşma 14 gün sürdürülmüştür. 14 günün sonunda hem gen ekspresyonu için hem de immünfloresan için örnekler toplanmıştır. Hücrelerin morfolojilerinde kültür ortamında belirli bir değişim gözlemlenmemiştir. Gen ekspresyon analizleri Sox9 ve Kolajen 2 primerleriyle bakılmıştır. Gen ekspresyon analizlerinde hem kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin hem de plasental perisitlerin aynı seviyede artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca immünfloresan boyama ile Kolajen 2 ve Sox9 belirteçlerinin varlığı tespit edilmiştir. 14. Günün sonunda elde edilen veriler çerçevesinde her iki hücre tipinde de Sox 9 ve Kolajen 2 boyaması gözlemlenmiştir. Fakat tamamiyle bir karşılaştırma yapılması ancak gen ekspresyon analiziyle gerçekleştirilmiştir. Her iki veride de belirteçlerin gözlemlenmesi hücrelerin kondrojenik farklılaşmaya gittiğini göstermiştir.



**Çizim 4.17** Plasental perisitlerin kondrojenik farklılaşma gen ekspresyon analizleri.



**Çizim 4.18** iKİ-MKH'ların kondrojenik farklılaşma gen ekspresyon analizleri.



**Çizim 4.19** Plasental Perisit ve iKI-MKH'ların Kondrojenik Farklılaşma sonrası 21. Gün Kolajen ve SOX9 boyaması. Yeşil: Kollajen, Kırmızı: Sox9, Mavi: DAPI. Ölçüm çubuğu: 50μm.



## 5. TARTIŞMA

Günümüzde artık rejeneratif tıp ve doku onarımı alanlarındaki çalışmalarda ciddi anlamda bir yükseliş gerçekleşmiştir. Ayrıca bu alanlarda birçok kurum ve kuruluşun da katkıları yadsınamaz. Bunun sebebi ise hasar görmüş ya da tamamen kaybedilmiş doku ve organların sağlıklı bir şekilde geri döndürülebilmesinin amaçlanmasıdır. Bu çalışmalar kök hücreler yardımıyla günden güne daha da hızlanmıştır. Kök hücrelerin yeni doku ve organ yapımındaki görevleri dışardan başka kaynaktan elde edilen kök hücrelerle gerçekleştirilebildiği gibi laboratuvar ortamında üretilen kök hücrelerle de gerçekleştirilebilmektedir. Birçok çalışmada ayrıca lenfoma ve lösemi gibi hastalıkların tedavisinde hematopoetik kök hücreler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hasar görmüş organların tedavisinde mezenkimal kök hücreler yaygın olarak kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücreler yetişkin bireylerde kemik iliği, adipoz doku ve dental pulpa gibi kaynaklardan elde edilebilmesi de kolay erişilebilir olmasını sağlamaktadır.

Perisitler vücutta damar yapılarının etrafında bulunan vasküler hücre topluluklarıdır. Bu hücreler damar yapısını ve işleyişini düzenlemektedir. Bunu yaparken de endotel hücrelerle birlikte etkileşimde oldukları için sürekli bir yenilenme ve hareket halindedirler. Mezenkimal kök hücrelerin de birçok doku ve organda bulunması da bu bölgelerde acaba perisit olarak mı bulunduğu sorusunu ortaya çıkarmaktadır. Bu iki hücre tipinin kendini yenileyebilme özellikleri ve adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaya gidebilmesi bu soruyu fazlaca kuvvetlendirmektedir. Ayrıca bu iki hücre tipinde benzer hücre belirteçleri de bulunmaktadır.

Bu çalışmada her iki hücre tipinin de farklılıkları ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bunu yaparken her iki hücre tipinin farklılaşma kapasiteleri ve potensleri birbirleri ile hem gen düzeyinde hem de hücre belirteci anlamında gözlemlenmiştir. Perisitlerin elde edilmesi ve karakterizasyonunda yapılan literatür araştırmalarında her perisit tipi için farklı bir elde edilme prosedürü gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, plasentadan perisit elde edilmesi çalışmasından (Maier ve diğ. 2010) yola çıkarak kolajenaz enzimine ek olarak tripsin enzimi de çalışmada kullanılmıştır.

