

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HÜCRE TABAKA MÜHENDİSLİĞİ İLE GÖBEK KORDONU
PERİSİTLERİNDEN ÜÇ BOYUTLU DAMAR GREFTİ ELDESİ

Beyza GÖKÇINAR YAĞCI

Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2018

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HÜCRE TABAKA MÜHENDİSLİĞİ İLE GÖBEK KORDONU
PERİSİTLERİNDEN ÜÇ BOYUTLU DAMAR GREFTİ ELDESİ

Beyza GÖKÇINAR YAĞCI

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK

ANKARA

2018

ONAY

Hücre Tabaka Mühendisliği ile Göbek Kordonu Perisitlerinden Üç Boyutlu Damar
Grefti Eldesi
Beyza GÖKÇINAR YAĞCI

Bu çalışma 19/01/2018 tarihinde, jürimiz tarafından "Kök Hücre Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Fahriye Duygu Çetinkaya
(Hacettepe Üniversitesi) 

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Betül Çelebi Saltık
(Hacettepe Üniversitesi) 

Üye: Prof. Dr. Petek Korkusuz
(Hacettepe Üniversitesi) 

Üye: Yard. Doç. Dr. Mustafa Özgür Öteyaka
(Eskişehir Osmangazi Üniversitesi) 

Üye: Yard. Doç. Dr. Dilara Akçora Yıldız
(Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi) 

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

25 Ocak 2018



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

X Tezimin/Raporumun 19/01/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

19/01/2018

Beyza GÖKÇINAR YAĞCI



ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Yrd. Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTIK danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Beyza GÖKÇINAR YAĞCI

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez konumun belirlenmesi sırasında bilgi ve fikirlerini benimle paylaşan, tüm tez çalışmam boyunca birikimleri ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, karşılaştığım zorluklarda benden desteğini hiç esirgemeyen, en önemlisi her koşulda hakkımı savunan değerli tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK' a minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecine başladığım andan bu yana bana inanıp, beni Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi ailesine kabul eden, kurduğu bu merkezde tez araştırmalarımı yapabilmemi sağlayan ve bu süreçte bana destek olan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA' ya teşekkürü bir borç bilirim. Danıştığım ve yardım istediğim her an sabırla ve ilgiyle bana kıymetli zamanını ayıran, güler yüzü, enerjisi ve samimiyetiyle her zaman güven veren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Petek KORKUSUZ' a, bu çalışmanın gerçekleştirildiği üç sene boyunca değerli bilgi ve önerilerini esirgemediğinden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Özgür ÖTEYAKA' ya, tez çalışmasının deneyleri sırasında emekleri geçen Sayın Prof. Dr. Nuhan Puralı' ya, Doç. Dr. Özgür Özyüncü' ye, Yrd. Doç. Dr. Ekim TAŞKIRAN' a, Uzm. Bio. İrem AKAR' a, Uzm. Mol. Bio. Ilgın ÇAĞNAN' a, Uzm. Bio. Nilgün YERSAL' a, Uzm. Mol. Bio. Beren KARAOSMANOĞLU' na teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim sırasında bana çok değerli bilgiler öğreten Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı' ndaki tüm saygıdeğer hocalarıma, hiç kolay olmayan bu süreçte sevinçlerime ve hüznlerime ortak olan bölümdeki tüm can arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Ve son olarak, teşekkürün en güzelini ve büyüğünü hak eden, yaşamımdaki tüm güzellikleri borçlu olduğum annem Zuhal GÖKÇINAR ve babam İhsan GÖKÇINAR' a, bu zorlu süreci sevgisi ve desteğiyle atlatmamı sağlayan hayat arkadaşım Onur YAĞCI' ya, varlıklarından her zaman güç aldığım kardeşlerim Berkay, Ceren, Gizem ve İhsan' a, bana ikinci birer anne ve baba olan sevgi dolu Nihal ve Nusret YAĞCI' ya çok teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Bu tez çalışması için maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK-3501 Kariyer Geliştirme Projesi 113S815 no' lu proje)' na ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (THD-2015-6461 ve THD-2016-10504)' ne teşekkür ederiz.

ÖZET

Gökçınar-Yağcı, B., Hücre Tabaka Mühendisliği ile Göbek Kordonu Perisitlerinden Üç Boyutlu Damar Grefti Eldesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Doktora Tezi, Ankara, 2018. Otolog damarlara erişilebilirliğin sınırlı olması ve sentetik iskelelerin sahip oldukları dezavantajlardan dolayı, koroner arter hastalıklarının tedavisi için, hücrelerin ve doğal malzemelerin birleştirilmesiyle oluşturulmuş küçük çaplı damar greftlerine (KÇDG) ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasının amacı, üç boyutlu KÇDG modeli oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda, CD146+ perisitler, insan göbek kordonu veninden izole edilerek düz kas hücrelerine ve fibroblastlara farklılaştırılmıştır. Bu hücreler, kollajen tip I/elastin/dermatan sülfat ve kollajen tip I/fibrin ile birleştirilerek sırasıyla tunika medya ve tunika adventisya-benzeri tabakalar oluşturulmuştur. Fibronektin ve heparin kaplaması sonrası, hücre tabaka mühendisliği yöntemiyle insan göbek kordon veni endotel hücreleri bu yapı üzerine ekilmiş ve tunika-intima benzeri tabaka oluşturulmuştur. İnsan göbek kordon kanı CD34+ hücreleri, trombosit yönünde farklılaştırılarak adezyon testi ile intima tabakasının anti-trombojenik özelliği gösterilmiştir. İmmün işaretleme, histokimyasal boyama, taramalı ve geçirimli elektron mikroskobu (SEM ve TEM) kullanılarak damar yapısı karakterize edilmiştir. SEM ve TEM analiziyle damar yapısında bulunan üç tabakanın varlığı, immün işaretleme ile bu tabakalarda yer alan düz kas hücreleri (α -SMA), fibroblastlar (Tenascin-C) ve endotel hücreleri (VEGFR1) gösterilmiştir. Bu tez çalışması, oluşturulacak olan doğal KÇVG'ler için, perisitlerden farklılaştırılan damar hücreleri ve doğal malzemeleri birleştirerek bir damar modeli meydana getirmesi yönünden önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: CD146+ perisitler, kollajen tip I, elastin, fibrin, hücre tabaka mühendisliği, damar doku mühendisliği

Bu tez çalışması TÜBİTAK (Proje No: 113S815) ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje Kodu: THD-2015- 6461 ve THD-2016-10504) tarafından desteklenmiştir..

ABSTRACT

Gökçınar-Yağcı, B., Generation of Three-Dimensional Vascular Graft from Umbilical Cord Pericytes Using Cell Sheet Engineering, Hacettepe University Institute of Health Sciences Stem Cell Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2018.

In the case of limited accessibility of the autologous vessels and the disadvantages of synthetic scaffolds, small-diameter vascular grafts (SDVG) made from cellularized natural scaffolds are needed for the treatment of coronary artery diseases. The aim of this thesis is to generate three dimensional SDVG model. For this purpose, CD146+ pericytes were isolated from human umbilical cord vein (HUCV) and differentiated into smooth muscle cells (SMCs) and fibroblasts. They were combined with collagen type I/elastin/dermatan sulfate and collagen type I/fibrin to form tunica media and adventitia respectively. To generate tunica intima-like layer, HUCV endothelial cells (ECs) were seeded on the construct by cell sheet engineering method after fibronectin and heparin coating. Anti-thrombogenic property of intima layer was shown by adhesion test with thrombocyte differentiated from human cord blood CD34+ cells. Characterization of the vascular construct was performed by immunolabeling, histochemical staining and scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM). SEM and TEM analysis of vascular construct revealed the presence of three histologic tunicae. The VEGFR-1 expressing ECs in tunica intima; α -SMA expressing SMCs in tunica media and the tenascin expressing fibroblasts in tunica adventitia were detected by immunolabeling. This thesis will provide a preliminary blood vessel model by combining natural scaffolds and vascular cells differentiated from pericytes for generation of fully natural SDVG.

Key Words: CD146+ pericyte, collagen type I, elastin, fibrin, cell sheet engineering, vascular tissue engineering

This thesis project was supported by TUBITAK (Project Number: 113S815), and Hacettepe University, Scientific Research Project Coordination Unit (Grant Number: THD-2015- 6461 and THD-2016-10504).

İÇİNDEKİLER

ONAY	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Mezenkimal Kök Hücreler	6
2.2. Perisitler (CD146+ Perivasküler Hücreler)	7
2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Bu Hastalıkların Tedavisi	17
2.4. Doku Mühendisliği ve Perisitler	18
2.5. Damar Doku Mühendisliği ve Perisitler	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. İnsan Göbek Kordonu Veninden CD146+ Perisitlerin İki farklı Yöntemle İzole Edilmesi ve İki Grup Hücrenin Birbirleriyle Karşılaştırmaları	30
3.1.1. CD146+ Hücre İzolasyonu	30
3.1.2. Morfolojik Analiz ve <i>Population Doubling Time</i>	33
3.1.3. Farklılaşma Analizi	33
3.1.4. Gen İfade Analizi	34
3.2. 1. Grup CD146+ Hücrelerin İleri Karakterizasyonu	35
3.2.1. Akım Sitometri Analizi	35
3.2.2. İmmünfloresan İşaretleme	37
3.3. CD146+ Perisitlerin Endotel Hücrelerine, Damar Düz Kas Hücrelerine ve Fibroblastlara Farklılaşabilme Kapasitelerinin İncelenmesi	37

3.3.1. Endotel Hücrelerine Farklılaşma	37
3.3.2. Fibroblast Farklılaşması	38
3.3.3. Düz Kas Hücrelerine Farklılaşma	39
3.4. Üç Boyutlu Damar Yapısının Oluşturulması	41
3.4.1. Düz Kas Hücreleri ve Fibroblast Tabakalarının Elde Edilmesi ve Bu Tabakaların Ekstrasellüler Matriks Proteinleriyle Bir Araya Getirilmesi (Hücre Tabaka Mühendisliği Denemesi)	42
3.4.2. Tunika Medya + Tunika Adventisya (<i>Crosslinking</i> Denemesi)	43
3.4.3. Tunika Medya + Tunika Adventisya (Silindirik Yapı Denemesi)	45
3.4.4. Tunika Medya + Tunika İntima + Tunika Adventisya (Üç Katmanlı Damar Yapısı Oluşturulması)	46
4. BULGULAR	52
4.1. İki Ayrı Yöntem ile İzole Edilen İnsan Göbek Kordonu Veni CD146+ Perisitlerin Karşılaştırılması	52
4.1.1. Morfoloji ve <i>Population Doubling Time</i>	52
4.1.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşma Kapasiteleri	52
4.1.3. İki Gruba Ait CD146+ Hücrelerin Gen İfade Profilleri	54
4.2. 1. Grup CD146+ Perisitlerin İleri Karakterizasyon Testleri	54
4.2.1. Hücreye Özgü Yüzey Belirteçlerinin Tayini- Akım Sitometri Analizi	54
4.2.2. Hücreye Özgü Belirteçlerin Tayini – İmmünfloresan İşaretleme	55
4.3. Perisitlerin Damar Hücre Tiplerine Farklılaşma Kapasiteleri	56
4.3.1. Endotel Hücreleri Farklılaşması	56
4.3.2. Fibroblast Farklılaşması	56
4.3.3. Düz Kas Hücreleri Farklılaşması	58
4.4. Üç Boyutlu Damar Modeli Oluşturulması ve Karakterizasyonu	63
4.4.1. Birinci Yöntemle Elde Edilen Model	63
4.4.2. İkinci Yöntemle Elde Edilen Model	64
4.4.3. Üçüncü Yöntemle Elde Edilen Model	65
4.4.4. Dördüncü Yöntemle Elde Edilen Model	66
5. TARTIŞMA	74

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	86
7. KAYNAKLAR	88
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni - 1	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni - 2	
EK-3: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni - 3	
9. ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER ve KISALTMALAR

3B	Üç Boyutlu
ABB	<i>Annexin Binding Buffer</i>
ALK5	<i>Activin-Like Kinase Receptor</i>
Ang1	<i>Angiopoietin 1</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP4	<i>Bone Morphogenic Protein 4</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
Cp	<i>Crossing point</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CXCL12	<i>C-X-C Motif Chemokine</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-HG	<i>DMEM High Glucose</i>
DMEM-LG	<i>DMEM Low Glucose</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDC	<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylamino) Propyl Carbodiimide</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGM	<i>Endothelial Growth Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FM	Fibroblast Farklılaşma Besiyeri
GK	Göbek Kordonu
HE	<i>Hematoxylin – Eosin</i>

hUASMC	<i>human Umbilical Artery Smooth Muscle Cell</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
KAH	Koroner Arter Hastalıkları
Kİ	Kemik İliği
KVH	Kardiyovasküler Hastalıklar
L-AA	<i>L-ascorbic Acid</i>
M1	Besiyeri 1
M2	Besiyeri 2
M3	Besiyeri 3
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAP-1B	<i>Micrutubule Associated Protein-1B</i>
MES	<i>2 -Morpholinoethane Sulphonic Acid,</i>
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
MNH	Mononükleer Hücre
NG-2	<i>Neuron-Glial 2</i>
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimide,</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF-B	<i>Platelet Derived Growth Factor B</i>
PDGFR-β	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor beta</i>
PDT	<i>Population Doubling Time</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PEDF	<i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i>
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
PGM	<i>Pericyte Growth Medium</i>
PNIPAAm	<i>poly N-isopropylacrylamide</i>
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RGS-5	<i>Regulator of G Protein Signaling 5</i>
RNA	<i>Ribonucleicacid</i>
S1P	<i>Sphingosine 1-Phosphate</i>

S1P1	<i>Endothelial Differentiation Gene</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SM22a	<i>Smooth Muscle Protein 22-alpha</i>
SMCM	<i>Smooth Muscle Cell Basal Medium</i>
SM-MHC	<i>Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
Tie2	<i>Receptor Tyrosine Kinase of the Tie Family</i>
TPO	<i>Thrombopoietin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>VEGF Receptor</i>
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>
WST-1	<i>Water Soluble Tetrazolium-1</i>
α-MEM	<i>Alpha Minimum Essential Medium</i>
α-SMA	<i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Perisitlerin büyük ve küçük çaplı damarlar üzerindeki yerleşimleri.	9
2.2. İnsan göbek kordonunun yapısı.	14
2.3. Hücre tabaka mühendisliği.	28
3.1. Perisitlerin, insan göbek kordonu veni etrafından enzimatik yıkım tekniğiyle izole edilmesini gösteren aşamalar.	31
3.2. Hücre tabaka mühendisliği yaklaşımıyla damar modeli oluşturulması.	43
3.3. İki katmanlı damar modeli oluşturma denemesi.	45
3.4. Üç tabakalı damar modelinin oluşturulmasındaki ana basamaklar.	49
4.1. İki farklı yöntemle izole edilen insan göbek kordon veni perisitlerinin PGM (1. Grup) ve zenginleştirilmiş DMEM-HG (2. Grup) ile kültürleri sonucu iğ biçimli morfolojik görünüşleri ve <i>population doubling time</i> grafiği.	53
4.2. İki gruba ait insan göbek kordon veni perisitlerinin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin oil red O ve alizarin kırmızısı boyama yöntemleriyle test edilmesi.	53
4.3. Perisitlerin karakterizasyonunda akım sitometri analizleri.	55
4.4. Perisitlerin immünsitokimyasal karakterizasyonu.	56
4.5. Endotel hücresi farklılaşma prosedürü sonrası perisitlerin CD31, VEGFR-1 ve VEGFR-2 yüzey belirteci ifadelerinin akım sitometri analizleri.	57
4.6. HUVEC'lerin yüzey belirteci ifadelerinin akım sitometri analizleri.	57
4.7. CD146+ perisitlerin fibroblast farklılaşma sonuçları.	58
4.8. Perisitlerin normoksik ve hipoksik ortamda inkübasyonları sonrasında α -SMA ifadelerinin akım sitometri analizi.	59
4.9. Perisitlerin PGM ve SMCM ile inkübasyonu sonucu caldesmon, α -SMA ve calponin ifadelerinin immünfloresan boyamayla incelenmesi.	60
4.10. Üç farklı besiyerinin (M1,M2 ve M3) insan göbek kordon veni perisitlerinin düz kas farklılaşmasındaki etkisinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi.	61
4.11. Üç farklı besiyerinin (M1, M2 ve M3) insan göbek kordon veni perisitlerinin düz kas farklılaşmasındaki etkisinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmesi.	62

- 4.12.** Dört farklı besiyerinin (M1, M2, M3 ve SMCM) insan göbek kordon veni perisitlerinin düz kas farklılaşmasındaki etkisinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmesi. 62
- 4.13.** Hücre tabaka mühendisliği yaklaşımıyla elde edilen damar modelinin ışık (sol kolon) ve elektron (sağ kolon) mikrograflar. 63
- 4.14.** Crosslinking yöntemiyle elde edilen damar adventisya modelinin HE ve Masson's Trichrome ile boyanmış mikrograflar. 64
- 4.15.** Crosslinking yöntemiyle elde edilen damar medya modelinin Annexin V ve PI boyama görüntüleri. 65
- 4.16.** Damarın orta ve dış katmanı olarak oluşturan tabakaların HE ve Mallory Trikrom ile boyalı mikrograflar. 66
- 4.17.** Akım sitometri ve Giemsa boyaması yöntemleriyle megakaryositlerin ve trombositlerin karakterizasyonu. 68
- 4.18.** HUVEC tabakası üzerinde, trombositlere özgü belirteçlerin (CD41 ve CD61) varlığının immünfloresan boyama ile test edilmesi. 69
- 4.19.** 3B damar yapısı içinde bulunan hücrelerin canlılıklarının test edilmesi amacıyla yapılan Annexin V-PI boyamasının konfokal mikroskop görüntüleri. 70
- 4.20.** 3B damar modeli. 70
- 4.21.** Histokimyasal ve immünfloresan olarak işaretlenmiş 3B damar yapısının histolojik katlarına ait mikrograflar. 72
- 4.22.** 3B damar modeline ait *scanning* ve *transmission* elektron mikrografları. 73

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Perisitlerin doku mühendisliği alanında kullanıldığı çalışmalar.	21
4.1. 1., 2. ve 3. hafta sonunda ilgili matriks proteinleri ve glikozaminoglikanlar ile kùltùre edilen proliferatif ve canlı hücrelerin oranları.	67



1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünyada meydana gelen ölümlerin ve bozulan yaşam kalitelerinin önde gelen sebebinin oluşturmaktadır (1). Koroner arter hastalığı (KAH), KVH'lerin en sık görülen tipidir ve KVH nedenli mortalitelerin başlıca nedenidir (2, 3). Günümüzde en sık uygulanan KAH tedavisi olan koroner baypas ameliyatı sırasında otolog damarlar veya protez greftler kullanılmaktadır. Otolog damarlar, tedavide altın standart olmalarına rağmen, hastanın yaşı veya hastalığının ilerlemesi nedeniyle sınırlı erişilebilirliğe sahiptir (4). Öte yandan, hasar gören bölgelerin iyileşmesinin gecikmesine neden olan inflamatuvar yanıt (5), neointimal hiperplaziye (6), ve tromboza (7) sebep olmaları nedeniyle, küçük çaplı sentetik damar greftleri klinik kullanım için uygun değildir (8). Otolog ve sentetik greftlerin sahip oldukları bu kısıtlamalar nedeniyle, klinik kullanım için tamamen doğal malzemeler ve hücrelerden oluşan küçük çaplı damar greftlerinin üretilmesine ihtiyaç vardır.

Damar doku mühendisliği yaklaşımları, doğal veya sentetik materyalleri damar hücreleriyle kullanarak damar katmanlarını taklit etmeyi amaçlamaktadır (8). Küçük çaplı damar greftleri ilk olarak, Weinberg ve Bell tarafından, kollajen jel içine gömülmüş damar düz kas hücreleri, fibroblastlar ve endotel hücreleri kullanılarak üretilmiştir (9). Benzer şekilde, Loy ve ark., düz kas hücrelerini, fibroblastları ve endotel hücrelerini kollajen jel ile kültüre ederek sırasıyla tunika medya, adventisya ve intima-benzeri tabakaları meydana getirmişlerdir (10). Kollajen tip I kullanımına alternatif olarak, jel formuna getirilen fibrin, elastin ve kollajen sentezini artırmak amacıyla kullanılmaktadır (11, 12). Buijtenhuijs ve ark., göbek kordonu kaynaklı düz kas hücrelerinin çoğaldığı ve canlılıklarını koruduğu çözünür olmayan elastin ve kollajenden oluşan tübüler formda üç boyutlu (3B) bir iskele kullanmışlardır (13). Araştırmacılar ayrıca damar greftlerin endotelizasyonunu etkinleştirmek için bazal membran yüzeyini kollajen tip IV (14), fibronektin (15) ve heparin (16, 17) ile kaplamaya çalışmaktadır. Okano ve ark. (18), akıllı polimer (poly N-isopropylacrylamide; PNIPAAm) ile kaplı sıcaklık duyarlı yüzeyleri kullanarak hücre

tabakaları elde eden hücre tabaka mühendisliği tekniğini, yakın zamanda düz kas hücreleri ve mezenkimal kök hücreler (MKH) ile damar grefti üretiminde kullanılmışlardır (19-21). Ancak, bu yöntemin endotelizasyonu sağlamak amacıyla kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

CD146+ perisitler (perivasküler hücreler), damar duvarının periferinde yerleşmiş, (22, 23) damar gelişiminde, matürasyonda, stabilitede, kan akışının ve basıncının ayarlanmasında görevlidirler (24-26). Bu hücreler, endotel hücreleriyle özel bağlantı birimleri ve parakrin sinyaller aracılığıyla ilişkiye geçer ve endotel hücrelerinin proliferasyonlarını arttırarak (27), damar greftlerinin etkin endotelizasyonunu sağlayabilirler (28). Perisitlerin MKH'lere benzer özellikleri, onların damar doku mühendisliği yaklaşımlarında, farklılaşmış olgun hücrelere göre daha çok tercih edilen bir alternatif hücre kaynağı olmalarını sağlamaktadır (29, 30). Perisitler, sıgır retinası, beyin, iskelet kası, adipöz doku, kemik iliği (Kİ), böbrek, karaciğer ve fetal dokular (plasenta, göbek kordonu) gibi bir çok damarlanmış doku ve organdan izole edilebilir (30). Göbek kordonu; kolay erişilebilir olması, tıbbi atık olarak kabul edilmesi, kullanımının etik problem yaratmaması nedeniyle, tüm bu kaynaklar arasında perisitlerin izolasyonu için en uygun kaynak olarak görülmektedir (31). Düz kas hücresi belirteçlerini ifade eden insan göbek kordonu perisitlerinin (32), insan embriyonik kök hücrelerden farklılaştırılan perisitlerin (33) ve insan iskelet kası kaynaklı CD146+ perisitlerin (34), sentetik veya doğal iskeleler ile birleştirildiği, sınırlı sayıda ve olumlu sonuçlar veren damar doku mühendisliği çalışmaları vardır (32-34). İnsan göbek kordonu veninden elde edilen ve damar tabakalarında yer alan hücrelere farklılaştırılan perisitlerin, damar tabakalarının oluşturulmasıyla ilgili henüz yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. CD146+ perisitlerin, doğal damar dokusunda yer alan insan kollajen tip I, fibrin, elastin, dermatan sülfat, heparin ve fibronektin ile birleştirildiklerinde, üç tabakalı küçük çaplı damar yapılarının oluşturulması için iyi bir hücre kaynağı olabileceklerini önermekteyiz. Bu tez çalışması, bu öneriyi test etmek üzerine kurulu bir çalışmadır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı, KVH' nin tedavisi için gerekli olan küçük çaptaki damar greftlerinin damar doku mühendisliği yaklaşımı ile oluşturulmasıdır.

Bu amaç doğrultusunda aşağıda test edilen hipotezler ve bunların hedefleri listelenmiştir:

Tezin Genel Hipotezi:

İnsan göbek kordonundan izole edilen perisitler damar tabakaları hücrelerine farklılaştırılabilir ve damar bileşeni olan insan ekstrasellüler matriks proteinleri/glikozaminoglikanlar kullanılarak, 3B ve küçük çapta (≤ 5 mm) damar greftleri oluşturulabilir.

Hipotez 1: İnsan göbek kordonu dokusundan elde edilen perisitler, damar katmanlarını oluşturan hücrelere farklılaşabilirler.

Hedefler:

- Perisitlerin insan göbek kordonu dokusundan izole edilmesi,
- Perisitlerin damar tabakalarını oluşturan hücrelere farklılaşabilme kapasitelerinin incelenmesi,
 - o Perisitlerin endotel hücrelerine farklılaştırılması,
 - o Perisitlerin damar düz kas hücrelerine farklılaştırılması,
 - o Perisitlerin fibroblastlara farklılaştırılması.

Hipotez 2: İnsan göbek kordonu dokusundan elde edilen perisitlerden farklılaştırılmış hücrelerle, damar katmanları ve ardından 3B damar greftleri elde edilebilir.

Hedefler:

- “Hücre tabaka mühendisliği” yaklaşımıyla, perisitlerden farklılaştırılan endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlardan, damarın katmanlarını oluşturan hücre tabakalarının elde edilmesi,
- Oluşturulan tabakaların doğal damar bileşeni olan ekstrasellüler matriks proteinleri (kollajen tip IV ve tip I, fibronektin, elastin) ve

glikozaminoglikanlar (dermatan sülfat ve heparin) ile ko-kültürlerinin yapılarak 3B bir yapı elde edilmesi,

- 3B damar greftinin anti-trombojenik özelliklerinin test edilmesi.

Bu hipotezleri test etmek amacıyla, tez kapsamında kullanılan perisitler, mezenkimal ve hematopoetik kök hücreler sırasıyla, insan göbek kordonu ve kordon kanından elde edildi. İnsan göbek kordonu ve kordon kanı örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan izinlerle (GO 13/417 – 27, GO 15/297 – 26 ve GO 16/213 – 13 numaralı kararlarıyla), Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Özgür Özyüncü önderliğinde komplikasyon gelişmeyen, normal gelişim süresini tamamlamış sezaryen doğum sonrası bebeklerden elde edildi (n=3-5). Tez çalışması deneyleri üç basamakta gerçekleştirildi;

Birinci basamakta; CD146+ perisitler, iki yöntem kullanılarak insan göbek kordon veni etrafından izole edildi. İki farklı tip hücre grubu; farklılaşma potansiyelleri, yüzey belirteçleri ve gen ifade profilleri yönünden karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre, perisit özelliklerini daha çok taşıyan hücre grubunun ileri karakterizasyon testleri yapıldı.

İkinci basamakta; CD146+ perisitlerin; endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücreleri gibi damarı oluşturan hücre tiplerine farklılaşma potansiyelleri incelendi. Hücre farklılaşmalarını test etmek amacıyla immünfloresan boyamalar, yüzey belirteç analizleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıldı.

Üçüncü basamakta; hipotez 2'yi test etmek amacıyla yapılması düşünülen deney basamakları gerçekleştirildi. Bu kapsamda, damarı meydana getiren "tunika adventisya", "tunika medya" ve "tunika intima" tabakalarının meydana getirilmesi amacıyla ön deneyler yapıldı. Birinci ön deneyde; hücre tabaka mühendisliği yaklaşımıyla, perisitlerden farklılaştırılan ve damarı oluşturan hücrelerin

(fibroblastlar ve düz kas hücreleri) tek katlı tabakaları elde edildi ve bu tabakalar ortalarında kollajen tip I jel olacak şekilde bir araya getirilerek kültüre alındı. İkinci ön deneyde; perisitlerden farklılaştırılan fibroblastların ve düz kas hücrelerinin damarı oluşturan insan ekstrasellüler matriks proteinleriyle (kollajen tip I, elastin, fibrin) belirli oranlarda karıştırılması sağlandı ve bu karışımlardan jel yapısı oluşturularak, yapıların, hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını destekleyip desteklemediği araştırıldı. Üçüncü ön deneyde; damar tabakalarını tübüler bir yapıda birleştirmek amacıyla bir düzenek oluşturuldu ve tunika medya + tunika adventisya benzeri tabakalar bu düzenek içinde birleştirildi. Dördüncü ve son deney kapsamında ise düz kas hücreleri ve fibroblastlar doğal insan kaynaklı ekstrasellüler matriks proteinleri (kollajen tip I, elastin, fibrin) ve glikozaminoglikanlar (dermatan sülfat) ile birleştirilerek tunika medya ve tunika adventisya-benzeri tabakalar, *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC'ler) ile hücre tabaka mühendisliği metoduyla tunika intima-benzeri tabaka oluşturuldu. Damar grefti modelinde bulunan bu üç tabakanın ve tabakalar içinde bulunan üç tip hücrenin varlığı, histolojik boyamalarla, ışık ve elektron mikroskobu ile doğrulandı. Oluşturulan damar yapısının anti-trombojenik özelliği, üzerine CD34+ hematopoetik kök hücrelerden farklılaştırılmış megakaryositlerin/tromositlerin eklenmesi ve bu hücrelerin yapıya yapışmadıklarının gösterilmesiyle kanıtlandı.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında ele alınan tüm hipotezler sırasıyla test edilerek, tezin amacına yönelik veriler ortaya koyuldu. İnsan göbek kordon veni kaynaklı perisitlerden farklılaştırılan damar hücreleri, insan ekstrasellüler matriks proteinleri/ glikozaminoglikanlarla bir araya getirilerek, doğal dokuya benzer yapıda üç tabakalı damar grefti modeli ortaya çıkarıldı. KAH'ın tedavisine yönelik damar doku mühendisliği kapsamında, Dünya'da ve Türkiye'de küçük çaplı damar greftlerinin oluşturulmasına yönelik yapılacak çalışmalar için yeni veriler ortaya koyuldu.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler kendini yenileme ve multipotent farklılaşma kapasitesine sahip erişkin kök hücre gruplarından biridir. MKH' ler mezoderm kökenli olup adiposit, osteosit, kondrosit ve miyoblast gibi mezoderm kökenli olan diğer hücrelere farklılaşabilir (35, 36). İlk olarak, 1960'larda Friedenstein ve ark. tarafından, rodent Kİ kültür kabına yapışan ve koloni oluşturan fibroblastid hücreler (koloni oluşturan birim-fibroblast) olarak izole edilmişlerdir (37). Bu hücreler daha sonra, Caplan tarafından "mezenkimal kök hücreler" olarak isimlendirilmiştir (38).

Mezenkimal kök hücreler kemik iliğinin dışında yağ dokusu (39), plasenta (40), göbek kordonu (41), kordon kanı (42), amniyon sıvısı (43), kas (44), tendon (45), diş pulpası (46), periyodontal ligament (47), deri (48), gibi birçok fetal ve erişkin dokudan ya da organdan (22, 49) izole edilebilirler. 2006 yılında, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (ISCT) Mezenkimal ve Doku Kök Hücreleri Komitesi, insan MKH' lerinin tanımlanabilmesi için minimum kriterleri belirlemiştir. Bu kapsamda MKH' ler; 1) plastik yüzeye tutunmalı, 2) CD105, CD73 ve CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerini ifade etmeli, 3) CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 veya HLA-DR gibi hücre yüzey belirteçlerini ifade etmemeli, 4) *in vitro* ortamda osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşmalıdır (50).

Kolay erişilebilirlikleri, izolasyonlarının/*ex vivo* ekspansiyonlarının kolaylığı ve multipotent farklılaşma kapasiteleri gibi önemli özellikleri, MKH' leri hücresel tedavi ve rejeneratif tıp alanında çekici terapötik ajanlar haline getirmektedir. İmmüdüzenleyici etkileri, yara veya tümör mikroçevresine göç edebilme özellikleri ve hematopoeze destek olmaları, MKH' lerin klinik amaçlı kullanımlarını sağlamaktadır (51). Klinik uygulamalarda, etik ve güvenlik sorunları göz önüne alındığında, embriyonik kök hücrelere veya uyarılmış pluripotent kök hücrelere göre, teratoma oluşturmamaları nedeniyle daha güvenilir ve tercih edilebilir hücrelerdir (52). Son yıllarda MKH' lerin, hasta veya hasar görmüş doku ve organları

iyileştirmek amacıyla hücrelerin doğal veya sentetik iskelelere ekildiği doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanımları oldukça umut vericidir (53).

Yıllar süren araştırmalara rağmen, halen MKH' ler ile ilgili sonuca bağlanmamış bazı konular mevcuttur. Örneğin, Crisan ve ark., MKH' lerin *in vivo* karşılığını ve onların köken aldığı anatomik konumu araştırmışlardır (22). MKH' lerin tüm vaskülarize organlardan izole edilebileceğini, dolayısıyla perivasküler bölgenin MKH' ler için ortak anatomik bölge olduğunu ve perivasküler hücrelerin de MKH' lerin *in vivo* karşılıkları olabileceğini önermişlerdir (22). Perisitleri (CD146+ perivasküler hücreler) ve adventisyal hücreleri içeren perivasküler hücreler, MKH' lere benzer olarak, onlar ile aynı hücre yüzey belirteçlerini (CD73, CD90 ve CD105) ifade eden, multipotent farklılaşma kapasitelerine (adipojenik, osteojenik, kondrojenik ve miyojenik farklılaşma) sahip, hematopoetik ve endotel hücresi belirteçlerini [CD34, CD45, CD31 ve *von Willebrand factor* (vWF)] ifade etmeyen hücrelerdir (54, 55). Bu hususlara göre, Crisan ve ark., perivasküler hücrelerin, kültürdeki MKH' lerin *in vivo* karşılıkları ve perivasküler bölgedeki kökenleri olduğunu göstermişlerdir (22).

2.2. Perisitler (CD146+ Perivasküler Hücreler)

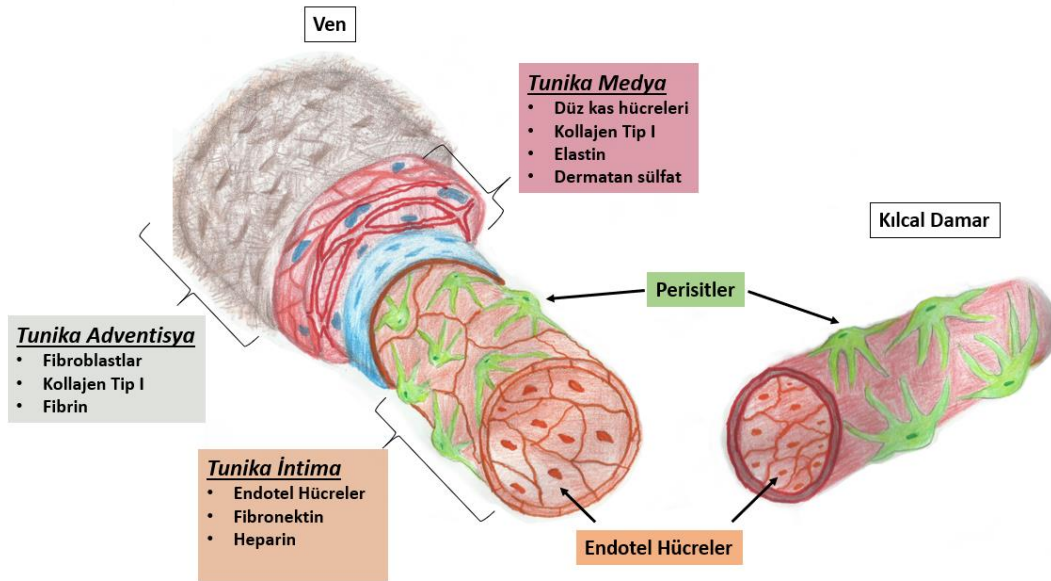
“Rouget” hücreleri veya “mural” hücreler olarak da adlandırılan perisitler, kılcal damarlarda bulunan endotel hücrelerini dıştan çevreleyen perivasküler hücrelerdir (22). Perisitleri ilk kez, 1873 yılında Rouget, “pigmenti olmayan adventisyal hücreler” veya “intramüral perisitler” olarak tanımlamış, Alman anatomist Zimmermann ise 1923 yılında bu hücreleri “perisitler” olarak yeniden isimlendirmiştir (29, 56). Perisitler, kılcal damarlar, arteriyoller, venüller ve büyük çaplı kan damarlarının subendotel bölgelerinde de bulunmaktadır (23, 57). Morfolojik olarak perisitler; belirgin çekirdekli, dar sitoplazmalı ve birçok sitoplazmik uzantısı olan fibroblast benzeri hücrelerdir (58). Perisitlerin büyük çoğunluğu mezoderm kökenliken, retina ve beyinde bulunanlar ise nöral krest kaynaklıdır (58).

Küçük kan damarları (kılcal), bazal membran ile çevrelenmiş endotel

hücreleri ve perisitlerden oluşurken (51), büyük kan damarları (arterler ve venler) ise üç katmandan meydana gelmektedir. Bunlar; tunika intima, tunika medya ve tunika adventisya' dır. Damarın iç katmanını oluşturan tunika intima, damarın lümenini çevreleyen endotel hücrelerinden meydana gelir. Elastik lamina, tunika intima ve tunika medyayı birbirinden ayırmaktadır. Tunika intima ve tunika adventisya arasında kalan tunika medya düz kas hücrelerini barındırır. Tunika medya ve tunika adventisya arasında da elastik lamina bulunur. Tunika adventisyada fibroblastlar, miyofibroblastlar, kollajen fibriller, vasa vasorum ve nöronal ağlar yer alır (59).

Kan damarlarının yapısal elemanı olarak perisitler, büyük kan damarlarında tunika intima ve medya arasında, küçük kan damarlarında endotel katmanın etrafında yerleşmişlerdir (Şekil 2.1). Endotel hücreleriyle, bazal membran üzerindeki porlar aracılığıyla özel hücrelerarası bağlantıları yaparlar. “*Peg-and-Socket*” bağlantılar adını alan bu özelleşmiş yapılar, sıkı ve oluklu bağlantılar ve N-kaderin ve beta (β)-katenin gibi moleküllerden meydana gelir (60). Perisitler, endotel hücreleriyle doğrudan veya dolaylı olarak parakrin sinyaller ile iletişim kurarlar (60, 61). Böylelikle endotel hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşmasını kontrol ederler ve mekanik kuvvetleri endotele taşırlar (61).

Perisitlerin ve endotel hücrelerinin arasındaki birçok sinyal yolağı her iki hücre tipinin proliferasyonu ve farklılaşmasında etkilidir. *Transforming growth factor beta* (TGF- β , Transforme edici büyüme faktörü β) / *activin-like kinase receptor* (ALK5, aktivin benzeri kinaz reseptörü) sinyal yolağı bu önemli sinyal yolaklarından biridir. Latent TGF- β , endotel hücreleri tarafından sentezlenir ve endotel hücreleri ile perisitlerin doğrudan bağlantı kurmasıyla aktif hale gelir. Aktif TGF- β , endotel hücrelerinin proliferasyonunu “TGF- β reseptörü (TGF β R)/ALK-1/Smad5” yolağı üzerinden etkiler. “TGF β R/ALK-5/Smad2-3” yolağı ise perisitlerin ve endotel hücrelerinin farklılaşmasını sağlar (62). Perisitlerin ve endotel hücrelerinin arasındaki diğer önemli sinyal yolakları ise *Angiopoietin-1* (Ang-1, anjiyopoetin-1) / *receptor tyrosine kinase of the Tie family-2* (Tie-2, Tie ailesinden reseptör tirozin kinaz) ve “Ang-2/Tie-2” yolaklarıdır. Perisitler, Ang-1' i ifade ederler ve endotel



Şekil 2.1. Perisitlerin büyük ve küçük çaplı damarlar üzerindeki yerleşimleri. Veni meydana getiren tabakalarda ve kılcal damarlarda yer alan hücreler ve ekstrasellüler matris proteinleri.

hücresinin membranı üzerindeki Tie-2 reseptörü aracılığıyla onlarla bağlantı kurarlar. Bu bağlantı damar stabilizasyonunu ve matürasyonunu sağlar. Ang-2 (Tie2'nin antagonistik ligandı) endotel hücreleri tarafından ifade edilir. "Ang-2/Tie-2" sinyal yolağı perisitlerin bulunduğu yerden kopmasına ve böylelikle damar destabilizasyonuna neden olur (63, 64). "Platelet derived growth factor B (PDGF-B, trombosit kaynaklı büyüme faktörü-B) / PDGF receptor beta (PDGFR- β , trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü beta)" sinyal yolağı perisitlerin ekspansiyonu ve anjiyogenez sırasındaki migrasyonunda kritik öneme sahiptir. PDGF-B anjiyogenez sırasında endotel hücrelerinden salgılanır ve perisitler üzerinde yer alan PDGFR- β ile etkileşime girer (65). "Sphingosine 1-phosphate" (S1P, sfingozin 1-fosfat) / "endothelial differentiation gene (endotel farklılaşma geni)" (Edg veya S1P1) sinyal yolağı dengeli ve güçlü bir perisit-endotel hücresi etkileşimi için çok önemlidir. "Peg-and-socket" bağlantıları N-kaderin bazlı sıkı bağlantıları içerir. S1P/S1P1 sinyal yolağı ise N-kaderin bazlı bu perisit-endotel hücresi bağlantısını dengede tutar (66).

Perisit/endotel hücresi oranı dokudan dokuya farklılık göstermektedir ve bu oran dokunun fonksiyonuna, dokudaki kan basıncına ve kan akış hızına göre değişmektedir (58, 67). Retina ve beyin, fonksiyonel bir kan-retina ve kan-beyin

bariyerine sahip olabilmeleri açısından, tüm organlar içerisinde en yüksek perisit/endotel hücresi oranına sahiptir (1/1). Bu oran deri ve akciğerde 1/10 ve çizgili kaslarda ise 1/100' dür (68). Büyük damarlar, hidrostatik basınçlarının yüksek olması nedeniyle yüksek perisit/endotel hücresi oranına sahiptir (58).

Damar gelişiminin, olgunlaşma ve yeniden yapılandırılmasının önemli düzenleyicileri perisitlere duyulan ilgi son yıllarda gitgide artmaktadır. Perisitler ayrıca; a) kan damarlarının stabilizasyonunda ve geçirgenliğinin kontrolünde, b) kan basıncı kontrolünde, c) vaskülojen ve anjiyogenezde, d) immünolojik savunmada, e) koagülasyonda, f) damar düz kaslarının kasılmasında, g) fizyolojik ve patolojik onarım süreçlerinde ve ayrıca h) yara iyileşmesinde görev almaktadırlar (69, 70). Tüm bu fonksiyonların doğrultusunda perisitlerin, organların fizyolojik onarımı ve rejenerasyonunda çok önemli rolleri vardır (71, 72).

Perisitler önceleri, yapılarında bulunan mikrofilamentler nedeniyle kontraktıl hücreler olarak bilinirken, günümüzde birçok çeşit vazoaktif ajan salgıladıkları ortaya çıkarılmıştır. *Alpha-smooth muscle actin* (düz kas alfa aktin, α -SMA), tropomiyozin, miyozin, kolinerjik ve adrenerjik reseptörleri ifade etmeleri nedeniyle bu hücrelerin damar çapını ve kan akışını düzenledikleri gösterilmiştir (25, 61).

Perisitlerin diğer önemli özelliği ise MKH' ler gibi immün düzenleyici etkiye sahip olmalarıdır. İnflamatuvar cevabı düzenleyici fonksiyonu olan birçok sitokin ve kemokini salgırlar (25). Cheryl ve ark. çalışmalarında perisitlerin düşük düzeyde immünojenik olduğu ve CD4 T hücre cevabını regüle ettiğini gösterilmişlerdir (73). Makrofajlara benzer olarak perisitlerin, fagositik aktiviteleri vardır ve CR3 kompleman reseptörü, CD4, sınıf I ve II majör doku uyumluluk kompleksi molekülleri gibi makrofaj belirteçlerini de ifade ederler (74). Sahip oldukları Fc reseptörleri ile antikor-bağımlı fagositoz yapabilirler. Yüzeylerinde liganda özgü çöpçü reseptörlerini ifade ederler (75).