Ayrıca her doku ve organda hücre belirteçleri ve morfolojileri de değişim göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen perisitler insan plasentasından elde edilmiştir. Bu

dokunun seçilmesinin sebebi kan damarları açısından zengin olmasıdır. Böylece yüksek verimlilikte hücre elde edilmesi amaçlanmıştır. İzolasyon sonrasında hücreler yüksek verimlilikte elde edilmiştir. Ayrıca hücreler P3'te hem akış sitometrisinde hem de immunfloresan olarak incelenmiştir. Akış sitometrisinde perisit paneli oluşturulmuştur. Yapılan bir çalışmada (Winkler ve diğ, 2010) da PDGFR $\beta$  geninin perisit belirteci olarak gösterilmektedir. Perisit panelinde perisit belirteci olarak kullanılan CD140b(PDGFRB) yüksek miktarda gözlemlenmiştir. Ayrıca bu hücrelerin kültürde incelenmesi sonucunda pasajların ilerlemesine rağmen bölünme hızlarında bir düşüş gözlemlenmemiştir. Hücreler pasaj 8'e kadar getirilmiş fakat hücrelerin yaşlanmadıkları ve morfolojilerinde bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca hücrelerin immünfloresan boyamalarında halen perisit belirteçlerini ürettiği gözlemlenmiştir.

Mezenkimal kök hücreler ise daha önceden elde edilmiş ve KÖGEM laboratuvarında bulunan kemik iliğinden elde edilen hücrelerden kullanılmıştır. Bu hücrelerin de karakterizasyonları P3'te akış sitometrisi ve immunfloresan yöntemle yapılmıştır. Hücreler akış sitometrisinde kök hücre paneliyle karakterize edilmiştir ve hücrelerin mezenkimal kök hücre belirteçlerinin yüksek miktarda gösterdiği görülmüştür. Ayrıca immunfloresan yöntemle hücreler CD73, CD90 ve CD105 belirteçleriyle boyanmıştır. Bunun sonucunda da bu belirteçlerin pozitifliği floresan mikroskopta gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin çoğalma hızları perisitler kadar hızlı olmasa da kültürdeki devamlılıkları söz konusudur. Bu hücreler de P8'e kadar devam ettirilmiş ve morfolojileri gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin de morfolojileri P8'e kadar bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu yüzden bu iki hücrenin pluripotensi kapasiteleri gen ekspresyonuyla gözlemlenmiştir.

Bu konuda yapılan bir çalışmada (Bianco ve diğ. 2008) kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin mikrovasküler perisitlerden köken alabileceklerini öne sürmüşlerdir. Bunun sebebinin de damar yapısının gelişmiş olduğu bölgelerden elde edilen kök hücrelerin pluripotensi özelliği göstermesi olarak açıklamışlardır.

Pluripotensinin gözlemlenebilmesi için FoxD3, Rex1, UTF1, Sox2, Tert, Nr6a1, Msx1, Oct4, Pdx1, Lin 28, ZPF42 ve GATA6 genleri incelenmiştir. Pluripotensi genlerinden olan Lin28 embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenileme kapasitelerini düzenleyerek bu hücrelerin potenslerinin uzun süreli yüksek kalmasını sağlar. Bu çalışmada perisit kültüründe pasaj 4'te bu genin artışı her iki hücre grubunda da az

miktarda gözlemlenmektedir. Ayrıca mezenkimal kök hücrede bu genin pasaj 6'da artışı gözlemlenmiştir. Bu sonuçla birlikte bu hücrelerin embriyonik kök hücre kadar potenslerinin yüksek olmadığı sonucuna ulaşılabilir.

ZPF42 geni de bir diğer pluripotensi belirteçlerinden biridir. Bu genin üretilmesi pluripotenside X'e bağlı inaktivasyonun sağlanmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada mezenkimal kök hücrelerde bu gen ekspresyonu pasaj 6 da yükselme göstermekte ve daha sonra pasaj 8' de azalmaktadır. Bu da göstermektedir ki mezenkimal kök hücreler pasaj ilerlemesinde pluripotensi kapasitelerini kaybettiğini göstermektedir.