Beyin, karaciğer ve böbrek gibi bazı organlarda perisitlerin özel fonksiyonları vardır. Kan kaynaklı potansiyel toksik faktörlerin beyin hücrelerinden uzak tutulmasını sağlayan kan beyin bariyerinin varlığı nedeniyle beyin en yüksek perisit yoğunluğuna sahip organımızdır (76, 77). Makrofaj-benzeri aktiviteleri ile perisitler

beyinde immünolojik korunmada görev alırlar. Perisitlerin beyindeki makrofajların öncülleri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (75). Pinositoz ile küçük ve çözünen moleküller perisitler içine alınır ve böylelikle beyinin hücre dışı sıvısı temizlenir. Karaciğerde bulunan ve hepatik stellat hücreleri veya Ito hücreleri olarak da adlandırılan perisitlerin özelleşmiş fonksiyonları vardır. Hücreler arasındaki metabolit değişimini ve toksinlerin işlenmesini sağlarlar (78). Ekstrasellüler matriks proteinlerini ve matriks metalloproteinazları salgılayarak karaciğerde bulunan ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasında görev alırlar (79). Ayrıca vitamin A metabolizmasında görevlidirler (68, 80). Böbreklerde perisitler, mezanjial hücreler olarak adlandırılır ve glomerüler kapillerlerde yer alırlar. Kan infiltrasyonunu arttırmak amacıyla kapiler yüzey alanını arttırırlar (81). Diğer bir yandan perisitler, Kİ' de hematopoetik kök hücrelerin bulunduğu endosteal nişin önemli elemanlarından. "*C-X-C motif chemokine 12*" (CXCL12) ifade eden perivasküler retiküler hücreler ve perivasküler nestin+ MKH' lerin yanında, perisitler, hematopoetik kök hücrelerin idamesinde ve "*homing*"inde rol oynar ve bu şekilde onların köklülüğünü desteklerler (55). Corselli ve ark. çalışmalarında, insan Kİ perisitlerinin, hücre-hücre teması ve *Notch/Jagged 1* sinyal yolağı aracılığıyla hematopoetik kök hücrelerin uzun dönem *ex vivo* idamesini sağladığını göstermişlerdir (82).

Daha öncede bahsedildiği gibi perisitler, damar stabilitesinde, matürasyonunda, kan akışının regülasyonunda, immünmodülasyonda ve hematopoetik kök hücrelerin idamesindeki fonksiyonlarının yanında vaskülogenez ve anjiyogenezde de görev almaktadırlar. Vaskülogenez, kan damarlarının embriyogenezin üçüncü haftası boyunca gelişimidir (83). Vaskülogenezde, anjiyoblast denilen mezodermal öncül hücreler ve hemanjiyoblast denilen endotel hücresi öncülleri avasküler alana göç eder ve burada primer damar pleksusu oluştururlar (84). Bu evrede TGF- β 1, PDGFR- β + perisitlerin farklılaşmasını uyarır. Perisitler ayrıca, kapiler pleksusta yer alan endotel hücrelerinin salgıladığı PDGF-B ile de uyarılırlar (61). Anjiyogenez, var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Vaskülogenez sonrası primer damar pleksusu yeniden modellenir ve

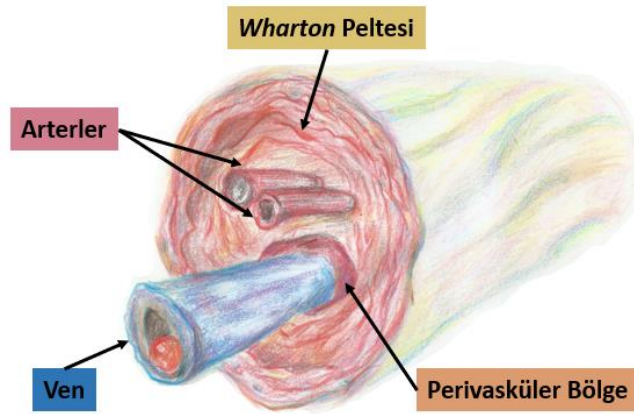
anjyogenez ile fonksiyonel hale gelir (83). Damarlanma sırasında endotel hücreleri, öncelikle *vascular endothelial growth factor* (VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü) gibi anjyogenik faktörler ile uyarılır ve sonrasında salgıladıkları proteazlarla etraflarındaki ekstrasellüler matriks yapısını degrade ederler (61). Bu şekilde proliferen olan ve göçen endotel hücreleri, yeni damarın lümenini meydana getirirler. Endotel hücrelerinin salgıladıkları PDGF-B, S1P-1 ve anjyopoetinler tarafından uyarılan perisitler, olgunlaşmamış damarın etrafını sararlar (81, 85). Perisitler ve endotel hücreleri arasındaki bu etkileşimler, yeni oluşan damara perisit yerleşimini sağlar. Böylelikle perisitler, damarın olgunlaşmasını ve stabilizasyonunu destekler ve anjyogenik sinyallerin damar boyunca transferini sağlarlar (60).

Perisitler çoğunlukla perisit/endotel hücresi oranının en yüksek düzeyde olduğu sığır retinası veya beyninden izole edilirler (86). Perisitlerin, izolasyonu için tercih edilen diğer doku veya organlar ise; iskelet kası, adipöz dokusu, deri, plasenta veya göbek kordonu gibi fetal dokular, Kİ, böbrek ve karaciğerdir (87, 88). Bu doku veya organların çoğunun (fetal dokuların dışında) elde edilmeleri için invaziv işlemler gerekir. Bu nedenle rutin çalışmalar için çok sayıda ve kolay elde edilebilir kaynaklar değildir. Genel olarak perisit izolasyon protokolleri, doku örneğinin mekanik ve enzimatik yollarla parçalanması ile başlar. Mekanik parçalama prosedüründe, damarlar, çevre dokudan ayrılır ve enzimatik parçalama prosedürü için hazır hale getirilirler. Enzimatik parçalama için genellikle kollajenaz kullanılır (89, 90). Enzimatik parçalamadan sonra, kalan damar parçalarından ve fibröz dokudan kurtulabilmek amacıyla, hücre/doku süspansiyonu 100 veya 40 µm por çaplı filtrelerden geçirilebilir. Daha sonra *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS, floresan aktive hücre ayırma) veya *Magnetic-Activated Cell Sorting* (MACS, manyetik aktive hücre ayırma) yöntemleri kullanılarak, CD146 belirteciye göre pozitif immünseleksiyon yapılır. Bir başka yöntem ise, damar parçalarıyla primer hücre kültürü yapmaktır fakat bu yöntem sonunda çoğunlukla karışık hücre popülasyonu elde edilmektedir. Diğer yandan, FACS ve MACS yöntemleri daha komplike yöntemlerdir ve az sayıda hücre eldesiyle sonuçlanırlar (91).

İnvaziv işlem gerektirmediklerinden ve genellikle doğum sonrası

atıldıklarından dolayı fetal dokular, perisit izolasyonu için diğer doku veya organlara göre daha çok tercih edilirler. Kolay ulaşılabilir olmaları, yüksek derecede damarlanmış yapıları ve fazla sayıda kök/progenitör hücre içermeleri en önemli avantajlarıdır. Park ve ark., insan plazması koryon villuslarından mekanik ve enzimatik parçalamadan sonra FACS yöntemi ile perisitleri saflaştırmışlardır (92). Bir başka çalışmada, Meier ve ark., sağlıklı full-term infantlardan, insan plasentasını elde etmişler ve bu örneklerden mekanik ve enzimatik parçalama yöntemiyle perisitleri izole etmişlerdir (91).

İnsan göbek kordonu yapısında bulunan iki arter, bir ven ve mukoz bağ dokusu (Wharton peltesi) nedeniyle genellikle endotel hücreleri ve MKH' ler için yaygın bir kaynak olarak bilinmektedir (Şekil 2.2). Son zamanlarda göbek kordonu, perisitler için de önemli bir kaynak olarak ortaya konmuştur. Tsang ve ark. çalışmalarında, göbek kordonu damarları etrafında bulunan perisitleri izole etmişlerdir (89). İlk olarak kan damarlarını kesip ayırmışlar ve her iki ucunu bağladıktan sonra damarları 1mg/mL kollajenaz solüsyonu içine koymuşlardır. Kollajenaz solüsyonu içinde 16 saat boyunca 37°C' de inkübe olan damar parçalarından elde ettikleri hücreleri kültüre almışlardır. Kültürde çoğalttıkları ve ikinci pasaja getirdikleri hücreler arasında CD146+ hücreleri MACS yöntemi ile pürifiye etmişlerdir. Hosseini ve ark. perisitleri aynı yöntemi kullanarak izole etmişler fakat farklı olarak, hücreleri kültüre almadan önce, hematopoetik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla MACS yöntemiyle CD45 depleksiyon protokolünü uygulamışlardır (93). Perisitleri izole etmek amacıyla Schugar ve ark. ise üç farklı izolasyon tekniği kullanmışlardır; 1) mekanik parçalama ve eksplant kültür tekniği, 2) dispaz enzimini kullanarak enzimatik parçalama tekniği ve 3) kollajenaz enzimini kullanarak enzimatik parçalama tekniği (94). Perisitlerin kültürdeki özellikleri birçok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. Crisan ve ark. göre perisitler kültür kabı yüzeyine geç yapışırlar ve özellikle dördüncü pasaja kadar çok yavaş çoğalırlar (29). Kültürleri süresince %100 konfluense ulaşmazlar, fakat üç veya dört hafta içerisinde %80 konfluense ulaşabilirler (95). Perisit kültürü %5 CO₂ içeren nemli atmosferde, 37°C' de yapılır ve üç günde bir hücrelerin kültür besiyerinin değiştirilmesi gerekir.



Şekil 2.2. İnsan göbek kordonunun yapısı.

Morfolojik olarak perisitler, kültür kabı yüzeyinde düzensiz uzantıları olan, fibroblast benzeri hücreler olarak gözlemlenirler (29).

Araştırmacılar perisitlerin kültürü için farklı içerikli besiyeri ortamları kullanmaktadırlar. Örneğin Nakagawa ve ark., kaplı olmayan kültür kabında %10 “fetal bovine serum (fötal sığır serumu, FBS) içeren Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) kullanarak, sıçan serebral perisitlerin kültürünü yapmışlardır (96). Tsang ve ark. izole ettikleri perisitleri, %15 “embryonic stem cell qualified-fetal bovine serum” (ESQ-FBS) içeren DMEM ile kültüre almışlardır (89). Montemurro ve ark. ise perisitleri beslemek amacıyla %20 FBS ve “DMEM - high glucose (DMEM-HG, yüksek glukozlu DMEM)” içeren kültür ortamı kullanmışlardır (90). Hosseini ve ark. perisitler için kullandıkları besiyeri ise %75 *Alpha Minimum Essential Medium* (α -MEM) ve %15 FBS içermektedir (93). Tiggers ve ark. çalışmalarında perisitleri, fare beyninden izole etmişler ve ilk iki pasaj boyunca hücreleri taze kollajen kaplı kültür kaplarında endotel hücresi büyüme besiyeri içerisinde kültür etmişlerdir (97). Üçüncü pasajdan itibaren perisit besiyeri kullanmışlardır. Bir başka protokolde DMEM *low-glucose* (DMEM-LG, düşük glukozlu DMEM) ve %10 FBS içeren perisit büyüme besiyerine *Pigment Epithelium-Derived Factor* (PEDF, pigment epiteli kaynaklı büyüme faktörü) eklenmiştir (98). PEDF, endotel hücresi büyümesini baskımlarken perisit proliferasyonunu desteklemektedir (99). Blocki ve ark. insan plasenta kaynaklı perisitleri, perisit büyüme besiyeri içerisinde çoğaltmışlardır (100). Tüm bu bilgilerin ışığında, perisitlerin kültürü için ortak kullanılan içeriği tanımlanmış

belirli bir besiyeri bulunmadığı sonucuna varılabilir.

Perisitlerin izolasyonu ve karakterizasyonu konusunda hala kesinleşmiş ve herkes tarafından kullanılan ortak protokoller bulunmamaktadır. Bunun nedeni perisitlere özgü moleküler belirteçlerin henüz kesin olarak tanımlanmamış olmasıdır. Fakat şu an için bazı moleküler belirteçler perisitlerin tanımlanması için kullanılmaktadırlar. Bu belirteçler, perisitlerin bulunduğu anatomik bölgeye, damarların gelişimsel veya anjiyogenik safhasına göre farklı ifadeler göstererek *down* veya *up*-regüle olabilirler (27). Perisitleri tanımlamak için en çok kullanılan belirteçler; CD146, PDGFR- β , *regulator of G protein signaling 5* (RGS-5), α -SMA ve *neuron-glia 2* (NG2, yüksek moleküler ağırlıklı melanoma ilişkili antijen)'dir (29, 101). İmmünglobulin süperaillesinden ve Ca⁺²-bağımsız hücre adezyon proteini olarak fonksiyon gösteren bir transmembran proteini olan CD146, damar endoteli, perisitler ve düz kas hücreleri üzerinde ifade edilen bir perivasküler hücre ve endotel hücresi belirteçidir (22, 29). CD146 ayrıca erişkin KI' ndeki sinüzoidal perisitlerde bulunur ve onların kendini yenileme kapasitelerinin devamlılığını sağlar (102). Tüm perisitler, CD146' yı ifade ederler, bu nedenle dokulardan elde edilen karışık hücre süspansiyonu içerisinde perisitlerin izole edilmesinde bu belirteç kullanılmaktadır (22). PDGFR- β , perisitler tarafından ifade edilen moleküller arasında en çok çalışılan belirteçlerden bir tanesidir. Ayrıca fibroblastlar ve astrositler üzerinde de ifade edilir (61). RGS5, G protein sinyal yolağı regülatör ailesindedir (61). Damarın yeniden modellemesi ve tümör gelişimi sırasında aktive duruma gelmiş perisitlerde ifade olur (60). α -SMA, düz kas hücrelerinin belirteci olmasının yanında perisitler tarafından da ifade edilir ve onların kan basıncını kontrol etme ve kasılma özellikleri ile ilişkilidir (103). Vaskülogenez ve anjiyogenez sırasında perisit yüzeyi üzerinde NG2 ifadesi görülür (61). NG2/ α -SMA belirteçlerinin değişken ifadeleri, insan perisitlerinin alt gruplarını, kapiller-ilişkili (NG2+/ α SMA-), venül-ilişkili (NG2-/ α SMA+) ve arteriyol-ilişkili (NG2+/ α SMA+) perisitler olarak belirler (61). Perisitler tarafından ifade edilen diğer belirteçler ise *microtubule-associated protein 1B* (MAP1B ya da 3G5, mikrotübül ilişkili protein 1B), epidermal büyüme faktörü reseptörü, adenosin A2 reseptörleri, dezmin, aminopeptidaz A ve

N'dir (29, 60, 101, 104).

Perisitler, genel olarak perivasküler belirteçlerin (CD146, PDGFR- β , NG2, α -SMA ve RGS-5) ve MKH belirteçlerinin (CD44, CD73, CD90 ve CD105) pozitif ifadesinin gözlenmesiyle karakterize edilirler. Endotel ve hematopoetik belirteçler (CD34, CD31, ve vWF), miyojenik ve nöral hücre belirteci (CD56) yönünden negatiftirler (58, 101, 105). Perisitler, sahip oldukları bu ifadeler ile, CD146-/CD34+ olan adventisyel hücreler gibi diğer perivasküler hücrelerden ayrılabilirler (105). Ayrıca sahip oldukları osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitelerinin gösterilmesiyle de karakterizasyonları yapılabilir (55). Perisitlerin tanımlanması için, NG2, α -SMA ve 3G5 belirteçlerinin pozitif, chemicon, calponin ve CD31 belirteçlerinin negatif olarak gösterildiği immünohistokimyasal yöntemler de kullanılabilir (91).

Perisitler MKH' lere benzer olarak, multipotent farklılaşma kapasitesine sahiptirler (22, 54). Adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmanın yanında damar büyümesi ve yeniden yapılanması durumlarında damar düz kas hücrelerine de farklılaşabilirler (106). Perisitlerin normal fizyolojik koşullarda farklılaşmasında görev alan dört farklı yolak belirlenmiştir. Bunlar daha önce de belirtilen; PDGF-B / PDGFR- β , S1P / EDG-1, Ang1 / Tie2 ve TGF- β 1 / ALK5 yolaklarıdır (107). Bu yolakların dışında matris metalloproteinazların da farklılaşmada önemli görevleri vardır. Bu hücrelerin hipoksik ortamda damar düz kas hücrelerine dönüşebildikleri gösterilmiştir (108). Perisitlerin kollajen tip I sentezinden sorumlu olan fibroblast öncülü gibi çalıştıkları düşünülmektedir (109-111). Bunu düşündüren nedenlerden ilki, insan plasentasından elde edilen perisitlerin, *in vitro* ortamda, kollajen tip I sentezinden sorumlu olan hücrelere farklılaşabildiklerinin gösterilmesidir (109). İkinci neden ise; fibroblastların PDGFR- β reseptörü taşıdığı ve PDGF-BB stimülasyonu ile proliferasyonlarının/migrasyonlarının arttığı gösterilmesidir (112). Ayrıca *in vivo* olarak perisitler, yara iyileşmesi ve inflamatuvar reaksiyonlar sırasında kollajen tip I üreten fibroblastlara dönüşebilirler (113). Bu verilerin ışığında perisitlerin, kan damarını oluşturan birçok hücreye farklılaşabildiği görülmektedir. MKH' lerin endotel hücrelerine farklılaşabildiği bilinmektedir (114, 115). Fakat

perisitlerin endotel hücrelerine farklılaştığını gösteren bir çalışma mevcut değildir.

2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Bu Hastalıkların Tedavisi

Kardiyovasküler hastalıklar kalpte ve kan damarlarında meydana gelen, dolaşım sistemini etkileyen rahatsızlıkları içeren bir grup hastalıktır. KAH, serebrovasküler hastalıklar, periferik arter hastalığı, kardiyomiyopati, kalp yetmezliği ve hipertansif kalp hastalığı bu gruba girer (1). KVH'nin en sık görülen nedenleri ateroskleroz ve hipertansiyondur. KVH milyonlarca bireyin ölümünün veya yaşam kalitesinin bozulmasının önde gelen nedenlerinden birini oluşturmaktadır (116). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre yaklaşık 17,7 milyon insan 2015 yılında KVH' den hayatını kaybetmiştir (7,4 milyonu koroner kalp hastalıklarından kaynaklanmaktadır). Bu da dünyadaki ölüm oranlarının %31' ini kapsamaktadır. 2030 yılında sayının 23,3 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir (117). Bu ölümlerin dörtte üçü az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmektedir (1). KVH' lerin çoğu, sigara kullanımı, sağlıksız beslenme ve obezite, fazla alkol tüketimi gibi risk faktörlerinin aza indirilmesiyle önlenmektedir. Kalp krizi ve inme gibi akut olaylar, kalbe ve beyne kan akışını engelleyen damar tıkanıklıkları sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Bu tıkanıklıkların en temel nedeni kalbi ve beyni besleyen damarların çeperindeki yağ birikimidir (1).

Koroner arter hastalığı, KVH'nin sık görülen ve mortalitesi en yüksekçeşididir (2, 3). 2013 yılında Türkiye'de en yaygın (%38,8) ölüm nedeni olmuştur (118). KAH, koroner arterin lümen kısmını daraltan aterosklerotik plak nedeniyle meydana gelir. Bu lezyon, koroner arterdeki kan akış hızını ve miyokardiyuma giden oksijen miktarını düşürür, böylelikle göğüs ağrısı, dispne, senkop, bazen akciğer ödemi gibi çeşitli belirtilere neden olur. Miyokardın revaskülarizasyonu sağkalımı uzatır, ağrıyı hafifletir ve yaşam kalitesini artırır. Perkütan koroner girişim ve koroner arter bypass cerrahisi bu revaskülarizasyonu gerçekleştirmek için tek tedavi stratejisidir (119).

Günümüzde, koroner arter bypass cerrahisinde otolog arter veya venlerin kullanımı altın standart olarak kabul edilir (8). Arterlerin limitli oranda bulunması ve

elde edilmeleri sırasında daha ciddi komplikasyonlara sebep olmaları nedeniyle, en yaygın kullanılan otolog greft safenöz vendir. Fakat safenöz ven greftinin 10 yıl içerisindeki başarısızlık oranı %50 olarak bulunmuştur (120). Ayrıca, hastalığın ilerleyişi ve hastanın yaşı nedeniyle bu damarların kalitesi düşük, erişilebilirlikleri kısıtlıdır (4). Bu nedenlerden dolayı otolog greftlere alternatif olabilecek yöntemler geliştirilmelidir.

Otolog greftlere alternatif olarak sentetik damar greftleri kullanılabilir. Dacron (polietilen tereftalat) ve Teflon (politetrafloroetilen) en çok kullanılan sentetik damar greftleridir. Bu malzemelerin 2005 yılında Avrupa, Kanada ve Amerika'da kullanımlarının 1,3 milyar dolara ulaştığı bilinmektedir (121). Ancak, kullanılan prostetik damar greftlerine karşı oluşturulan inflamatuvar cevap (5), tromboz (7) ve neointimal hiperplazi (6) hasarlı bölgedeki iyileşmeyi geciktirmektedir (8). Aynı zamanda, mekanik uyumsuzluk, kontrolsüz bozulma (degradasyon) ve yetersiz anti-trombojenisite bu malzemelerin klinik olarak kullanılmasında önemli engeller yaratmaktadır. Ayrıca, bu greftler, büyük (>8 mm) veya orta çaplı (6-8 mm) arterler yerine kullanıldıklarında uzun dönem başarı elde edilebilmektedir. Fakat küçük çaplı damar grefti oluşturmada düşük başarı oranına sahiptirler (8). Otolog ve sentetik greftlerin sahip oldukları kısıtlamalar nedeniyle, klinik uygulamalar için doğal malzemelerle oluşturulmuş küçük çaplı damar greftlerine ihtiyaç vardır.

2.4. Doku Mühendisliği ve Perisitler

Doku mühendisliği, ilk olarak 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından "mühendislik ve yaşam bilimleri prensipleri ışığında, doku fonksiyonunun veya organın yeniden yapılandırılması, idamesi veya iyileştirilmesi için biyolojik yapıların oluşturulması yönünde uygulanan interdisipliner bir alan" olarak tanımlanmıştır (122). O zamandan beri doku mühendisliği sayesinde klinisyenler, sınırlı tamir/rejeneratif kapasiteye sahip hasarlı doku veya organların tedavisi için alternatif yöntemler elde edebilmişlerdir. Buna ek olarak doku mühendisliğinin ilerlemesiyle araştırmacılar, ilaç geliştirmek ve test etmek amacıyla 3B doku/organ

modelleri oluşturabilmişlerdir.

Doku mühendisliği uygulamaları; iskeleler, hücreler ve büyüme faktörlerini bir araya getirerek 3B işlevsel yapıları meydana getirmeyi amaçlar. İskeleler, dokuya yapısal destek sağlamada ve uygun 3B şekil oluşturmada; hücreler ise, *in vitro/in vivo* dokuları meydana getirmede; büyüme faktörleri, sinyalleşme ve hücre davranışını belirlemede görevlidirler. Doku mühendisliği kaynaklı yapılarda kullanılan hücreler, iskeleler üzerinde proliferer olur, farklılaşır ve ekstrasellüler matriks sentezlerler (123).

Önceleri doku mühendisliği çalışmalarında farklılaşmış hücrelerin kullanımı ön plandayken, kök hücre alanındaki gelişmelerden sonra embriyonik kök hücrelerin, MKH' lerin, fötal kaynaklı kök hücrelerin (göbek kordonu, plasenta kaynaklı kök hücreler) ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (124). Bu kök hücre tiplerine ek olarak, yakın zamanda perisitler de doku mühendisliği uygulamaları için önemli hücre kaynağı haline gelmişlerdir (125). Hücre kaynağı olarak perisitlerin kullanıldığı doku mühendisliği çalışmaları Tablo 2.1'de listelenmiş ve özetlenmiştir.

İlaç çalışmaları genel olarak iki boyutlu kültürler ve hayvan modelleri kullanılarak sürdürülmektedir. Son zamanlardaki gelişmeler göstermiştir ki; birden çok hücre tipini/tabakasını ve destekleyici biyolojik matriksi içeren doku mühendisliği kaynaklı 3B sistemler, *in vivo* mikroçevreyi taklit etme konusunda, plastik yüzeylerde oluşturulan tek katmanlı hücre tabakalarından daha başarılıdır. Ayrıca ilaç tarama çalışmaları kapsamında kullanılan hayvan modelleri göz önüne alındığında, doku mühendisliği kaynaklı modeller daha etik ve ucuz sistemlerdir. Kan beyin bariyeri, yeni terapötik araştırmalar için en çok çalışılan yapılardan bir tanesidir. Kan beyin bariyerini en iyi taklit edebilen doku mühendisliği kaynaklı modeli oluşturmak, ilaç araştırmaları için büyük önem taşımaktadır. Perisitler, kan beyin bariyerinin doğal elemanları olduklarından, bu modellerin oluşturulmasında kullanılabilirler (126) (Tablo 2.1).

Perisitler, erişkin insan iskelet kasından izole edilebilirler ve iskelet kası hücreleriyle benzer özellikleri ve fonksiyonları vardır. Kas farklılaşması ve

anjyogenezini destekleyici fonksiyonları, perisitlerin, kök hücre aracılı doku mühendisliği kaynaklı kas rejenerasyonu çalışmaları için cazip bir hücre kaynağı olmalarını sağlamaktadır (127). Fuoco ve ark. çalışmalarında, iskelet kası kaynaklı perisitleri, polietilenglikol fibrinojen yapısındaki iskele üzerine ekmiş ve böylece hasarlı kas dokusunun tamiri için vaskülarize bir yapı oluşturmuşlardır (128) (Tablo 2.1).

Perisitler, *in vitro* osteojenik farklılaşma kapasiteleri olduğundan ve intramüsküler implantasyon sonrası kemik dokusu oluşturabildiklerinden, kemik doku mühendisliği için yeni hücre kaynağı olarak kullanılabilirler (129, 130). Güvenli ve saf kabul edilen bu hücrelerin kullanımını “U.S. Food and Drug Administration”da desteklemektedir (129). Perisitlerin, kemik doku mühendisliğinde hücre kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalar Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

2.5. Damar Doku Mühendisliği ve Perisitler

Son 15 yılda, disiplinlerarası iş birliği gerektiren damar doku mühendisliğinin, damar ile ilişkili hastalıkların tedavisi için uygulanabilir ve etkili bir strateji geliştirmeye hazır olduğu kanıtlanmıştır (131). Damar doku mühendisliğinin amacı, hücreleri ve doğal ve/veya sentetik iskeleleri bir araya getirip tübüler yapı oluşturarak, doğal damar dokusuna benzer özelliklere sahip küçük çaplı damar greftleri meydana getirmektir (8). Farklı üretim teknolojilerinin ve yaklaşımlarının kullanıldığı bu alanda yararlanılan biyomalzeme türleri dört ana grupta incelenebilir: 1) Allojenik, heterojenik ya da ksenojenik kaynaklardan elde edilen desellülarize, doğal matriksler, 2) Sentetik biyobozunur polimerler, 3) Hücre tabakaları (cell-sheet); iskele tabanlı damar doku mühendisliği için alternatif olarak düşünülmektedir ve 4) Doğal biyobozunur polimerler (8, 121). Tüm hücrel ve nükleer içeriğin uzaklaştırıldığı desellülerizasyon işlemi, doku mühendisliği kaynaklı damar grefti oluşturmada, Quint ve ark. ve Dall’Olmo ve ark. çalışmalarında olduğu gibi, sıkça kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (141, 142). Fakat desellülerize yapılar, içeriklerinin tam olarak karakterize edilememesi, tam desellülerizasyon işleminin garanti edilememesi, ekstrasellüler matriks protein içeriğinin yaştan

Tablo 2.1. Perisitlerin doku mühendisliği alanında kullanıldığı çalışmalar [Gökçınar-Yağcı ve ark. (30)].

Perisit Kaynağı	Ko-Kültürler	İskele Tipi	Doku Mühendisliği Modeli	Çalışma Modeli	Sonuç(lar)	Yıl	Referans
İnsan Beyni	- HUVEC - Beyin astrositleri	- Tübüler çipler (Polidimetilsiloksan, silikon septa ve mikrofiberler) - Kollajen tip I jel	- Anjiyogenez - Kan-beyin bariyeri (KBB) - Tümör-hücre ekstravazasyonu	In vitro	- Endotel hücre-perisit etkileşimleri bazal membran oluşumunu uyardı - Perisitler gelişen endotellere öncülük etti - Oluşturulan mikro damarların bariyer fonksiyonları sağlandı	2014	(126)
Domuz iskelet kası	-	Poliyeten glikol (PEG) - fibrinojen bazlı hidrojel iskelesi (PF)	İskelet Kası	In vitro In vivo	Perisit-PF yapıları, iskelet kası rejenerasyonunu ve kan damarı büyümesini destekledi (in vivo 30 gün)	2014	(128)
İnsan lipoaspiratı	İnsan lipoaspirat adventisyel hücreler	Apatit-kaplı poli (polilaktik-ko-glikolik asit) (PLGA) iskele	Kemik dokusu	In vivo	Farenin kritik boyuttaki kalvaryum defektlerinin iyileşmesi gözlemlendi (Sırasıyla, 4. ve 6. haftada %61,5 ve %69 iyileşme)	2012	(130)
İnsan lipoaspirat stromal damar fraksiyonu (SVF)	İnsan lipoaspiratı adventisyel hücreleri	Koyun demineralize kemik matrisi	Kas içi ektopik kemik	In vivo	- in vivo kemik oluşumu (4 haftada), - implantlardaki damarlanmada artış gözlemlendi	2013	(132)
İnsan göbük kordonu	-	<i>Gelfoam-alginate</i>	Kemik dokusu	In vivo	-Donör osteositlerini içeren yeni kemik dokusu oluşumu gözlemlendi	2013	(89)
İnsan göbük kordonu	-	Kollajen sünger	Kemik dokusu	In vivo In vitro	- Kemik iyileşmesi gerçekleşti	2015	(31)

Perisit Kaynağı	Ko-Kültürler	İskele Tipi	Doku Mühendisliği Modeli	Çalışma Modeli	Sonuç(lar)	Yıl	Referans
İnsan Beyni	HUVEC	Fibrin jel	Mikrodamar	In vitro	- Hizalanmış mikrodamar ağları oluştu (3. günde) - Yüksek seviyelerde mikrodamar hizalanması gerçekleşti	2013	(133)
İnsan plasentası	- HUVEC - insan akciğer fibroblastları - insan promiyelositik lösemi hücreleri	Polidimetilsiloksan mikroakışkan cihazları	Mikrodamar	In vitro	- 4. günde perisitler endoteliumun abluminal bölgesini kaplar şekilde kan damarlarına yapışık halde bulundu - Mikrodamar ağlarının, sağlam bariyer fonksiyonu, uzun vadeli stabilitesi ve uygun belirteçleriyle gelişimi gözlemlendi (4.-5. günlerde)	2013	(134)
İnsan iskelet kasi	HUVEC	Matrijel	Mikrodamar	In vitro In vivo	Perisit ve HUVEC kullanılarak oluşturulan iki ve 3B Matrijel kültürleri /ko-kültürleri, 6-12 saat içinde damar benzeri yapıların oluşmasıyla sonuçlandı	2013	(135)
İnsan plasentası	HUVEC	Aljinat boncuklar (PCs) Protein jel (HUVEC)	Parakrin sinyal iletimi için damar doku yapısı	In vitro In vivo	- HUVEC davranışı etkilendi - Perisitler, damar benzeri yapıların oluşumunu arttırdı (7 gün içinde) - Damarın kendi kendini yenileme süreci kontrol altına alındı	2013	(136)
İskelet kasi	-	İki katmanlı elastomerik poli (ester-üretan) üre iskeleleri	Damar grefti	In vivo	- Biyoreaktörde 2 gün kültür sonrası küçük çaplı doku mühendisliği kaynaklı damar grefti oluşturuldu - Damar greftinin arteriyel bir kanal olarak açık kalması sağlandı	2010	(34)
İnsan kıl kaynaklı MKH'ler	HUVEC	Hücre tabakaları	Damarlanmış osteojenik doku	In vitro In vivo	- Yapıların in vitro prevaskularizasyonu sağlandı - Oluşan damarların 7 gün in vivo da stabil ve olgun kalması sağlandı	2012	(24)

Perisit Kaynağı	Ko-Kültürler	İskele Tipi	Doku Mühendisliği Modeli	Çalışma Modeli	Sonuç(lar)	Yıl	Referans
İnsan embriyonik kök hücreleri	HUVEC	- Sıçan kuyruğu kollajen tip I' - Polidimetilsiloksan mikroakışkan kanallar	Üç boyutlu damar yapıları	In vitro	- "Çip üzerinde kan damar" mikroakışkan sistemi, in vivo anjiyogenezin birçok yönünü açıkladı - İnsan embriyonik kök hücre kökenli hücrelerin, "çip üzerinde organ" mühendislik teknolojisinde kullanıma potansiyelleri gösterildi	2013	(33)
Sığır retinası	Sığır ve sıçan beyin endotel hücreleri	Polihidroksimetilsiloksan yüzeyler	Mikrodamar	In vitro	- Ko-kültür sisteminde endotel hücreleri büyümesi arttırıldı (12 saat- 5 gün) - Mikrodamar benzeri yapılar oluşturuldu (48 saatte)	2012	(137)
10T1/2 hücreleri (ATCC)	HUVEC	PDGF-BB kaplı PEG hidrojel	Mikrodamar	In vitro In vivo (fare kornea anjiyogenez testi)	- Hücrelerin ko-kültürü, yüzey değişikliklerinden bağımsız olarak tübül oluşumuna neden oldu (6 gün içinde) - Hem çözünür hem de immobilize PDGF-BB'nin kombinasyonunu içeren biyoaktif hidrojel, anjiyogenez testi sonucu damar yoğunluğunda belirgin bir artış sergiledi	2011	(138)
Safen ven	HUVEC	Polikaprolakton	Damar grefti	In vitro	- Perisitler endotel hücreleri migrasyonunu ve yoğunluğunu arttırdı	2016	(139)
Göbek kordonu perivasküler hücreleri	Endotelial progenitör hücreler	Polikaprolakton	Bifazik ko-kültür sistemi (damar dokusu, damar medya ve intima tabakası)	In vitro	-İki tip damar progenitör hücreleri ile iki tabakalı ko-kültür sistemi geliştirildi -PCL yüzeyindeki modifikasyonlarla perivasküler hücre ve endotel hücreleri adezyonu ve proliferasyonu arttırıldı	2009	(32)
İnsan göbek kordonu	-	Fibrin	Dermis	In vivo	-Dermal yara bölgesinin yeniden epitelizasyonu sağlandı -Geniş deri defektinde erken yara iyileşmesi hızlandı.	2010	(140)

ve sağlık durumundan etkilenmesi ve içlerindeki antijenik yapıların enflamasyona sebep olabilmesi gibi pek çok dezavantaja sahiptirler (143, 144). Damar doku mühendisliğindeki bir başka yaklaşım ise, hücre tabakalarının oluşturulduğu *self-assembly* (kendinden bir araya getirme) yöntemidir ki, bu yaklaşımda damar greftleri iskele kullanımından bağımsız şekilde oluşturulur (8, 145). Bu yöntemde hücreler, ekstrasellüler matriks tabakası oluştururlar ve uzun bir kültür süreci sonrasında bu tabaka bir mandrel etrafına sarılarak çok tabakalı bir tübüler yapı meydana getirilir (4). 1998 yılından bu yana, L'Heureux ve ark. bu yöntemi tanımladığından beri, pekçok araştırmacı mekanik olarak sağlam ve klinikte kullanıma uygun *self-assembled* damar greftleri elde edebilmişlerdir (146-148). Fakat bu yöntemin sahip olduğu en önemli dezavantaj, damar greft elde edilebilmesi için, çok uzun süren kültür periyodu (6-9 ay) gerektirmesidir (149).

Kan damarları  tabakadan oluşmaktadır; tunika intima, tunika medya ve tunika adventisya (Bkz. şekil 2.1). En iç kısımda yer alan tunika intima; damar lümenini saran endotel hücrelerden oluşmaktadır. Elastik lamina, tunika intima ve medyayı birbirinden ayırmaktadır. Orta kısımda yer alan tunika medya; düz kas hücrelerinden oluşmaktadır. Bu kısımda elastin-proteoglikan-kollajenden (glikozaminoglikan-protein birlikteliği) oluşmuş ekstrasellüler matriks proteinleri yer almaktadır. Bu katmanda çoğunlukla yer alan kollajen tip I yapıya dayanıklılık katarken, elastin de yapıya elastikiyet kazandırır (11, 143) (Bkz. şekil 2.1). Tunika medya ve adventisya arasında yine elastik lamina bulunmaktadır. Son ve en dışta yer alan tunika adventisya; fibroblastlardan ve kollajen fibrillerden oluşmaktadır (59) (Bkz. şekil 2.1). Doğal damar yapısında bulunmaları, doğal polimerlerin küçük-çaplı damar grefti oluşturmada güvenilir bir kaynak olmalarını sağlamaktadır. Bu biyoyumlu ve toksik olmayan malzemeler, orijinal damar dokusunun mekanik özelliklerini sağlarken, içlerinde bulundurdukları damar hücrelerinin tutunmalarını, proliferasyonlarını ve ekstrasellüler matriks protein sentezlemelerini desteklerler. MKH gibi, endotel hücreleri ve perisitlerin de ekstrasellüler matriks proteinleri sentezledikleri önceden gösterilmiştir (150). Ekstrasellüler matriks proteinleri, hücrelerin birbirleri ve çevreleri ile iletişiminde rol oynarlar. Bunun yanında, biyoyumluluk özellikleri, ekstrasellüler matriks proteinleri, doku mühendisliği amacıyla ideal biyomalzeme olarak

kullanılmalarına neden olmaktadır. Hücreler tarafından sentezlenen ekstrasellüler matriks proteinleri hücrelerin adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması için önem taşımaktadır. Damar greftlerinin sahip olmaları gereken biyouyumluluk, mekanik kuvvet ve anti-trombojenisite gibi özellikler de hücreler tarafından sentezlenen veya sonradan ortama eklenen ekstrasellüler matriks proteinleri yardımıyla sağlanmaktadır (116). Damar greftlerinin işlevselliklerini arttırmak için kullanılan ekstrasellüler matriks proteinlere örnek olarak, kollajen, fibrin ve elastin verilebilir (9, 151, 152). Doğal iskele olarak kullanılan kollajen tip I kanın pıhtılaşmasını önler ve kanın normal viskoelastik özelliğini bozmaz. Ayrıca kollajen tip I endotel hücrelerinin ve düz kas hücrelerinin proliferasyonlarını destekler. Elastin, greftin mekanik kuvvetini artırmanın yanında, anti-trombojenik ve anti-enflamatuvar kaplama için de kullanılmaktadır (116). Damar doku mühendisliğinde, kollajen tip I' den meydana gelen yapıya elastin eklenerek greftin, kan basıncına ve akış hızına dayanıklılığı arttırılmaktadır (13, 143, 153).

Küçük çaplı damar greftleri ilk defa 1986 yılında Weinberg ve Bell tarafından, pürifiye edilmiş ekstrasellüler matriks proteinleri ve kollajen jel içine gömülmüş damar düz kas hücreleri, fibroblastlar ve endotel hücreleri kullanılarak oluşturulmuştur (9). Loy ve ark., kollajen tip I' i üç tip damar hücresiyle (fibroblast, düz kas hücresi ve HUVEC) birleştirerek, doğal damar yapısına benzer, planar yapıda bir damar modeli dizayn etmişlerdir (10). Ryan ve O'Brien kollajen tip I' i elastin ile birleştirerek, oluşturdukları damar yapısının viskoelastik özelliklerini geliştirmişlerdir (154). Daamen ve ark., damar iskelesini, kollajen tip I, elastin ve kondroitin sülfat karışımıyla hazırlamışlardır (155). Buijtenhuijs ve ark., göbek kordonu kaynaklı düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve canlılığını destekleyen çözünür olmayan elastin ve kollajen tip I karışımını kullanarak 3B tübüler iskele meydana getirmişlerdir (13). Kollajen tip I ve elastine alternatif olarak, elastin ve kollajen sentezini arttıran fibrin de doğal damar greftlerin yapısını oluşturmak için tercih edilmektedir (11, 12, 156). Grassl ve ark. ve Aper ve ark. sadece fibrini kullanarak damar greftleri oluşturmuşlar ve doğal iskele içerisinde hücrelerin canlılığını göstermişlerdir (12, 156).

Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda, damar doku mühendisliği kapsamında kullanılan hücreler; damarın yapısında bulunan endotel hücreleri,

fibroblastlar ve damar düz kas hücreleridir (121). Bu farklılaşmış hücreler, hastadan (otolog), donörden (allojenik) veya farklı türlerden (ksenojenik) elde edilebilirler. Fakat immünrejeksiyon veya hastalık bulaşması gibi risklerden dolayı allojenik ve ksenojenik hücreler çok tercih edilmezler. Doku mühendisliği yaklaşımıyla damar grefti oluşturulması (endotel ve düz kas hücreleriyle) ilk kez 1986 yılında gösterilmiştir (9). Göbek kordonundan elde edilen düz kas hücreleri ve dermal/safen ven fibroblastları kullanılarak elde edilen hücre tabakalarının bir tübüler destek üzerine sarılmasıyla damar medya ve adventisya tabakaları 2010 yılında Gauvin ve ark. yaptıkları çalışma ile oluşturulmuştur (157). Damar tabakalarında bulunan farklılaşmış hücreler; elde edilişleri sırasındaki teknik zorluklar, düşük proliferasyon kapasiteleri ve sistemik kardiyovasküler hastalığı olan erişkin hastalardaki sayılarının azlığı ve canlılıklarının düşük olması gibi dezavantajlara sahiptirler (121). Literatürde belirtilen bu dezavantajlara ait en iyi örnek, erişkin bireylerden elde edilen düz kas hücrelerinin daha düşük proliferatif ve kollajen üretme kapasitesine sahip olmasının gösterilmesi ile desteklenmiştir (121). Kök hücreler, farklı hücrelere farklılaşma özelliği ve yüksek proliferatif kapasitesi olan hücrelerdir (158). Bu nedenle damar dokularının oluşturulmasında kök hücrelerden yararlanılmaya başlanmıştır. Bu alanda en çok kullanılan kök hücre türü MKH' lerdir. MKH' ler Kİ başta olmak üzere adipöz dokudan ve göbek kordonundan elde edilebilirler. Bu kök hücreler kullanılan biyomalzemeler ve iskeleler eşliğinde proliferere olur, istenilen hücre tipine farklılaşır (endotelyal hücre, düz kas hücresi) ve böylelikle doku mühendisliği kaynaklı greftler oluşturabilirler.

Perisitlerin damar doku mühendisliği alanında kullanıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır (Bkz. Tablo 2.1). He ve ark. insan iskelet kası perisitlerini, elastomerik, tübüler ve poröz sentetik iskeleler içerisinde kültüre etmişlerdir (34). Van der Meer ve ark., perisitleri, HUVEC' leri ve kollajen tip I' i birleştirerek 3B mikrotasarımlı damar dokusu meydana getirmişlerdir (33). Chong ve ark., medya tabakası ve intima tabakası için sırasıyla insan göbek kordonu veni perivasküler hücreleri ve endotel hücreleri ekili sentetik polimerden oluşan çift fazlı damar modeli oluşturmuşlardır (32).