FoxD3 geni sayesinde nöral krest hücreleri nöral öncül hücrelerden farklılaşmasında görev almaktadır. Ayrıca pluripotent hücrelerin potenslerinin devamlılığının sağlanması görevleri de mevcuttur. FoxD3 geni kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrede pasaj 6'da anlamlı bir yükselme gözlemlenmiştir. Ayrıca ilerleyen pasajlarda bu genin ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak hücrelerin pluripotensi özelliklerini kaybettikleri sonucu çıkartılabilmektedir.

UTF1 gen ekspresyonu pluripotent kök hücrelerde fazla miktarda bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada da UTF1 geni hem perisitlerde hem de mezenkimal kök hücrelerde fazla miktarda üretilmektedir. Mezenkimal kök hücrelerde pasaj 6'da bu ekspresyon gözlemlenirken perisitlerde pasaj 4'de gözlemlenmiştir. Bu gen miktarı ilerleyen pasajlarda her iki hücre tipinde de azalma göstermiştir.

Sox2 ve Oct4 gen ekspresyonları da birçok çalışmada pluripotensi belirteci olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada da pluripotensilerin gözlemlenebilmesi için bu iki gen gen ekspresyon paneline eklenmiştir. Sox2 embriyonik gelişimde ve hücrelerin kök hücre özelliklerini koruması için görev almaktadır. Sox2 miktarı her iki hücre tipinde de yüksek gözlemlenmekle beraber yine pasaj ilerlemesi sonucunda düşüş gözlemlenmektedir. İki hücre tipinde de Oct 4 miktarında anlamlı bir yükseliş gözlemlenmemektedir. Oct4 de pluripotensiyi gösteren bir belirteç olmasına rağmen hem perisit hem de kemik iliği mezenkimal kök hücrelerde anlamlı olarak üretilmemiştir. Bu çalışmada kullanılan primerden kaynaklanabileceği gibi hücrelerin kendi yapısından da kaynaklanabilir. İki hücre grubunda da Rex1, Pdx1, Msx1, GATA6, Tert, Nr6a1 üretiminde anlamlı bir yükseliş herhangi bir pasajlarında gözlemlenmemiştir. Pdx1 geni pankreasın erken evre gelişiminde görev almaktadır. Msx1 vücut parçalarının oluşumunun erken evresinde görülmekteyken GATA6 ise hücrelerin farklılaşmasında görev almaktadır. Tert hücrelerin

yaşlanmasını önleyen bir gen iken Nr6a1 nöronal hücre gelişiminde ve germ hücre farklılaşmasında görev almaktadır. Bu genlerde yükselmenin gözlenmemesi hücrelerin farklılaşmaya gitmediklerini ve pluripotent özelliklerini koruduklarını göstermektedir. Perisitlerin pasaj 4'de pluripotensilerinin yüksek olması mezenkimal kök hücrelerde ise pasaj 6'da olması kültür ortamından kaynaklanan bir değişim olabileceği gibi ayrıca mezenkimal kök hücrelerin de perisitlerin pluripotensi özelliklerini gösterebildikleri gözlemlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında plasental perisitler ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılmıştır.

Osteojenik farklılaşmaya alınan hücreler belirli zaman aralıklarıyla toplanmış ve bu bağlamda farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Gen ekspresyon analizinde osteopontin, BMP2 ve Runx2 genleri kullanılmıştır. Hem perisitlerde hem de mezenkimal kök hücrelerde bu üç gen miktarı 21. Günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Ayrıca perisitlerin daha yüksek gen ekspresyonlarını 14. Günden itibaren gösterdikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca alizerin red S boyamasında mezenkimal kök hücrelere nazaran daha fazla boyamanın olması bu verileri desteklemektedir. İmmünfloresan boyamalarda kullanılan osteocalcin ve BMP2 belirteçlerinde de her iki hücre tipinde gözlemlenmesi farklılaşmanın gerçekleştiğini fakat perisitlerin osteojenik farklılaşmaya daha yatkın olduğu gözlemlenmiştir. Birbrair ve diğ. (2013) tarafından tip 1 perisitlerin adipojenik farklılaşmaya gidebildiklerini ve PDGFR $\alpha$  belirtecini gösterdikleri belirtilmiştir fakat tip 2 perisitlerin PDGFR $\beta$  belirteciye sahip oldukları ve osteojenik farklılaşmaya daha yatkın olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca Yang ve diğ. (2013) yaptığı çalışmada CD106(+) hücrelerin adipojenik farklılaşmaya daha yatkın olduğu fakat CD106(-) hücrelerin ise osteojenik farklılaşmaya daha yatkın olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da iKİ-MKH'lar ve perisitler CD106(-)'tir. Bu da osteojenik farklılaşmaya daha verimli gittiklerini göstermektedir.