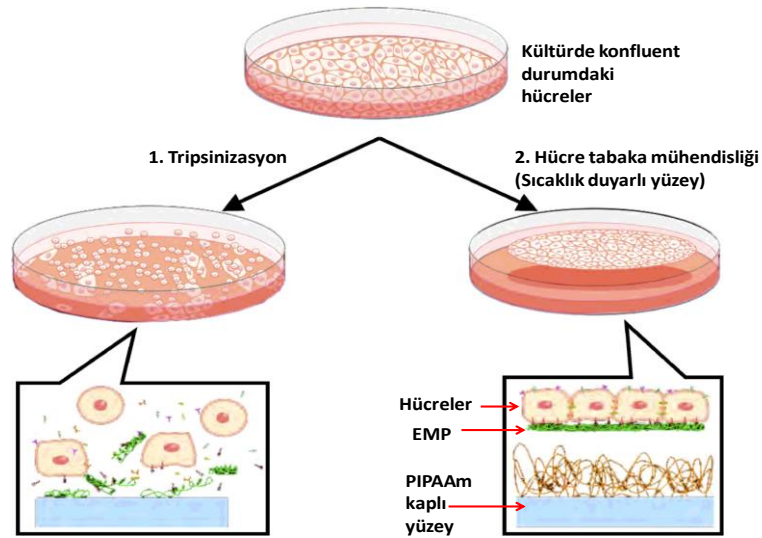
Hücreleri çoğaldıkları yüzeyden ayırmak için kullanılan dispaz, kollajenaz

ve tripsin gibi konvansiyonel proteolitik enzimler hem hücre canlılığını düşürmekte hem de hücre yüzey proteinlerinin (iyon kanalları, büyüme faktörü reseptörleri, vb.) degradasyonuna sebep olmaktadırlar (Şekil 2.3, Sol) (18, 159). Ayrıca bu enzimler, hücrelerin salgıladıkları ekstrasellüler matriks proteinlerine ve hücre-hücre bağlantılarına zarar vermektedirler. Hücre yüzey proteinlerinin ve ekstrasellüler matriks proteinlerin degradasyonuna neden olmayacak ve hücre kültürü yüzeyleri üzerinde çoğalan hücreleri tabakalar halinde, canlı olarak elde edebilmeyi sağlayacak polimer kaplı akıllı yüzeyler geliştirilmiştir (159). PIPAAm olarak adlandırılan bu polimer ile kaplı kültür kabı yüzeyi 37°C' de kısmen hidrofobiktir ve normal polistiren kültür kaplarındaki gibi hücre yapışmasına/proliferasyonuna izin verirler. Hücreler, konfluense ulaştıklarında sıcaklık 20°C' ye düşürülür ki bu sıcaklık polimerin düşük kritik solüsyon sıcaklığı olan 32°C' den daha düşük bir sıcaklıktır. Böylelikle yüzey hidrofilik hale gelir ve polimer şişer. Bu sayede ekstrasellüler matriks proteini içeren hücre tabakası hiçbir mekanik veya enzimatik işleme maruz kalmadan yüzeyden ayrılır ve serbest hale geçer (Şekil 2.3) (159). Bu durumda sadece kültürdeki hücrelerin bazal tarafındaki adeziv proteinler ve polimer yüzeyi arasındaki etkileşimin bozulması söz konusudur. Böylelikle önemli hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini sağlayan adeziv proteinler ve hücre membranı zarar görmeden korunur. Herhangi bir iskeleye gerek kalmaksızın hücre tabakalarının eldesine ve kültürüne dayanan bu metodun kullanıldığı alana "hücre tabaka mühendisliği" (*cell sheet engineering*) denmektedir. Hücre tabakalarının damar doku mühendisliği kapsamında oluşturulmaya ve kullanılmaya başlandığı ilk çalışma L'Heureux ve ark. 1998' de yaptıkları çalışmadır (148). Fakat bu çalışmada sıcaklık-duyarlı akıllı yüzeyler kullanılmamış, hücrelerin kültür sırasında sentezledikleri ekstrasellüler matriks proteinler ile tabakalar meydana getirilmiştir (148). Okano ve ark. (18) tarafından geliştirilen hücre tabaka mühendisliği yaklaşımını yakın zamanda damar grefti üretiminde kullanan çalışmalar vardır (19-21). Williams ve ark. çalışmalarında, insan aort düz kas hücrelerinin ve MKH' lerin sıcaklık-duyarlı PIPAAm yüzeyler üzerinde tabaka oluşturma özelliklerini karşılaştırmışlardır (19). MKH' lerin bu yüzeyler üzerinde daha kısa sürede konfluense ulaştıklarını ve daha iyi ekstrasellüler matriks proteinleri sentezleme kapasitelerinin olduğunu, bu

nedenle damar grefti oluşturmada tercih edilen hücreler olduklarını belirtmişlerdir (19). Backman ve ark., damar doku mühendisliğinde kullanılmak üzere, düz kas hücre tabakaları elde etmeyi ve bu amaçla uygun akıllı yüzeyler geliştirmeyi amaçlamışlardır (20). Çalışmalarının sonunda elde ettikleri verilere göre, bu özel yüzeylerde kültürü yapılan düz kas hücre tabakalarının yapısal ve mekanik özellikleri, doğal arter dokusunun özellikleriyle örtüşecek seviyededir (20). Sekiya ve ark. hücre tabaka mühendisliği yöntemiyle endotel hücreleri tabakaları elde etmiş ve bu tabakalardan oluşturdukları 3B çok katmanlı damar yapılarıyla *in vitro* ve *in vivo* da kullanılabilecek yeni bir ürün geliştirmişlerdir (21).

Meydana getirilen damar greftinin fonksiyonel olabilmesi için sahip olması gereken en önemli özelliklerden bir tanesi, lümen kısmının bütün bir endotel hücreleri tabakasına sahip olmasıdır.

İnsan kan damarlarının ana hemodinamik ve fizyolojik fonksiyonlarına aracılık ettiği için endotelizasyon, bir damar yapısı için tunika medya ve adventisyada kullanılan malzemeler ve hücreler kadar önemlidir (160). Damar greftlerinin oluşturulmasında büyük öneme sahip olan endotelizasyonun etkinliği, bazı araştırma grupları tarafından artırılmaya çalışılmıştır (15, 17).



Şekil 2.3. Hücre tabaka mühendisliği. Konvansiyonel tripsinizasyonda (sol) ekstrasellüler matriks protein ile birlikte neredeyse tüm hücre yüzey proteinleri sindirilmiş, tüm hücreler tek olarak elde edilmiştir. Buna karşın sıcaklık duyarlı yüzeyler kullanılarak (sağ) ekstrasellüler matriks proteinler zarar görmeden hücre tabakaları elde edilmiştir. EMP: Ekstrasellüler matriks proteinleri, PIPAAm: *poly N-isopropylacrylamide* (159).

Araştırmacılar bazal membranı kollajen tip IV (14), fibronektin (15) ve heparin (16, 17) gibi proteinlerle kaplayarak endotelizasyonu kolaylaştırmaya çalışmışlardır. Zhou ve ark. desellülerize iskele ile oluşturdukları damar grefti heparin ve VEGF ile kaplayarak zerindeki HUVEC' lerin proliferasyonunu arttırmış ve bu greftin *in vivo* endotelizasyonunu hızlandırmışlardır (17). De Visscher ve ark., sentetik malzeme ile oluşturulmuş damar greftini fibronektin ve *stromal cell derived factor 1-* (SDF-1) ile kaplamışlar ve lümen kısmının daha hızlı ve etkin bir şekilde endotel hücreleriyle örtülmesini sağlamışlardır. Bu yöntemle endotelizasyonu geliştirirken, intimal hiperplazi ve trombozun önüne geçmişlerdir (15). Coelho ve ark. alışmalarında, hidrofobik ve hidrofilik yüzeyleri kollajen tip IV ile kaplamış ve endotel hücrelerinin yüzeye tutunma özelliğini incelemişlerdir (14). Sonuç olarak, hidrofilik yüzeyler üzerindeki kollajen tip IV' n hücrelerin tutunma ve organizasyonunda daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (14). Hoshi ve ark., sentetik polimerden oluşturdukları damar greftin lümen kısmını, antikoagülan bir glikozaminoglikan olan heparin ile kaplama yöntemi geliştirmişlerdir (16). Böylelikle yapı üzerindeki endotel hücresi adezyonunu, canlılığını ve proliferasyonunu arttırmışlar, trombosit adezyonunu ve pıhtılaşmayı inhibe etmişlerdir (16).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması kapsamındaki deneyler, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, merkeze ait alt yapı, laboratuvar ve teknik donanım kullanılarak, Kök Hücre Bilimleri Anabilim dalı Kök Hücre Doktora Programı kapsamında gerçekleştirildi.

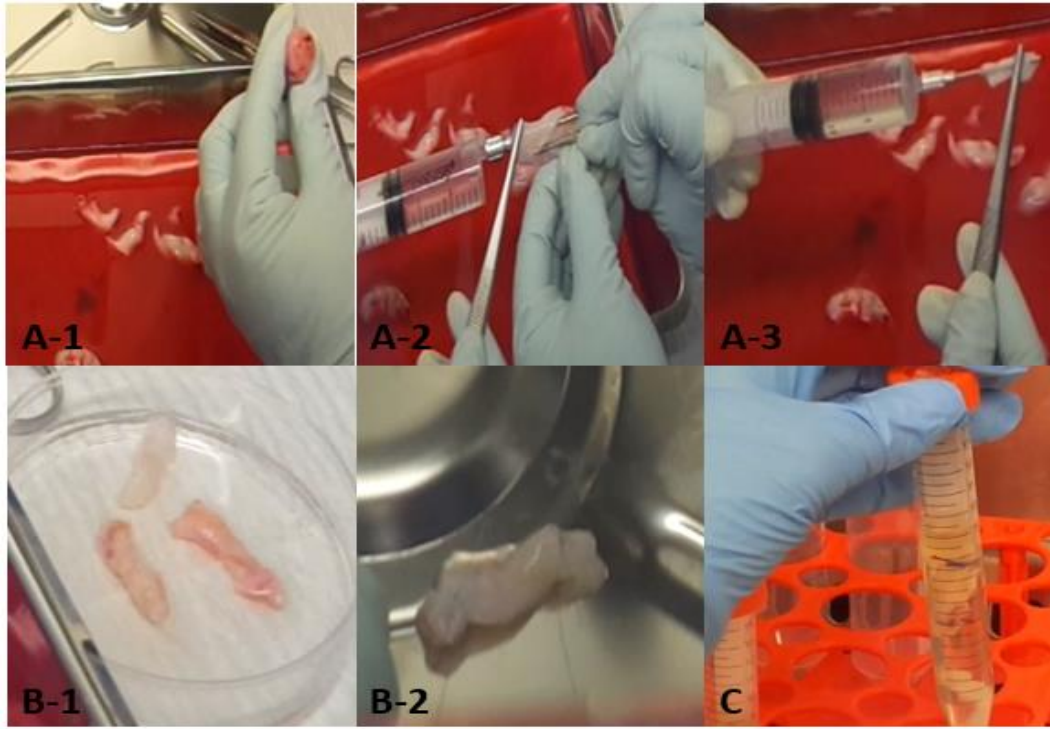
3.1. İnsan Göbek Kordonu Veninden CD146+ Perisitlerin İki farklı Yöntemle İzole Edilmesi ve İki Grup Hücrenin Birbirleriyle Karşılaştırmaları

İnsan göbek kordonu örnekleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'nde, komplikasyon gelişmeyen sezaryen doğum sonrası, normal gelişim süresini tamamlamış bebeklerden elde edildi (n=3-5). Bu örneklerin alınması ve kullanımı için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan izin alındı (GO 13/417 – 27, GO 15/297 – 26 ve GO 16/213 – 13 numaralı kararlarıyla) ve doğum yapan annelere onam formu imzalatıldı.

3.1.1. CD146+ Hücre İzolasyonu

Göbek kordonu örnekleri en kısa sürede taşıma besiyeri [%80 DMEM-LG, %10 *Penicillin-Streptomycin* (167 ünite/mL, Sigma, ABD), %10 *Amphotericin B* solüsyonu (0,3 µg/mL)] içerisinde Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarına ulaştırıldı. İki-üç saat içerisinde, steril koşullarda, insan göbek kordonu veni etrafındaki CD146+ hücrelerin izolasyon işlemi başlatıldı (161). Öncelikle göbek kordonu örnekleri üç-dört santimetre uzunluğunda parçalar halinde kesildi. Steril lanset kullanılarak ven etrafında bulunan Wharton peltesi ve arterler uzaklaştırıldı (Şekil 3.1A). Ayrılan göbek kordonu veni parçalarının lümen kısmı, hematopoetik hücre kontaminasyonunu önlemek amacıyla, steril *phosphate buffered saline* (PBS, Sigma) ile yıkandı (Şekil 3.1A). Sonrasında ayrılan ven parçalarının her iki ucu, endotel hücresi kontaminasyonunu önlemek amacıyla steril ameliyat ipliğiyle bağlandıktan sonra

(Şekil 3.1B), kollajenaz solüsyonu (1 mg/mL, Sigma) içerisinde 37° C' de 16-18 saat inkübe edildi (Şekil 3.1C).



Şekil 3.1. Perisitlerin, insan göbek kordonu veni etrafından enzimatik yıkım tekniğiyle izole edilmesini gösteren aşamalar; A) 3-4 cm uzunluğundaki göbek kordonu parçaları PBS ile yıkandı ve etrafındaki Wharton peltesi ve arterler uzaklaştırıldı, B) Her ven parçası iki ucundan ameliyat ipliğiyle bağlandı, C) İki ucu bağlı ven parçaları kollajenaz solüsyonu içinde 37°C' de 16-18 saat inkübe edildi (162).

Kollajenaz ile muamele sonucu oluşan hücre süspansiyonu ile ven parçaları birbirinden ayrıldı ve iki ayrı grup olarak kültüre alındı.

1. Grup: Kollajenaz ile muamele edilen hücre süspansiyonu üzerine PBS eklendikten sonra 1400 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Sonrasında elde edilen hücre peleti PBS ile sulandırıldıktan sonra kalan ven parçalarının uzaklaştırılması için 100 µm ve sonrasında 40 µm'lik filtreden (BD Falcon, ABD) geçirildi. Filtreden geçirilmiş hücre süspansiyonu 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler tripan mavisini boyama yöntemiyle sayıldı ve *Pericyte Growth Medium* (PGM, Promocell, Almanya) içinde 37°C' de 5%' lik CO₂' li inkübatörde kültüre alındı. Üçüncü günün sonunda mikroskopta hücre yapışması kontrol edildi ve

sonrasında haftada iki kez kültür besiyeri değiştirildi. Kültürde %80-85 konfluense ulaşan hücreler TrypLE (Gibco, ABD) solüsyonu ile kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı. CD146+ hücreler, MACS tekniği ile *CD146 Microbead Kit* (Miltenyi Biotec, Bisley, UK) kullanılarak ayrıldı. Hücreler, *MACS Buffer* [PBS, %0,5 bovine serum albumin (BSA, Applichem, Almanya), 2mM EDTA (Gibco)] ile 15 mL' lik falkon tüp içerisinde süspanse edilerek 10 dakika 300 g' de santrifüj edildi. Pellet, 60 µL *MACS Buffer* ile çözülerek üzerine 20 µL *FcR Blocking Reagent* ile 20 µL *CD146 MicroBeads* ilave edildi. 15 dakika +4°C' de inkübe edilen hücrelere, 1 mL *MACS* tamponu eklenerek, 10 dakika 300 g' de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Pellet, 500 µL *MACS* tamponu ile çözülerek *MACS* kolonu yardımıyla manyetik ayrıştırma işlemi gerçekleştirildi. CD146+ ve CD146- olan hücreler, ayrı falkon tüpler içerisinde toplandı. CD146+ perisitler, PGM içinde 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde kültüre alındı. Haftada iki kez kültür besiyeri değiştirildi. %80-85 konfluense ulaşan hücreler TrypLE solüsyonu ile kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı ve hücre canlılığı tripan mavisi boyama yöntemiyle tayin edildi. Üçüncü pasaja gelen hücrelerin karakterizasyonları yapıldı.

2. Grup: Kollajenaz ile muamele edilen ven parçaları steril bir petrinin içinde bistüri yardımıyla daha küçük parçalara bölündü. Ven parçaları kültür petri kapları içerisine yerleştirildi ve üzerlerine kültür besiyeri DMEM-HG, %10 FBS ve %1 Penicillin-Streptomycin eklendi. 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde kültüre alındı. Bir hafta hücre yapışması beklendi. Hücre yapışması görüldükten sonra iki-üç günde bir kültür besiyeri değiştirildi. %80-85 konfluense ulaşan hücreler TrypLE solüsyonu ile kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı. CD146+ hücreler MACS tekniği ile "*CD146 microbead Kit*" kullanılarak ayrıldı ve 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde kültüre alındı. Haftada iki-üç kez kültür besiyeri değiştirildi. %80-85 konfluense ulaşan hücreler TrypLE solüsyonu ile kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı ve hücre canlılığı tripan mavisi boyama yöntemiyle tayin edildi. Üçüncü pasaja gelen hücrelerin karakterizasyonları yapıldı.

İnsan göbek kordonu veni etrafından iki farklı yöntemle izole edilen ve kültüre alınan CD146+ hücreler, morfolojileri, kültürde sayılarının ikiye katlanma

süreleri (*population doubling time*), adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri ve gen ifade profilleri yönünden karşılaştırıldı.

3.1.2. Morfolojik Analiz ve *Population Doubling Time*

Perisitlerin karakterizasyonu için ilk etapta, *inverted* ışık mikroskobu altında kültür kabına yapışma/yüzeyi kaplama özellikleri ve morfolojileri değerlendirildi.

Hücre sayıları tripan mavisi boyama yöntemiyle hemositometre kullanarak belirlendi ve *population doubling time* (PDT, sayısını ikiye katlama süresi) hesaplaması her pasaj için; $PDT = \text{Kültür Zamanı} / \text{Population doubling (PD)}$ ve $PD = \log N/N_0$ [N: %80-85 konfluenste tripsinizasyon sonucu elde edilen hücre sayısı, N_0 : Kültür için ekilen hücre sayısı, Kültür Zamanı: Hücre ekimi ve tripsinizasyonu arası geçen zaman (gün sayısı)] formülleriyle yapıldı (163).

3.1.3. Farklılaşma Analizi

İki gruba ait CD146+ hücrelerin farklılaşma kapasitelerini incelemek amacıyla osteojenik ve adipojenik farklılaşma özelliklerinin olup olmadığı test edildi.

Osteojenik Farklılaşma: İzole edilen iki grup CD146+ hücreler, üçüncü pasaja geldiklerinde 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde altı kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Konfluense ulaşan hücrelerin üzerine osteojenik farklılaşma besiyeri [DMEM-LG, %10 FBS, 10^{-7} M dexamethasone (Sigma), 0,2 mM ascorbic acid (Sigma) and 10 mM β -glycerophosphate (Sigma)] eklendi. Kontrol kuyucuklarına ise PGM (1. Grup CD146+ hücreler için), DMEM-HG (2. Grup CD146+ hücreler için) eklendi. Tüm kuyucuklar 21 gün 37°C ' de %5' lik CO_2 ' li ortamda inkübe edildi. Haftada iki kez besiyeri değişimi yapıldı. Hücre farklılaşması, kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde *inverted* ışık mikroskobu ile takip edildi. Osteojenik farklılaşma 21. günün sonunda alizarin kırmızısı boyaması sonucu tayin edildi. Bu amaçla 21 gün sonunda hem farklılaşma hem kontrol kuyucuklarından besiyerleri çekildi ve hücreler bir kez PBS ile yıkandı. Yıkamanın

ardından hücreler 1 mL/kuyucuk %3,7 formaldehit (Merck) ile 37°C' de 20 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrasında kuyucuklara 1' er mL alizarin kırmızısı eklendi ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde hücrelerin üzerinden boya uzaklaştırıldı ve 1 mL distile su ile yıkama yapıldı. Kontrol ve farklılaşma kuyucuklarında bulunan hücrelerdeki osteojenik farklılaşma (kalsiyum kristallerinin birikimi), *inverted* ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik inceleme sonucu tayin edildi.

Adipojenik Farklılaşma: İzole edilen iki grup CD146+ hücreler üçüncü pasaja geldiklerinde, 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde altı kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Konfluense ulaşan hücrelerin üzerine adipojenik farklılaşma besiyeri [DMEM-LG, 10 mM indomethacin (Santa Cruz Biotechnology, Oregon, ABD), 0,5 mM 3-isobuthylmethyl- xanthine (Sigma), 1 μ M dexamethasone (Sigma), 10 μ g/mL insulin (Santa Cruz Biotechnology)] eklendi. Kontrol kuyucuklarına ise PGM (1. Grup CD146+ hücreler için), DMEM-HG (2. Grup CD146+ hücreler için) eklendi. Tüm kuyucuklar 21 gün 37°C' de %5' lik CO₂' li ortamda inkübe edildi. Haftada iki kez besiyeri değişimi yapıldı. Hücre farklılaşması, kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde *inverted* ışık mikroskobu ile takip edildi. Adipojenik farklılaşma 21. günün sonunda *oil Red-o* boyaması sonucu tayin edildi. Bu amaçla 21 gün sonunda hem farklılaşma hem kontrol kuyucuklarından besiyerleri çekildi ve hücreler bir kez PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücreler 1 mL/kuyucuk %3,7 formaldehit ile 37°C' de 20 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrasında kuyucuklara 1' er mL *oil Red-o* eklendi ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde hücrelerin üzerinden boya uzaklaştırıldı ve 1 mL distile su ile yıkama yapıldı. Kontrol ve farklılaşma kuyucuklarında bulunan hücrelerdeki adipojenik farklılaşma (yağ damlacıklarının oluşumu) *inverted* ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik inceleme sonucu tayin edildi.

3.1.4. Gen İfade Analizi

Pasaj üçe gelen 1. ve 2. grup CD146+ hücrelerin (n=3), total hücre sel *ribonucleic acid* (RNA) miktarı, *EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-Preps Kit* (Bio Basic Inc., Kanada) kullanılarak izole edildi. İzole edilen RNA konsantrasyonu,

NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) kullanılarak 260 nm' de ölçüldü ve A260/A280 oranı RNA ekstraksiyon kalitesini ölçmek amacıyla kullanıldı. RNA' lar -80°C' lik dondurucuda ileri deney aşamaları için saklandı. Kontrol olarak ticari olarak satın alınan Kİ MKH' lerinden (ATCC, ABD) elde edilen RNA' lar kullanıldı.

Kantitatif Transkriptom Analizi: Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde Yrd. Doç. Dr. Ekim Taşkırın tarafından gerçekleştirildi. İlk aşamada her bir örnek için 10' ar ng total RNA alınarak *VILLO Superscript complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA' lar kütüphane oluşturulması için *Ion Code* plakaları' na yüklendi ve *Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression* kit ile *Ion Chef* cihazında kütüphaneler oluşturuldu. Kütüphane oluşturulurken her bir örneğe ayrı bir barkod dizisi eklenerek, örneklerin aynı yeni nesil dizileme koşulunda sekanslanmasına olanak sağlandı. Kütüphanelerin kantitatif miktar tayini *Qubit* cihazı ve *PicoGreen* kit kullanılarak florometrik yöntem ile yapıldı. *Qubit dsDNA High Sensitive Quantitation* kit içerisindeki standartlar yardımı ile çift zincirli *deoxyribonucleic acid* (DNA) moleküllerinin miktarı saptandı. Her bir kütüphanenin 100 pM' lik ara stok solüsyonundan 1,7' şer µL alınarak nükleaz içermeyen 92 µL su içerisinde birleştirildi. Kütüphanelerin klonal amplifikasyonu için *Ion PI Hi-Q OT2 200* kiti kullanıldı. Yeni nesil dizileme reaksiyonu ise *Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit* kullanılarak Ion Proton cihazında gerçekleştirildi. Veri analizi için *Torrent Server* üzerinde bulunan analiz *plug-in* kodları kullanıldı. Yeni nesil dizileme reaksiyonu sonrası elde edilen tüm okumalar "*read per millions*" metodu ile normalize edildi ve karşılaştırmalı olarak incelendi.

3.2. 1. Grup CD146+ Hücrelerin İleri Karakterizasyonu

3.2.1. Akım Sitometri Analizi

Pasaj üçe gelen 1. grup CD146+ hücrelerin yüzey belirteci ifadeleri akım sitometri yöntemiyle ölçüldü (FACS Aria flow cytometer, BD Biosciences). Sonuçlar kordon kanı MKH' leri için ölçülen akım sitometri değerleri ile

karşılaştırıldı. MKH' ler kordon kanı mononükleer hücrelerinden (MNH, n=3) elde edildi (161). İnsan kordon kanı MNH' leri, Ficoll-Paque (1.077 g/mL; GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, İngiltere) yoğunluk gradiyent yöntemi ile ayrıldı. Kordon kanı örneği 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve total hacmi hesaplandı. 1500 rpm'de 10 dakika (Eppendorf Centrifuge 5810, Almanya) frensiz santrifüj yapıldı. Üzerinde oluşan plazma tabakası uzaklaştırıldı. Uzaklaştırılan plazma miktarı kadar PBS eklendi. 50 mL Leucosep tüpler (Greiner Bio One, Avustralya) içine paylaştırıldı ve Ficoll-Paque koyuldu. PBS ile sulandırılan örnek iki katı olacak şekilde tüplere aktarıldı. 15 dakika yine frensiz santrifüj yapıldı. Oluşan MNH' ler yeni 50 mL' lik tüplere toplandı. Üzerleri PBS ile 50 mL'ye tamamlandı ve altı dakika santrifüj yapıldı. Supernatan atıldıktan sonra tüm tüplerdeki peletler tek bir 50 mL'lik tüpte toplandı. Üzerleri PBS ile 50 mL'ye tamamlandı. 10 dakika frensiz santrifüj yapıldı. Supernatan atıldı ve pelet 50 mL PBS ile dilue edildi. MNH' ler tripan mavisi boyama yöntemiyle sayıldı ve α -MEM (GIBCO, Invitrogen) [%20 FBS (Invitrogen), 100 U/mL penicillin, 100 μ L/mL streptomycin ve %1 L-glutamine (Sigma) ile zenginleştirerek] içerisinde 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde kültüre alındı. Kültürün üçüncü gününde, süspansiyon halde olan hücreler uzaklaştırıldı ve kültür kabı yüzeyine yapışan hücreler MKH olarak değerlendirildi. Taze kültür besiyeri eklendi ve iki günde bir besiyeri değiştirildi. %80-85 konfluense ulaşan hücreler TrypLE solüsyonu ile kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı ve hücre canlılığı tripan mavisi boyama yöntemiyle tayin edildi. Pasaj üçe getirilen MKH' ler; adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerine (Protokol için bkz. Sayfa 33-34) ve akım sitometri yöntemi ile hücre yüzey belirteci ifadelerine göre karakterize edildi.

Akım sitometri analizi için CD146+ perisitler ve MKH' ler, $2-5 \times 10^5$ hücre/mL FACS tamponu ile süspansiyon edildi ve 200 g' de beş dakika santrifüj ile çöktürüldü. Sonrasında hücreler floresan-konjuge anti-human antikoları [anti-human CD146 *phycoerythrin* (PE), anti-human CD31 *fluorescein isothiocyanate* (FITC), anti-human CD105 *allophycocyanin* (APC), anti-human CD45 *peridinin chlorophyll protein* (PerCP) ve anti-human CD34-PE] ile işaretlendi. Tüm antikolar Becton Dickinson Pharmingen'den (BD) alındı. CD146+ perisitlerin karakterizasyonu için ayrıca anti-human α -SMA-APC (R&D Systems, Minneapolis,

MN, ABD) kullanıldı. Hücreler bu antikorlar ile 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. İzotip kontrol olarak IgG1-PE, IgG1-FITC, IgG1-PerCP ve IgG1-APC kullanıldı. Hücreler üç kez FACS tamponu ile yıkandıktan sonra, analizleri BD FACS Diva Analysis Software v6.1.2 (BD Biosciences) ile yapıldı.

3.2.2. İmmünfloresan İşaretleme

CD146+ hücrelere özgü belirteçlerin (MAP1B ve NG2) varlığı immünfloresan boyama yöntemiyle tayin edildi (161). Bu amaçla hücreler PGM ile 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde kültüre alındı. Haftada iki kez kültür besiyeri değiştirildi. Konfluense ulaşan hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücreler %3,7 formaldehit ile 37°C' de 20 dakika fikse edildi. Ardından PBS ile iki kez yıkanan hücreler, %0,2 Triton/PBS (Sigma) ile 37°C' de 5 dakika bekletilerek permeabilize edildi. Blokaj işlemi için, %0,05 Tween/PBS (Sigma) ile iki kez yıkanan hücreler, %10 tavşan serumu (Life Technologies) içerisinde 37°C' de 30 dakika inkübe edildi. Blokaj işlemi sonrası hücreler, primer antikorlar (mouse anti-MAP1B ve mouse anti-NG2 antibody (Abcam Inc., Cambridge, MA, ABD)) ile 1 saat 37°C' de bekletildi. %0,05 Tween/PBS ile beş kez yıkanan hücrelere ikinci kez %10 tavşan serumu varlığında 15 dakika 37°C' de blokaj uygulandı. Son olarak, sekonder antikor Alexa 488 (Abcam), aktin boyası Phalloidin (Life Technologies) ve çekirdek boyası 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (Appllichem) ile 1 saat 37°C' de işaretlenen hücreler, sekiz kez %0,05 Tween/PBS ve bir kez dH₂O ile yıkandı. Hücreler üzerindeki floresan sinyali floresan mikroskop (Leica 6600, Almanya) ile görüntülendi.

3.3. CD146+ Perisitlerin Endotel Hücrelerine, Damar Düz Kas Hücrelerine ve Fibroblastlara Farklılaşabilme Kapasitelerinin İncelenmesi

3.3.1. Endotel Hücrelerine Farklılaşma

Perisitleri endotel hücrelerine farklılaştırmak amacıyla, MKH' lerin endotel hücrelerine farklılaşmalarını sağlayan besiyeri kullanıldı (114, 115, 164). CD146+ hücreler altı ve 24 kuyucuklu kültür kaplarına 5x10³ hücre/cm² olacak

şekilde ekildi ve PGM içinde 37 °C' deki %5' lik CO₂' li inkübatörde inkübe edildi. Konfluent duruma geldiklerinde kültür besiyeri çekilip kuyucuklar bir kez PBS ile yıkandı. Endotel hücresi farklılaşma besiyeri [DMEM-LG (Gibco, Life Technologies), 100 ng/mL VEGF (Sigma-Aldrich, USA), 50 ng/mL *epidermal growth factor* (EGF, PeproTech, İngiltere), 1 µg/mL *hydrocortisone* (Sigma-Aldrich), %5 FBS, %1 *Penicillin-Streptomycin* (10.000 µg/mL, Life Technologies, USA)] eklendi ve hücreler 14 gün kadar 37 °C'de %5' lik CO₂' li inkübatörde inkübe edildi. Besiyeri her iki günde bir değiştirildi. Elde edilen hücreler tripsinle kaldırılıp endotel hücresi yüzey belirteçlerine özgü monoklonal antikolar olan anti-human CD31 - FITC, anti-human VEGF *receptor* 1 (VEGFR-1, R&D Systems, Minneapolis, MN) - PE ve anti-human VEGFR-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) - PerCP ile işaretlenerek akım sitometrisi ile analiz edildi.

Endotel hücresi farklılaşması gerçekleşmediği takdirde tunika intima tabakasının oluşturulması için kullanılacak HUVEC' ler ticari olarak Lonza (Switzerland) firmasından temin edildi. Bu hücreler akım sitometrisi ile anti-human CD31 FITC, anti-human VEGFR-1 PE ve anti-human VEGFR-2 PerCP antikoları kullanılarak analiz edildi.

3.3.2. Fibroblast Farklılaşması

Perisitleri fibroblastlara farklılaştırmak amacıyla, MKH' lerin fibroblastlara farklılaşmalarını sağlayan yöntem kullanıldı (165). Hücreler, altı kuyucuklu kültür kaplarına 5x10³ hücre/cm² olacak şekilde ekildi ve PGM içinde 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde inkübe edildi. Konfluent duruma geldiklerinde kültür besiyeri çekilip kuyucuklar bir kez PBS ile yıkandı. Fibroblast farklılaşma besiyeri (FM) [DMEM-LG, 100 ng/mL *connective tissue growth factor* (CTGF, Sigma Aldrich), 50 µg/mL *ascorbic acid*, %10 FBS, 1% *Penicillin-Streptomycin*] eklendi ve hücreler 21 gün kadar FM içerisinde inkübe edildi. Besiyeri her iki günde bir değiştirildi. Elde edilen hücreler, TrypLE ile kaldırılıp fibroblast hücre yüzey belirteçlerine özgü monoklonal antikolar (anti-tenascin-C (Abcam) ve anti-collagen type I (Abcam)) ile boyanarak, immünfloresan boyamalarla analiz edildi.

Farklılaşma besiyeri ile 21 gün inkübe edilen CD146+ perisitlerin fibroblastlara özgü gen ifadeleri (tenascin-C ve kollajen tip I) bir de kantitatif

gerçek zamanlı PZR ile test edildi. PGM ile kültürleri yapılan perisitler negatif kontrol grubu, fibroblast büyüme besiyeri (FGM, Promocell) ile kültürleri yapılan sünnet derisi fibroblastları (ATCC) ise pozitif kontrol grubu olarak değerlendirildi. Total hücresel RNA, *EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-Preps Kit* (Bio Basic Inc.) kullanılarak izole edildi. İzole edilen RNA konsantrasyonu, *NanoDrop ND-1000* spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific Inc.) kullanılarak 260 nm' de ölçüldü ve A260/A280 oranı RNA ekstraksiyon kalitesini ölçmek amacıyla kullanıldı. *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio Rad, ABD) kullanılarak RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Gerçek zamanlı kantitatif PZR ile gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla *LightCycler® 480 II* (Roche, Almanya) cihazı kullanıldı. Son PZR reaksiyonu, 384 çukurlu qPCR plağı kullanıldığından, 10 µL [8 µL master mix: 1X primer-probe (Taqman Gene expression assays, Thermo Fisher Scientific Inc.), 1X *Light Cycler 480 probes master* (Roche) ve nükleaz içermeyen su ve 2 µL cDNA] olarak belirlendi. Kantitatif PZR koşulu: 95°C' de 10 dakika denatürasyon basamağı; toplamda 45 döngü olacak şekilde 95°C' de 10 saniye, 60°C' de 30 saniye ve 72°C' de 1 saniye PZR basamağı ve 40°C' de 30 saniye soğutma basamağı olarak ayarlandı. Her farklı deney koşulu için beş biyolojik tekrar (n=5) çalışıldı ve her örnek için üç teknik tekrar yapıldı. *LightCycler® 480 II* yazılımı kullanılarak hedef ve referans genler için *crossing point* (Cp) veya *threshold cycle* (Ct) değeri hesaplandı.

3.3.3. Düz Kas Hücrelerine Farklılaşma

Perisitleri damar düz kas hücrelerine farklılaştırmak amacıyla farklı yöntemler kullanıldı ve en etkili yöntem ve besiyeri içeriği belirlendi. Birinci yöntem olarak hipoksik ortam koşullarına sahip inkübatör (%5 O₂) kullanıldı (166). Hücreler altı kuyucuklu kültür kaplarında, 5x10³ hücre/cm² olacak şekilde ekildi ve PGM içinde 37 °C' deki %5' lik CO₂' li inkübatörde konfluent duruma gelene kadar inkübe edildi. Konfluent duruma geldiklerinde kültür besiyeri düz kas hücre farklılaşma besiyeri (SMCM) [*Smooth Muscle Cell Basal Medium* (PromoCell) (0.05 mL/mL FBS, 0.5 ng/mL EGF (PeproTech, İngiltere), 2 ng/mL *basic fibroblast growth factor* (bFGF, ImmunoTools, Almanya), 5 µg/mL insulin (Santa Cruz Biotechnology), %1 Penicillin-Streptomycin (10.000 µg/mL, Life

Technologies]] ile değiştirildi ve hücreler iki gün PGM ve SMCM içerisinde hipoksik ortamda inkübe edildi. Normoksik koşullara sahip ortamda (37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatör) inkübe edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı.

İkinci yöntem olarak, CD146+ hücreler 21 gün kadar SMCM içerisinde 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde inkübe edildi. Besiyeri her iki günde bir değiştirildi. Elde edilen hücreler, düz kas hücre yüzey markerlarına özgü monoklonal antikorlar (anti-human α -SMA (Abcam), anti-human calponin (R&D Systems), anti-human caldesmon (R&D Systems)) ile boyanarak immünfloresan boyamalar ve akım sitometrisi ile analiz edildi.

Üçüncü yöntem olarak, farklılaştırma süresini kısaltmak amacıyla, CD146+ hücrelerin düz kas hücrelerine farklılaşması için üç farklı besiyeri içeriği denendi. Bu amaçla H.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen ve aşağıda belirtilen üç farklı besiyeri ortamının denendiği proje tamamlandı (Proje No: THD-2015-6461).

Besiyeri 1 (M1): DMEM-LG, 5 ng/mL TGF β -1 (Peprotech), 2,5 ng/mL *Bone Morphogenic Protein 4* (BMP4, Biolegend, ABD), %1 FBS ve %1 Pen-Strep. CD146+ perivasküler hücreler M1 besiyerinde, 37°C' de %5 CO₂' li nemli inkübatörde yedi gün inkübe edildi ve iki günde bir besiyeri değişimi yapıldı (167).

Besiyeri 2 (M2): DMEM-LG, 1 ng/ml TGF β -1, 30 μ M *L-ascorbic acid* (L-AA), %20 FBS ve %1 Pen-Strep. CD146+ hücreler M2 besiyerinde 37°C' de %5 CO₂' li nemli inkübatörde yedi gün inkübe edildi ve iki günde bir besiyeri değişimi yapıldı (168).

Besiyeri 3 (M3): DMEM-LG, %2 at serumu ve %1 Pen-Strep. CD146+ hücreler M3 besiyerinde 37°C' de %5 CO₂' li nemli inkübatörde yedi gün inkübe edildi ve iki günde bir besiyeri değişimi yapıldı (169).

Yedi gün sonunda hücreler, düz kas hücre yüzey belirteçlerine özgü monoklonal antikorlar (anti- α -SMA, anti-calponin, anti-caldesmon) ile boyanarak immünfloresan boyamalarla analiz edildi. Analizler floresan mikroskop ile gerçekleştirildi.

İkinci bir BAP projesi kapsamında (Proje No: THD-2016-10504), CD146+ hücrelerin damar düz kas hücrelerine ve fibroblastlara farklılaşma kapasiteleri

gerçek zamanlı PZR yöntemi ile incelendi. Bu amaçla, CD146+ perivasküler hücreler PGM ile kültüre edildi ve çoğaltıldı. %80-85 konfluent olan hücreler TrypLE solüsyonu ile muamele edilerek pasajlama yapıldı ve hücre sayısı tripan mavisi ile boyanarak belirlendi. Pasaj üçe getirilmiş CD146+ hücreler altı kuyucuklu kültür plaklarında PGM ile çoğaltıldı ve %80-85 konfluent olduklarında dört farklı düz kas farklılaşma besiyeri (SMCM, M1, M2 ve M3) ile inkübe edildi. Fibroblast farklılaşması için ise; pasaj üçe getirilmiş CD146+ hücreler altı kuyucuklu kültür plaklarında PGM ile çoğaltıldı ve %80-85 konfluense ulaştıklarında FM ile 37°C' de %5 CO₂' li nemli inkübatörde 21 gün inkübe edildi. İki günde bir besiyeri değişimi yapıldı. Kontrol grubu olarak PGM içinde kültürü yapılan hücreler kullanıldı.

Farklılaşma besiyerleri ile inkübe edilen hücrelerin ve pozitif kontrol düz kas hücreleri olarak kullanılan *human umbilical artery smooth muscle cells* (hUASMC, Lonza, İsviçre), düz kas hücrelerine (calponin, caldesmon ve α -SMA) ve fibroblastlara özgü (tenascin-C, kollajen tip I) gen ifadeleri kantitatif gerçek zamanlı PZR ile analiz edildi (n=5). Total hücresel RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gerçek zamanlı kantitatif PZR ile gen ifadelerinin belirlenmesi işlemleri önceden belirtilen protokole göre yapıldı.

3.4. Üç Boyutlu Damar Yapısının Oluşturulması

Damar yapısında bulunan katmanları taklit etmek amacıyla; CD146+ hücrelerden farklılaştırılan ve sırasıyla damarın orta ve dış katmanında (tunika medya ve tunika adventisya) bulunduğu bilinen düz kas hücreleri ve fibroblastlar, yine damar yapısında bulunduğu bilinen ekstrasellüler matriks proteinleri ve glikozaminoglikanlar ile bir araya getirilerek 3B yapılar oluşturuldu. Bu amaca yönelik farklı yöntemler denendi.

Birinci yöntem kapsamında; hücre tabaka mühendisliği yöntemi kullanılarak düz kas hücresi ve fibroblast tabakaları elde edildi (tunika medya ve tunika adventisya tabakası) ve aralarına kollajen tip I yerleştirildi.

İkinci yöntem olarak; tunika medya katmanını taklit etmek amacıyla kollajen tip I ve elastin bir araya getirildi ve yapının sağlamlığı için "crosslinking" yöntemi

uygulandı. Tunika adventisya katmanını taklit etmek amacıyla kollajen tip I ve fibrin bir araya getirildi. Sonrasında oluşturulan bu katmanlar üzerine düz kas hücreleri (tunika medya) ve fibroblastlar (tunika adventisya) ekildi ve kültürleri yapıldı.

Üçüncü yöntemde; tunika medya (kollajen tip I, elastin ve düz kas hücreleri) ve tunika adventisya (kollajen tip I, fibrin ve fibroblastlar) katmanları silindirik bir formda bir araya getirildi ve kültürleri gerçekleştirildi.

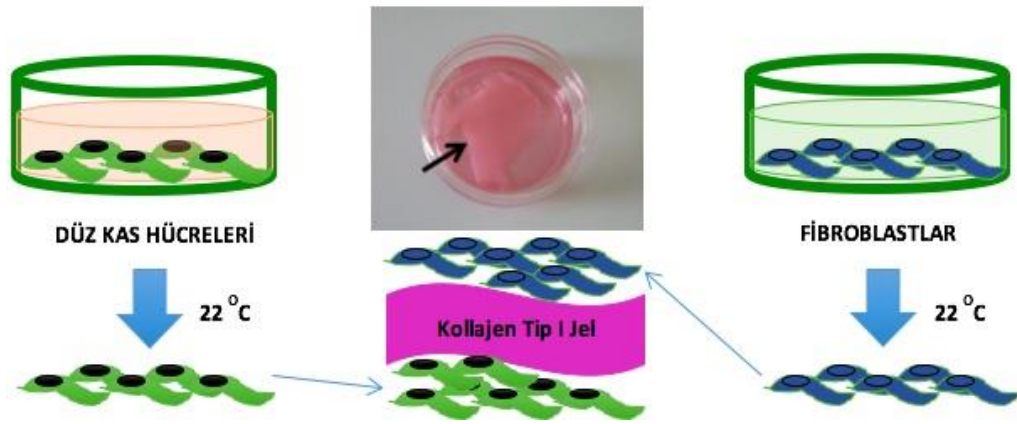
Dördüncü yöntem olarak; damarın tunika medya (kollajen tip I, elastin, dermatan sülfat ve düz kas hücreleri), tunika intima (fibronektin, heparin ve HUVEC) ve tunika adventisya (kollajen tip I, fibrin ve fibroblastlar) katmanları bir araya getirilerek 3B tübüler damar yapısı oluşturuldu.