Adipojenik farklılaşmaya alınan hücreler belirli zaman aralıklarıyla toplanmış ve bu bağlamda farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Gen ekspresyon analizinde leptin, adiponektin ve PPAR  $\gamma$  genleri kullanılmıştır. Hem perisitlerde hem de mezenkimal kök hücrelerde PPAR  $\gamma$  gen miktarı 21. Günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Fakat perisitlerde daha yüksek üretim gözlemlenmektedir. Ayrıca perisitlerin daha yüksek PPAR

$\gamma$  gen ekspresyonunu 14. günden itibaren gösterdikleri gözlemlenmiştir. Fakat leptin ve adiponektin genlerinin üretimi PPAR  $\gamma$  kadar fazla değildir. Adiponektin üretimi mezenkimal kök hücrenin 21. Gün analizinde görülse de perisitlerde mezenkimal kök hücreler kadar yüksek değildir. Ayrıca oil red o boyamasında mezenkimal kök hücrelere nazaran daha fazla boyamanın olması bu verileri desteklemektedir.

Kondrojenik farklılaşmaya alınan hücreler belirli zaman aralıklarıyla en ekspresyonu için toplanmıştır. İmmunfloresan boyamalar ise sadece 21. Gün plasental perisit ve kemik iliği mezenkimal kök hücrede gerçekleştirilmiştir. Bu sayede kondrojenik farklılaşma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Gen ekspresyon analizinde SOX9 ve Kolajen 2 genleri kullanılmıştır. Aynı zamanda immünfloresan boyamada da bu iki gen hücre belirteci olarak bakılmıştır. Hem perisitlerde hem de mezenkimal kök hücrelerde bu iki gen miktarı 21. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Rock ve diğ.(2004) yaptığı çalışmada perisitlerin kondrojenik farklılaşmaya yüksek verimlilikte gittiğini gözlemlemiştir. Mezenkimal kök hücreler ve perisitler arasındaki fark ise anlamlı olarak kabul edilmemektedir. Ayrıca mezenkimal kök hücreler ve plasental perisitler immünohistokimyasal olarak SOX9 ve Kolajen 2 ile boyanmıştır. Her iki hücre tipinde de SOX9 ve Kolajen 2 üretimi gözlemlenmiştir. Yüksek verimliliğin kondrojenik farklılaşmada gözlemlenmemesinin çözümü olarak kullanılan malzemelerin tekrardan gözden geçirilmesi gerekliliği ortaya konulmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hem perisitlerde hem de mezenkimal kök hücrelerde adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma gerçekleşmiştir. Bu çalışmada amaçlanan mezenkimal kök hücreye alternatif bir kaynak bulma perisitlerin mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşma özelliklerini göstermesiyle birlikte kuvvetlendirilmiş olmaktadır. Ayrıca perisitlerin pluripotent özellik göstermeleri ve pasaj ilerledikçe çoğalma kapasitelerinin düşmemesi hem rejeneratif tıpta hem de birçok hastalığın tedavisinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Sonuç olarak elde edilen perisitler mezenkimal kök hücrelerle benzer özellik göstermektedir. Daha sonraki çalışmalarda perisitler nörojenik farklılaşma gibi daha farklı dokulara da farklılaştırılabilirler. Ayrıca MKH'lar ve perisitlerin arasındaki farkların hem gen düzeyinde hem de hücre yüzeyi tanımlamada ortaya konulabilmesi için hem transkriptomik hem de proteomik çalışmalar yapılmalıdır.