3.4.1. Düz Kas Hücresi ve Fibroblast Tabakalarının Elde Edilmesi ve Bu Tabakaların Ekstrasellüler Matris Proteinleriyle Bir Araya Getirilmesi (Hücre Tabaka Mühendisliği Denemesi)

Pasaj üçe getirilen CD146+ hücreler düz kas hücrelerine ve fibroblastlara farklılaştırıldı. 50.000 fibroblast ve 50.000 düz kas hücresi PNIPAAm kaplı *Nunc™ UpCell™* kültür plaklarına (Thermo Fisher Scientific) ekildi ve sırasıyla fibroblast büyüme besiyeri (Promocell) ve düz kas hücresi büyüme besiyeri (Promocell) ile 37°C' de %5 CO₂' li nemli inkübatörde çoğaltıldı. Fibroblast ve düz kas hücre tabakaları, üretici firmanın talimatlarına göre (Nunc UpCell, Thermo Fisher Scientific) elde edildi (Şekil 3.2). Kısaca, hücreler konfluent olduktan sonra üzerlerindeki besiyeri çekildi ve 50 µL' ye yakın oda ısısına getirilmiş besiyeri eklendi. Hücrelerin üzerine membran (Thermo Fisher Scientific, USA) yerleştirildi ve 24-25°C' de hücre tabakası yüzeyden ayrılana kadar (15-40 dakika) beklendi. Steril bir penset yardımıyla membran kaldırılarak yeni bir alana yerleştirildi ve üzerine 10-25 µL/cm² olacak şekilde besiyeri eklendi. Fibroblastlar üstte olacak şekilde yeni plakaya yerleştirilen hücre tabakası üzerine jel haline getirilmiş kollajen tip I (VitroCol[®], Advanced BioMatrix, CA) eklendi. Fibroblast+kollajen tip I yapısı üzerine membran yardımıyla düz kas hücre tabakası eklendi. 30 dakika' ya

yakın 37°C' de inkübe edilerek, hücre tabakalarının membrandan ayrılması sağlandı. Membran üzerine 1 mL besiyeri eklendi ve steril penset yardımıyla dikkatlice membran hücre tabakası üzerinden çekildi. Fibroblast tabakası + kollajen tip I jel + düz kas hücre tabakasından oluşan üç katlı yapı meydana getirildi (Şekil 3.2). Yapı, 37°C' de %5 CO₂' li nemli inkübatörde inkübe edildi.

Yedinci gün sonunda bu yapıdan alınan kesitler fikse edildikten sonra paraffin bloklara gömüldü ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Petek Korkusuz tarafından *transmission electron microscopy* (TEM) görüntüleri elde edildi (protokol için Bkz. Sayfa 51). Fikse edilen, parafin bloklara gömülen ve kesitleri alınan üç katlı yapı *Hematoxylin – Eosin* (HE) ile boyandı.



Şekil 3.2. Hücre tabaka mühendisliği yaklaşımıyla damar modeli oluşturulması.

3.4.2. Tunika Medya + Tunika Adventisya (Crosslinking Denemesi)

Damarın orta katmanı olan tunika medyada yer aldığını bildiğimiz ekstrasellüler matris proteinlerinden kollajen tip I ve elastinin önce ayrı ayrı jel yapılarının oluşturulması ve bu iki jel yapısının iki farklı oranda birleştirilmesi hedeflendi. 3B kollajen tip I jel yapısı üreticinin talimatları doğrultusunda oluşturuldu. Kısaca, sekiz birim kollajen tip I üzerine yavaşça bir birim 10X PBS eklendi ve 0,1 M NaOH kullanılarak karışımın pH'sı yaklaşık 7,4' e ayarlandı. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Kollajen tip I ve elastin (Elastin Products Company, Inc., ABD), 2:1 ve 1:1,5 olacak şekilde iki farklı oranda karıştırıldı. Elde edilen kollajen tip I + elastin

karışımları 96 kuyucuklu kültür plağına paylaştırıldı. İki-üç saat 37°C' de bekletilerek jel oluşumu sağlandı. Oluşturulan iki farklı matriks yapısı üzerinde iki farklı **crosslinking** işlemi uygulandı.

1. Yöntem:

- MES: 30 dk. oda sıcaklığı
- MES+NHS+EDC: 4 saat
- Na₂HPO₄: 1 saat
- Na₂HPO₄: 1 saat
- NaCl: 2 saat
- NaCl: 1 gün
- 1 kere distile su ile yıkandı.

2. Yöntem:

- EDC (5 mM in 90% ethanol): 18 saat
- Na₂HPO₄: 1 saat
- PBS: 1 saat

(MES: 2 -morpholinoethane sulphonic acid, NHS: N-hydroxysuccinimide, EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylamino) propyl carbodiimide.)

Oluşturulan matriks yapıları üzerine CD146+ hücrelerden farklılaştırılan düz kas hücrelerinin ekimi yapıldı. Yedi günün sonunda hücre+matriks yapıları %10 formalin solüsyonu içerisinde fikse edildi. İkinci **crosslinking** yönteminin uygulandığı "kollajen tip I + elastin" ve hücre karışımı annexin V + DAPI + PI ile boyandı. Bu amaçla "The Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide" kiti (Invitrogen, ABD) kullanıldı. Üreticinin talimatları doğrultusunda, öncelikle örnek üzerindeki besiyeri çekildi. Örnek önce soğuk PBS ile daha sonra 1X *Annexin Binding Buffer* (ABB) ile yıkandı. 250 µL ABB üzerine 62,5 µL *annexin V* (her 100 µL için 5 – 25 µL) ve 5 µL *propidium iodide* (PI, 100 µg/mL) (her 100 µL için 1 – 2 µL) solüsyonundan eklendi ve örneğin üzerine uygulandı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Örnek iki kere ABB ile yıkandı ve floresan mikroskopta görüntülendi.

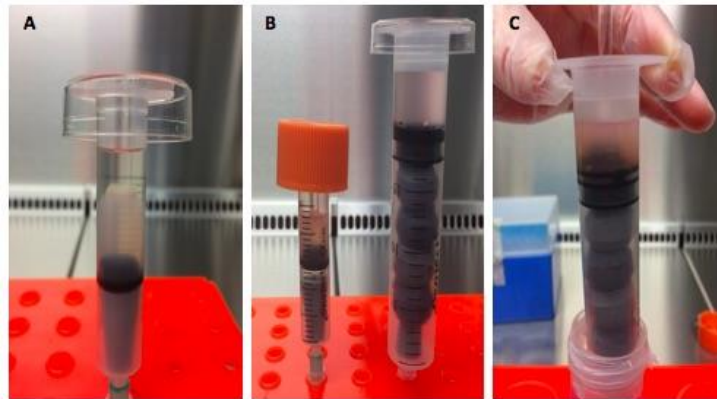
Damarın en dış katmanı tunika adventisyada yer aldığını bildiğimiz ekstrasellüler matriks proteinlerinden kollajen tip I ve fibrinin önce ayrı ayrı jel yapılarının oluşturulması ve bu iki jel yapısının birleştirilmesi hedeflendi. 3B kollajen tip I jel önceden belirtilen protokole göre hazırlandı (Bkz. sayfa 43). 3B

fibrin jel ise literatürde önceden tanımlanan yöntemle oluşturuldu (170, 171). Kısaca, 2 mL fibrinojen (6 mg/mL, Sigma, USA) ve 500 µL *thrombin* solüsyonu [2 mL DMEM-LG içine 37,5 µL *thrombin* (2,5 ünite, Sigma, USA) ve 7,5 µL *calcium chloride* (2N, Sigma, USA)] karıştırıldı. Oluşturulan fibrinojen+trombin (fibrin) karışımı 96 well plate kuyucuklarına paylaştırıldı. Ayrıca oluşturulan fibrin karışımı ile kollajen tip I, 2:1 oranında karıştırılarak farklı kuyucuklara paylaştırıldı. İki-üç saat 37°C' de jel oluşumu beklendi.

Oluşturulan matriks yapıları (kollajen tip I, fibrin, kollajen tip I+fibrin) üzerine hücre ekimi yapıldı. Hücre ekimi yapılmayan matriks yapıları kontrol olarak kullanıldı. Yedinci günün sonunda %10 formalin solüsyonu içerisinde fikse edilen kollajen tip I, fibrin, kollajen+fibrin ve matriks+hücre yapıları parafin bloklar içine gömüldü. HE ve Masson's Trichrome boyamaları yapıldı.

3.4.3. Tunika Medya + Tunika Adventisya (Silindirik Yapı Denemesi)

Damarın orta katmanını meydana getiren kollajen tip I ve elastin 2:1 oranında karıştırılarak 3B silindirik yapıda jel meydana getirildi. Üzerine ise CD146+ hücrelerden farklılaştırılan düz kas hücreleri ekildi (1×10^6 hücre/mL) (Şekil 3.3A). İki hafta boyunca hücrelerin jel içerisine penetre olup tutunması beklendi. Bir ay sonunda dış katman yapıya eklendi (Şekil 3.3B, C).



Şekil 3.3. İki katmanlı damar modeli oluşturma denemesi. A) Tunika medya-benzeri yapının oluşturulması, B) Tunika medya (solda) ve tunika adventisya (sağda) benzeri yapıların hazırlandığı düzenekler, C) Tunika medya ve tunika adventisya-benzeri yapıların birleştirilmesi.

Damarın dış katmanını meydana getiren ekstrasellüler matriks proteinleri kollajen tip I ve fibrin 1:1 oranında karıştırılarak orta katman etrafına silindirik bir yapı meydana getirecek şekilde eklendi. Jel içerisine CD146+ hücrelerden farklılaştırılan fibroblastlar da karıştırıldı (1×10^6 hücre/mL) (Şekil 3.3C). İki hafta boyunca iki katmanlı silindirik damar yapısı kültürde bekletildi. Bu sürenin sonunda iki katman birbirinden ayrıldı ve karakterizasyon testlerinin yapılabilmesi amacıyla histolojik doku takibi sonrası parafin bloklar içine gömüldü. Kızaklı mikrotomda elde edilen 5-7 μ m kalınlığındaki seri kesitler deparafinizasyon sonrası, genel morfolojiyi saptamak için HE ile, kollajen fibrilleri görüntülemek için *Masson's Trichrome* yöntemiyle boyandı.

3.4.4. Tunika Medya + Tunika İntima + Tunika Adventisya (Üç Katmanlı Damar Yapısı Oluşturulması)

- **Hücre Canlılığı ve Proliferasyon Testi**

Düz kas hücreleri, fibroblastlar ve HUVEC'lerin (Lonza) ilgili matriks proteini karışımlarının içinde kültürleri sırasında tutunma ve canlılıkları *Water Soluble Tetrazolium-1 (WST-1) Cell Proliferation Assay Kit* (Cayman Chemical, ABD) ile ölçüldü. HUVEC'ler 5000 hücre/well olacak şekilde, fibronektin (250 μ g/mL) ve heparin (3,78 mg/mL) ile kaplanan 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve *Endothelial Growth Medium* (EGM, Promocell) ile kültürleri yapıldı. Haftada iki kere kültür besiyeri değiştirildi. Düz kas hücreleri kollajen tip I (1,6 mg/mL), elastin (0,8 mg/mL) ve dermatan sülfat (0,01 mg/mL, R&D Systems) ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde karıştırıldı ve 96 kuyucuklu kültür kapları içinde 37°C 'de 2-3 saat jel oluşumu beklendi. Jelleşme sonrası hücre-matriks karışımı üzerine SMCM eklendi ve 37°C 'de 5%'lik CO_2 inkübatörde kültürleri yapıldı. Haftada iki kere kültür besiyeri değiştirildi. Fibroblastlar, kollajen tip I (1,6 mg/mL) ve fibrin (1,6 mg/mL) ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde karıştırıldı ve 96 kuyucuklu kültür kapları içinde 37°C 'de 2-3 saat jel oluşumu beklendi. Jelleşme sonrası hücre-matriks karışımı üzerine FM eklendi ve 37°C 'de 5%'lik CO_2 inkübatörde kültürleri yapıldı. Haftada iki kere kültür besiyeri değiştirildi. Hücre proliferasyonu ve canlılığı, kültürlerin 1., 2., ve 3. haftaları sonunda kit üreticisinin talimatlarına

göre test edildi. Kısaca, 10 µL WST-1 karışımı 100 µL kültür besiyeri içeren hücre kültürleri ve sadece besiyeri içeren (*blank*) kuyucuklara eklendi. WST-1' in besiyeri ile homojen şekilde karışması için kültür plakları 1 dakika hafifçe sallandıktan sonra, hücreler 2 saat 37°C' de 5%' lik CO₂ inkübatörde inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan renk değişiminin homojen şekilde yayılabilmesi için kültür plakları 1 dakika hafifçe sallandı. Son olarak her örnek için oluşan absorbans değeri (OD) mikropilaka okuyucusu ile 450 nm dalga boyunda okundu. Veriler; (Örneğin OD Değeri-Blank'in OD değeri) x 100/Örneğin OD Değeri şeklinde hesaplandı. Matriks proteinleriyle karıştırılmayan hücrelerin kültürü sonucu yapılan WST-1 testleri, kontrol grupları olarak değerlendirildi.

- **Üç Katmanlı Damar Yapısının Oluşturulması**

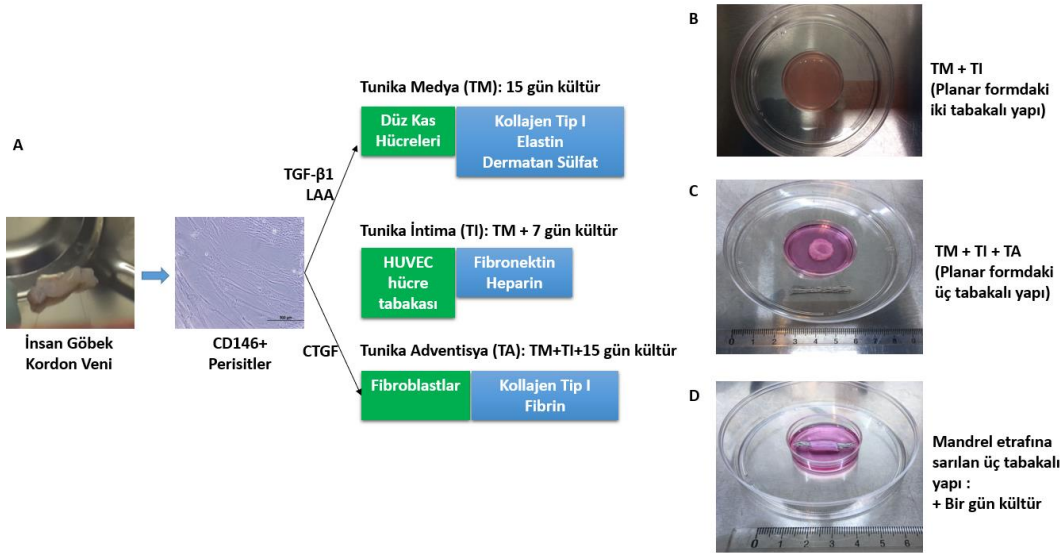
Damarın orta katmanı olan tunika medya tabakasını oluşturmak amacıyla, bu tabakada bulunduğu bilinen, insan kaynaklı kollajen tip I, elastin ve dermatan sülfat, CD146+ hücrelerden farklılaştırılan düz kas hücreleri ile karıştırıldı. Kollajen tip I solüsyonu, bölüm 3.4.1.' de tanımlanan prosedürden farklı olarak, malzeme içinde yer alan hücrelerin jelleşme sırasında canlılıklarının korunabilmesi için 10X PBS yerine 10X DMEM-LG kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan kollajen tip I solüsyonu, insan kaynaklı elastin ve rekombinant dermatan sülfat (R&D Systems, USA) ile, son konsantrasyonları sırasıyla 1,65 mg/mL, 0,83 mg/mL ve 0,01 mg/mL olacak şekilde karıştırıldı (172, 173). Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Bu karışıma son olarak CD146+ hücrelerden farklılaştırılan düz kas hücreleri 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde eklendi ve 35mm' lik petri içerisinde 37°C' lik inkübatörde 2-3 saat jel yapısının oluşması beklendi. Jel oluşumundan sonra tunika medya yapısının üzerine SMCM eklendi. Bu yapının 15 gün boyunca 37°C' de 5%' lik CO₂ 'li inkübatörde kültürü yapıldı (Şekil 3.4A). Üç günde bir kültür besiyeri değiştirildi.

Damar yapısının lümen kısmını (tunika intima) oluşturmak amacıyla, oluşturulan tunika medya katmanının yüzeyi, 2 saat 37°C' de inkübasyonla, fibronektin (250 µg/mL, Sigma, USA) ve heparin (3,78 mg/mL, Mustafa Nevzat, Türkiye) karışımı ile kaplandı. Sonrasında, HUVEC bu yüzey üzerine "hücre tabaka mühendisliği" yöntemi kullanılarak tabaka şeklinde aktarıldı. Bu işlem için

HUVEC'ler, PNIPAAm kaplı hücre kültür plaklarına ekildi ve EGM ile konfluent olana kadar 37°C' de 5%' lik CO₂' li inkübatörde kültürleri yapıldı. HUVEC tabakası, *Nunc Upcell* yüzeyinden, üretici firmanın sağladığı membran yardımıyla, sıcaklığı 15-40 dakika boyunca 24-25°C' ye düşürerek kardırıldı. Membran üzerindeki HUVEC tabakası, fibronektin ve heparin ile kaplanan tunika medya yapısının üzerine transfer edildi. 37°C' de 30 dakikalık inkübasyondan sonra, membran, steril bir penset yardımıyla, HUVEC tabakasını tunika medya üzerinde bırakacak şekilde yüzeyden çekildi. Tunika medya + tunika intima tabakalarının birlikte yedi gün boyunca EGM ile 37°C' de 5%' lik CO₂' li inkübatörde kültürü yapıldı (Şekil 3.4A, B). Üç günde bir kültür besiyeri değiştirildi.

Damarın dış katmanı olan tunika adventisya tabakasını oluşturmak amacıyla, bu tabakada bulunduğu bilinen, insan kaynaklı kollajen tip I ve fibrin, CD146+ hücrelerden farklılaştırılan fibroblastlar ile karıştırıldı. Kollajen tip I solüsyonu bölüm 3.4.4.' de tanımlanan prosedür ile hazırlandı. Fibrin solüsyonu (fibrinojen ve thrombin karışımı) ise bölüm 3.4.2.' de tanımlanan prosedür ile hazırlandı. Kollajen tip I ve fibrin solüsyonları, son konsantrasyonları ikisinin de 1,65 mg/mL olacak şekilde karıştırıldı (170). Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Bu karışıma son olarak CD146+ hücrelerden farklılaştırılan fibroblastlar 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde eklendi. Oluşturulan tunika adventisya karışımı, küçük petri (35mm çaplı) içerisinde bulunan tunika medya-tunika intima yapısı üzerine eklendi. 37 °C' lik inkübatörde 2-3 saat jel oluşumu beklendi. Jel oluşumundan sonra, üç tabakalı (tunika adventisya+tunika medya+tunika intima) yapının üzerine FM eklendi ve 15 gün 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde kültürü yapıldı (Şekil 3.4A, C). Üç günde bir kültür besiyeri değiştirildi.

Petri kabı içinde 15 gün kültürü yapılan, üç katmanlı damar yapısı, metal mandrel etrafına sarılarak tübüler (4mm çapa sahip) yapıda bir greft elde edildi. Bir gün süreyle kültür besiyeri içerisinde 37°C' de %5' lik inkübatörde bekletildikten sonra, bu tübüler yapıdan karakterizasyon testleri için örnekler alındı (Şekil 3.4D).



Şekil 3.4. Üç tabakalı damar modelinin oluşturulmasındaki ana basamaklar. A) CD146+ perisitlerin insan göbek kordon veninden izole edilmesi ve düz kas hücrelerine ve fibroblastlara farklılaştırıldıktan sonra insan ekstrasellüler matriks proteinleri/glikozaminoglikanlarla birleştirilerek damar tabakalarının oluşturulması, B) Tunika medya (TM) ve tunika intima (TI) benzeri iki tabakalı yapının petri kabı içerisindeki görünümü, C) TM+TI+tunika adventisya (TA)-benzeri üç tabakalı damar yapısının petri kabı içerisindeki görünümü, D) Metal mandrel etrafına sarılan üç tabakalı damar yapısının görünümü.

- **Trombosit Adezyon Testi**

Kordon Kanı MNH' leri içerisinde CD34+ hücrelerin izolasyonu önceden tanımlanan yöntemle yapıldı (174). Taze veya dondurulmuş 4-5 donöre ait MNH' ler birleştirildi ve konsantrasyonu 2×10^7 hücre/mL olacak şekilde ayarlandı. CD34 + hücreler negatif seçilim yöntemiyle *Easy Sep Cell Separation System* ve *Human Progenitor Enrichment Cocktail* (STEMCELL Technologies, Kanada) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda izole edildi. CD34+ hücre popülasyonunun saflığı akım sitometri yöntemiyle doğrulandı (174). CD34+ hücrelerce zenginleştirilmiş kordon kanı hücreleri 12 gün boyunca kültür edildi.

Megakaryosit/Trombosit farklılaşması: CD34+ hücreler *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM, Invitrogen) besiyeri [%20 serum solüsyonu (BIT, Stem Cell Technologies), 40 µg/mL LDL (Sigma), 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Sigma) ve farklı kombinasyonlarda insan sitokinleri; thrombopoietin (TPO), stem

cell factor (SCF) ve Flt-3 *ligand*, PeproTech) ile zenginleştirerek] ile kültür edildi. CD34+ hücreler, 2×10^4 hücre/mL olacak şekilde OMPC [TPO (35 ng/mL), SCF (10 ng/mL), FL (11 ng/mL)] içinde altıncı günde ve 10. günde dilüsyonlar yapılarak 12 gün kültürde tutuldu. Akım sitometri yöntemiyle, farklılaştırılan hücrelerde, trombositlere özgü belirteç (CD41 ve CD61) ifadeleri ölçüldü. 11. günde Giemsa boyama yöntemiyle megakaryosit morfolojisi incelendi.

Planar yapıda oluşturulan, HUVEC ekimi yapıp yedi gün kültürde bekletilen üç katmanlı damar yapısı üzerinden kültür besiyeri çekildi. Bir kez PBS ile yıkama yapıldı. Damar yapısının endotel tabakası üzerine 2 mL trombosit süspansiyonu eklendi ve 37°C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde iki gün statik koşullarda kültüre edildi. İnkübasyondan sonra trombosit süspansiyonu yapının üzerinden çekildi ve yapışmayan hücreleri uzaklaştırmak amacıyla bir kez yavaşça sallayarak PBS ile yıkandı. Yapının üzerine 1 mL PBS eklenerek örneğin kurumaması sağlandı. Örnek iki parçaya kesildi ve bir parçası dik, bir parçası yatay olacak şekilde parafine gömüldü. Sonrasında yatay parçadan (endotel tabakası tarafından) alınan parafin kesitler, immünfloresan boyama yöntemiyle (anti-human CD41a - FITC ve anti-human CD61 - PE) boyandı. Görüntüler floresan mikroskopla alındı.