## KAYNAKÇALAR DİZİNİ

- Armulik A, Abramsson A ve Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005 16;97(6):512-23.
- Armulik A, Abramsson A ve Betsholtz C. Identity and Characteristics of Pericytes and Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 2005;97(6):512-23.
- Armulik A, Genové G, Mäe M ve diğ. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010 Nov 25;468(7323):557-61.
- Bianco P, Robey PG ve Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2:313–319.
- Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, ve diğ. Skeletal Muscle Pericyte Subtypes Differ in their Differentiation Potential. *Stem Cell Res.* 2013 Jan; 10(1): 67–84.
- Caplan, A.I. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell.* 2008. 3, 229-230.
- Dai M, Nuttall A, Yang Y ve diğ. Visualization and contractile activity of cochlear pericytes in the capillaries of the spiral ligament. *Hear. Res.* 2009. 254, 100–107.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF ve diğ. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996 27;87(7):1161-9.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF ve diğ. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol.* 2009;24(7):909-69.
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM ve diğ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development.* 1995;121(6):1845-54
- Eberth, C.J. *Handbuch der Lehre von der Geweben des Menschen und der Tiere.* Vol 1 Leipzig. 1871.
- Falcón BL, Hashizume H, Koumoutsakos P ve diğ. Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am. J. Pathol.* 2009.175, 2159–2170.
- Gerhardt H, Wolburg H ve Redies C. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn.* 2000;218(3):472-9.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S ve diğ. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 2002 2;21(7):1743-53.
- Lan Y, Liu B, Yao H ve diğ. Essential role of endothelial Smad4 in vascular remodeling and integrity. *Mol Cell Biol.* 2007;27(21):7683-92.
- Lan Y, Liu B, Yao H ve diğ. Essential role of endothelial Smad4 in vascular remodeling and integrity. *Mol Cell Biol.* 2007;27(21):7683-92
- Levéen P, Pekny M, Gebre-Medhin S ve diğ. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 1994 Aug 15;8(16):1875-87.
- Maier C, Phil M, Shepherd B ve diğ. Explant Outgrowth, Propagation and Characterization of Human Pericytes. *Microcirculation.* 2010 Jul; 17(5): 367–380.
- Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., ve Silberstein, L.E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011. 12, 126–131.
- Olson, LE ve Soriano P. PDGFRb signaling regulates mural cell plasticity and inhibits fat development. *Dev Cell.* 2011 14;20(6):815-26.

- Paquet-Fifield S, Schlüter H, Li A ve diğ. A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2795-806.
- Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C ve diğ. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med*. 2004;10(9):974-81.
- Rock FC, Crofts NJ, Doherty MJ ve diğ. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation*. 2004 Oct 12;110(15):2226-32.
- Rouget, C. Memoire sur le developement, la structures et les proprietes des capillaires sanguins et lymphatiques. *Archs Physiol Norm Pathol*. 1873. 5, 603–633.
- Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF ve diğ. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest*. 2002;82(4):387-401.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V ve diğ. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 11;3(3):279-88.
- Urness, LD, Sorensen, L, ve Li, DY, Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*. 2000;26(3):328-31.
- Wang, L., ve Dudek, S.M. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. *Microvasc Res*. 2009;77(1):39-45.
- Winkler E, Bell R ve Zlokovic B, Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Molecular Neurodegeneration* . 2010 5:32.
- Wurdak H., et al. Inactivation of TGFbeta signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. *Genes Dev*. 2005;19:530 –535.
- Yang ZX, Han ZB, Ji YR, ve diğ. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *PLoS One*. 2013;8(3):e59354.
- Zimmermann, KW Der feinere bau der blutcapillares. *Z. Anat. Entwicklungsgesch*. 1923. 68, 3–109.



## ÖZGEÇMİŞ

### 1. Bireysel Bilgiler

**Adı Soyadı:** Selen POLAT  
**Doğum yeri ve tarihi:** Kırıkkale 16.02.1991  
**Uyruğu:** T.C.  
**Medeni durumu:** Evli  
**İletişim adresi:** Gezenfer Bilge Bulvarı Tuana Sitesi C-1 Blok  
Daire:31 İzmit – KOCAELİ  
**Telefon:** 0530 941 8801

### 2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

**09.2015-Devam ediyor** **Yüksek Lisans**  
Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre AD.  
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı  
Kocaeli – TÜRKİYE

**09.2009-09.2014** **Lisans**  
Boğaziçi Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Bölümü  
İstanbul-TÜRKİYE

**09.2007-06-2009** **Lise**  
Ayrancı Anadolu Lisesi  
Fen Bilimleri

Ankara – TÜRKİYE

09.2005-06.2007

Bülent Ecevit Anadolu Lisesi

Fen Bilimleri

Lefkoşa-KIBRIS

**Yabancı Dili:** İngilizce

### 3. Bilimsel Etkinlikler

#### a) Uluslararası ve Ulusal bilimsel etkinliklere poster ve sözlü bildiriler

1. SELEN POLAT, YUSUFHAN YAZIR, GÜLAY ERMAN, LEYLA KAYIŞ, GÖKHAN DURUKSU, Plasental Perisit İzolasyonunda Alternatif Bir Yöntem, XIII THED Ulusal Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, [https://docs.wixstatic.com/ugd/e31f1d\\_2e722159edbd4d95beb1b7cd4a112a58.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/e31f1d_2e722159edbd4d95beb1b7cd4a112a58.pdf), 264.
2. SELEN POLAT, YUSUFHAN YAZIR, BÜŞRA ÖNCEL DUMAN, ALPARSLAN OKÇU, GÖKHAN DURUKSU, Comparison of Pluripotency Capacity Between Perciytes and Mesenchymal Stem Cells, Sözlü Sunum, IV. International Congress on Applied Biological Sciences, 3-5 Mayıs 2018.
3. Y. YAZIR, S. RENÇBER, G. GACAR, A. AYTEKİN, S. ÖNDER & T. UTKAN, Isolation Of Polysaccharides From The Fruit Bodies Of *Pleurotus Ostreatus* (oyster Mushroom) And Characterization Of Their Effect On Cell Proliferation, Poster Sunumu, 15th International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry (ichc 2017), 18 Mayıs 2017, 21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ichc.PP-15, 426-426.
4. A. ACIKSARI, G. TURAC, S. POLAT, G. DURUKSU, G. GACAR, G. ERMAN & Y. YAZIR, A Novel Isolation Method for Rat Brain Pericytes and Their Characterization, Poster Sunumu, 15th International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry (ichc 2017), 18 Mayıs 2017, 21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ichc.PP-15, 219 - 219.
5. G. DURUKSU, S. POLAT, L. KAYIŞ, N. EKİMCİ GÜRÇAN, G. GACAR & Y. YAZIR, Encapsulation Of Beta Cell Line, Brn-bd11, In Platelet-rich Plasma - Calcium Alginate/poly-l-histidine/alginate Microbeads, Poster Sunumu, 15th

International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry (ichc 2017), 18 Mayıs 2017, 21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ichc.PP-15, 169 - 169.

**b) Makaleler**

1. Yusufhan Yazir, Selen Polat, Tijen Utkan, Feyza Arıcıoğlu, Role of the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats, Psychiatry and Clinical Psychopharmacology, 16 Mayıs 2018, <https://doi.org/10.1080/24750573.2018.1471883>



## EKLER

### Ek 1. İnsan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri ve Plasental Perisitlerin kullanımı için etik kurul onay belgesi

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2017/8.37 Proje No: 2017/179 Tarih: 07/06/ 2017								
	Doç. Dr. Yusufhan YAZIR sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*								
Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi								
<b>Etik Kurul Üyeleri</b>									
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	İLİŞKİLİ
Yrd. Doç. Dr. Aslihan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
* Gerekçe ve öneriler:									
KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu					Onay formu				

### Tez Denetleme Listesi

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

... / ... / 2018

Doç. Dr. Yusufhan YAZIR