- **Hücre Canlılığı Testi**

Oluşturulan 3B yapı içerisindeki hücrelerin canlılığı *"The Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide"* kiti kullanılarak ölçüldü (Protokol için Bkz. Sayfa 44). Hücreler konfokal lazer taramalı mikroskopta (LSM Pascal, Zeiss, Almanya) görüntülendi.

- **Parafin ve Frozen Kesitlerin Histokimyasal ve İmmünfloresan Boyamalarla Analizi**

Histokimyasal analiz için, damar yapısından alınan bir parça öncelikle %10 formalin (pH: 7,0) içerisinde oda sıcaklığında fikse edildi, PBS ile yıkandı ve alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Otomatize doku gömme cihazı ile parafin blok içine gömüldükten sonra 5-7 µm kalınlıkta seri kesitler alındı. Kesitler, HE, *Verhoeff Van Gieson*, Mallory ve Masson Trikrom boyama yöntemleri kullanılarak boyandı. Boyanan kesitlerin ışık mikroskopunda

incelenerek, bağlantılı dijital kamera (Leica DMR, DC500, Wetzlar, Germany) ile görüntüleri elde edildi.

İmmünofloresan analiz için, damar yapısının diğer bir parçası sıvı nitrojen içerisine daldırılarak donduruldu ve -80°C ' de muhafaza edildi. Poly-L-lizin kaplı lamalar üzerine kriyostat ile 5-7 μm kalınlıkta alınan kesitler, indirekt immünofloresan işaretleme yöntemiyle boyandı (161). Boyama işlemi bölüm 3.2.3.' te açıklanan yöntem modifiye edilerek gerçekleştirildi. Üç tabakalı damar yapısına eklenen fibroblastlar, düz kas hücreleri ve endotel hücreleri sırasıyla *mouse anti-human Tenascin-C*, *mouse anti-human α -SMA* ve *mouse anti-human VEGFR1* antikoları ile bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilerek işaretlendi. Yıkama ve serum blokajı işlemlerinden sonra, sekonder antikor Alexa Fluor® 488 –konjuge *rabbit anti-mouse IgG* (Thermo Fisher Scientific) ve çekirdek boyası DAPI (Applichem) ile 1 saat oda sıcaklığında işaretlenen hücreler, floresan mikroskop (Leica) ile incelenerek bağlantılı kamera ile görüntülendi. Kontrol grubu olarak, primer antikor boyama basamağında üzerine antikor eklenmeyen hücre grubu kullanıldı.

- **Geçirimli ve Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM ve SEM) Analizleri**

Geçirimli elektron mikroskobu analizi için, damar yapıları %2,5 glutaraldehit (0,01 M PBS içinde, pH 7.0) içinde bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ ' de fikse edildikten sonra PBS ile yıkandı ve %1 osmiyum tetroksid ile 4°C ' de 2 saat tekrar fikse edildi. Alkol serilerinden geçirildikten sonra otomatize doku gömme cihazı ile araldit (EMS, Almanya) içine gömüldü. Yarı ince kesitler metilen mavisi Azur II, ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra TEM (Jeol, JEM1400, Japonya) ve ona bağlı dijital kamera (Orius, Almanya) ile analiz edildi.

Scanning electron microscopy analizi için, damar yapıları %2,5 glutaraldehit (0,01 M PBS içinde, pH 7.0) içinde bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ ' de fikse edildikten sonra PBS ile yıkandı ve alkol serilerinden geçirildi. Kritik nokta kurutucu (Tousimis, Tayvan) ile kurutulduktan sonra 10 nm kalınlığında palladyum altın ile kaplandı (*Precision etching coating system*, GATAN 682, ABD). Bloklar yüksek voltajlı SEM (Fei Quanta 200F, ABD) ve ona bağlı 3B dijital görüntüleme sistemi (GATAN) ile görüntülendi.

4. BULGULAR

4.1. İki Ayrı Yöntem ile İzole Edilen İnsan Göbek Kordonu Veni CD146+ Perisitlerin Karşılaştırılması

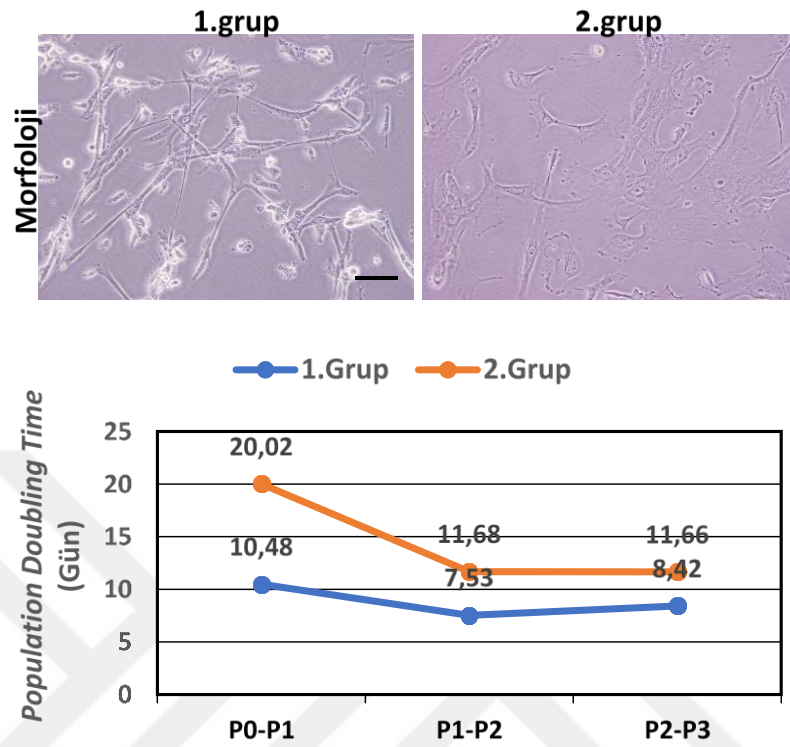
4.1.1. Morfoloji ve *Population Doubling Time*

İnsan göbek kordonu veni etrafından iki ayrı yöntemle izole edilen ve kültüre alınan CD146+ hücreler, bir-iki gün içerisinde kültür kabı yüzeyine yapışmaya başladı. 1. Grup' ta yer alan hücreler iki-üç hafta içerisinde %80-85 oranında konfluense ulaşırken, 2. Grup' ta yer alan hücrelerin sayılarını ikiye katlama süreleri daha uzun olduğundan daha geç konfluense ulaştıkları ve genellikle konfluens oranlarının %70' i geçmedikleri gözlemlendi. Pasaj üçte elde edilen ışık mikroskobu görüntülerine göre, 1. grup hücreler PGM, 2. grup hücreler zenginleştirilmiş DMEM-HG ile kültüre edildiklerinde, morfolojik olarak büyük, düzensiz uzantıları olan, iğ biçimli, fibroblast görünümü hücreler olarak tanımlandı (Şekil 4.1). İki grup hücre benzer görünüme sahip olmalarının yanında, 1. Grup' taki hücrelerin daha çok fibroblast benzeri görünüme sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1). *Population doubling time* grafiğine göre, 1. Grup' taki hücrelerin 2. Grup' takilere göre kültürde sayılarını ikiye katlama süreleri daha kısa olup daha hızlı konfluense ulaştıkları saptandı (Şekil 4.1).

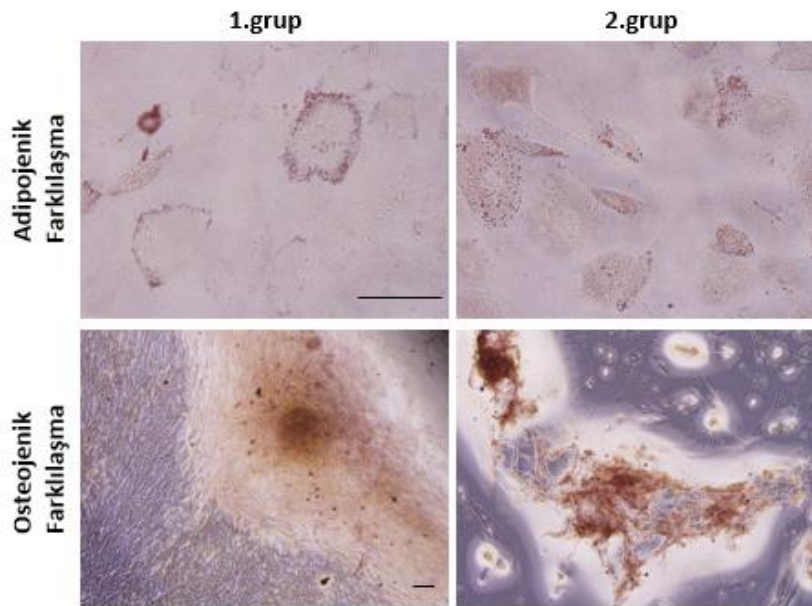
4.1.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşma Kapasiteleri

İki gruba ait CD146+ hücrelerin, adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri, adipojenik ve osteojenik farklılaşma besiyerleri ile 21 gün kültürleri sonunda, sırasıyla *oil red o* ve alizarin kırmızısı boyama yöntemleri kullanılarak tayin edildi. Adipojenik indüksiyon sonucu, iki gruba ait CD146+ hücrelerin sitoplazmaları içinde *oil red o* ile boyanan yağ damlacıklarının biriktiği gözlemlendi (Şekil 4.2). İki gruba ait CD146+ hücrelerin, osteojenik farklılaşmaları sonucu oluşması ve alizarin kırmızısı ile boyanması beklenen kalsiyum agregatları nadiren gözlemlendi ya da hiç gözlenmedi (Şekil 4.2). 21 gün boyunca PGM (1. Grup CD146+ hücreler için) ve DMEM-HG (2. Grup CD146+ hücreler için) ile kültürü

gerçekleştirilen hücrelerde (kontrol grubu) osteojenik ve adipojenik farklılaşma gözlenmedi (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. İki farklı yöntemle izole edilen insan göbek kordon veni perisitlerinin PGM (1. Grup) ve zenginleştirilmiş DMEM-HG (2. Grup) ile kültürleri sonucu iç biçimli morfolojik görünümleri ve *population doubling time* grafiği. Bar = 200 µm.



Şekil 4.2. İki gruba ait insan göbek kordon veni perisitlerinin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin oil red O ve alizarin kırmızısı boyama yöntemleriyle test edilmesi. Bar = 200 µm.

4.1.3. İki Gruba Ait CD146+ Hücrelerin Gen İfade Profilleri

İki farklı yöntemle izole edilen üçer donöre ait CD146+ hücrelerin transkriptom profili insan MKH transkriptomu ile karşılaştırıldı. Bu yaklaşımda, iki farklı grubun birbirine benzerliğini test etmek için, torrent server tarafından otomatik olarak hesaplanan korelasyon katsayıları incelendi. İnsan Ki kaynaklı MKH' ler referans olarak kabul edildiğinde iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı ve iki grubun da MKH'lere eşit derecede benzediği gösterildi.

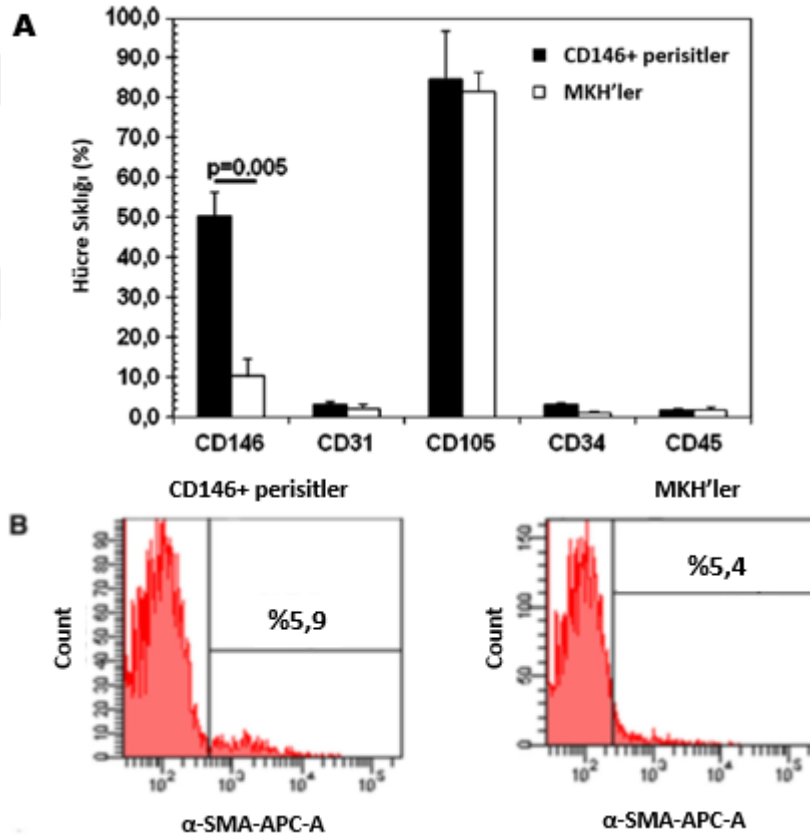
Korelasyon analizlerinde fark saptanmayan deney gruplarının birbirleri ile karşılaştırmalı analizi yapıldı. Bu yaklaşımda ise üçlü grupların önce kendi içlerinde ortalaması alındı ve ardından karşılaştırmaya geçildi. Gen ifade değerleri kantitatif olarak kıyaslanırken dört kat ve üzerinde olan ifade değişimleri listelendi. İfade değişimi saptanan bu genlerin MKH-özgül gen olup olmadıklarının kontrolü için transkriptom verilerinden yararlanıldı. Sağlıklı MKH hücrelerinde ifade olmayan 17 genin 2. Grup' ta yer alan hücrelerde, 17 genin ise 1. Grup' ta yer alan hücrelerde yüksek ifadesi saptandı. Bununla beraber, MKH' lerde ifadesi gözlenmesine karşın, 12 genin 1. Grupta, 6 genin ise 2. Grupta ifade edilmediği gözlemlendi. 1. Grup' taki hücrelerin, 2. Gruba göre; MKH spesifik olduğu düşünülen genlerden CXCL3, CYGB, PLAUI, ESM1, HGF, MT1L, KCNH1, TBX2, EGR1 ve RPLP2'i daha yüksek düzeyde ifade ettiği görüldü. Buna karşın PRUNE2, GPC4, TINAGL1, SRGN, EPHA ve HLA-C genlerinin ise 2. Grup hücrelerde yüksek ifadesi tespit edildi. Transkriptom analizlerine göre, 1. Grupta yer alan hücrelerin PDGFRa, CXCL3, STC1, HGF, CYGB, ESM1, E2F7 gen ifadelerinin perisitlere özgü gen ifadeleri olarak literatürde yer aldıkları bilinmektedir. 1. Grupta yer alan hücrelerin bu gen ifadeleri, 2. Grupta yer alan hücrelerinkine kıyasla 9, 40, 29, 12, 25, 14 ve 10,5 kat daha fazla bulunmuştur.

4.2. 1. Grup CD146+ Perisitlerin İleri Karakterizasyon Testleri

4.2.1. Hücreye Özgü Yüzey Belirteçlerinin Tayini- Akım Sitometri Analizi

Üçüncü pasaja getirilmiş insan göbek kordonu veni perisitlerinin bulundukları yüzey belirteçleri akım sitometri yöntemiyle belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre; perisitlerin MKH' lardan 4,8 kat daha yüksek oranda

CD146 (%50,4 ± 6,2 vs. %10,4 ± 4,2, p=0,005) ve MKH'lerle benzer oranda CD105 (%84,6 ± 12,2 vs. %81,6 ± 5,1) belirteci ifade ettikleri gösterildi (Şekil 4.3A). Bir endotel hücresi belirteci olan CD31 ifadesi ise beklendiği üzere iki hücre tipinde de düşük oranda (%3,2 ± 0,9 vs. %2,2 ± 1,0) saptandı (Şekil 4.3A). Hematopoetik kök hücre yüzey belirteçleri olan CD34 (%3,0 ± 0,6 vs. %1,2 ± 0,2) ve CD45 (%1,8 ± 0,4 vs. 1,8 ± 0,8) ifadelerinin ise beklendiği üzere iki hücre tipinde de benzer bir şekilde düşük oranda saptandı (Şekil 4.3A). Bu, kültürde hematopoetik ve endotel hücresi kontaminasyonunun olmadığını göstergesi olarak kabul edildi. CD146+ hücrelerin, yüksek oranda CD146 ifade etmelerinin yanında, MKH'lere benzer olarak az oranda (%5,9) α -SMA ifade ettikleri gösterildi (Şekil 4.3C).

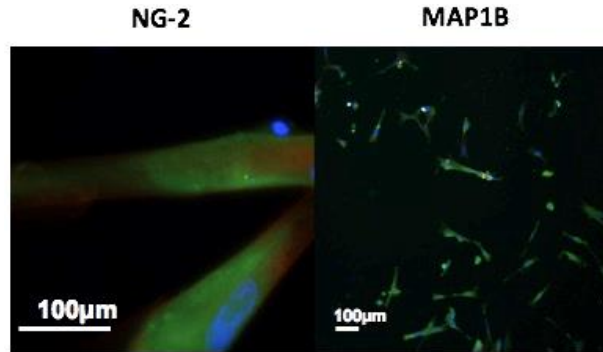


Şekil 4.3. Perisitlerin karakterizasyonunda akım sitometri analizleri. A) Perisit ve MKH'lerin hücre yüzey belirteç (CD146, CD31, CD105, CD34, CD45), B) (α -SMA) ifadelerinin akım sitometri analizi ile karşılaştırılması (161).

4.2.2. Hücreye Özgü Belirteçlerin Tayini – İmmüno Floresan İşaretleme

CD146'nın yanında, perisitlere özgü belirteçler olarak kabul edilen MAP1B ve NG2 belirteçlerinin varlığı immüno floresan işaretleme yöntemiyle tayin edildi.

Perisitlerin beklendiği üzere bu hücre belirteçlerini taşıdığı Şekil 4.4'te gösterilmiştir (yeşil floresan).



Şekil 4.4. Perisitlerin immünsitokimyasal karakterizasyonu (162). [Çekirdekler: DAPI (mavi floresan), NG-2 ve MAP-1B belirteçlerinin ifadesi: Alexa 488 (yeşil floresan)]. Bar = 100 µm.

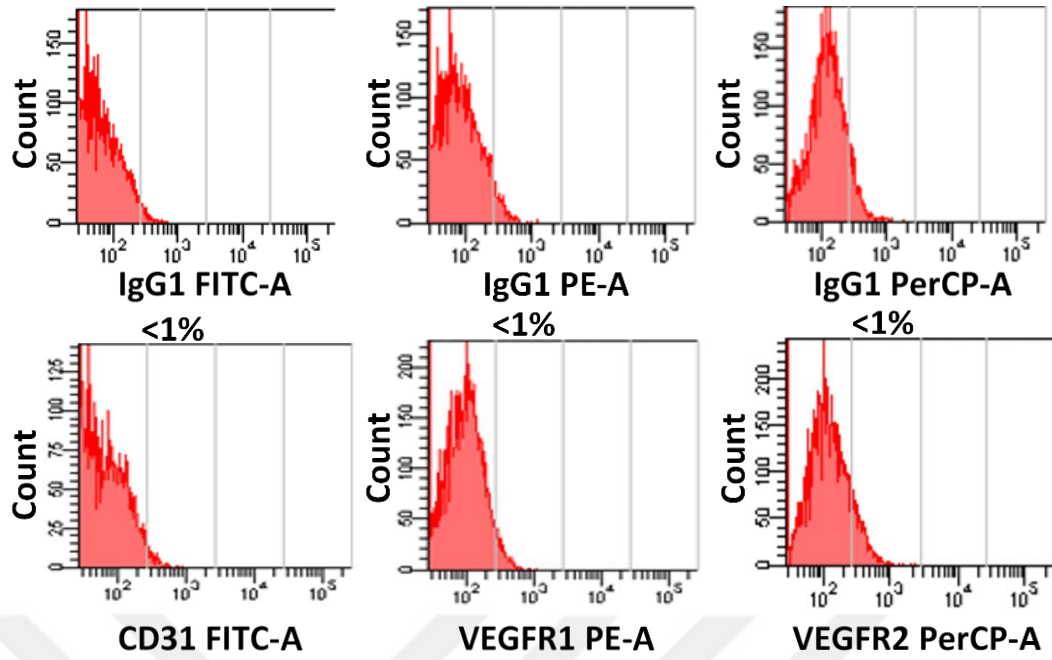
4.3. Perisitlerin Damar Hücre Tiplerine Farklılaşma Kapasiteleri

4.3.1. Endotel Hücresi Farklılaşması

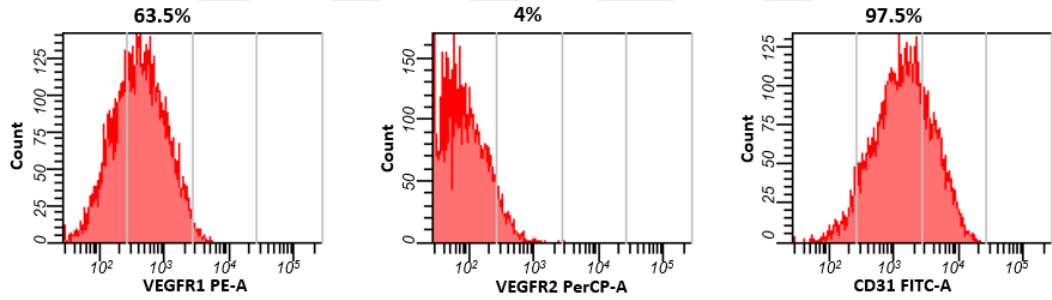
İnsan göbek kordonu veninden izole edilen perisitler endotel hücresi farklılaşma besiyeri ile 14 gün muamele edildikten sonra CD31, VEGFR-1 ve VEGFR-2 yüzey belirteci ifadesi açısından akım sitometride incelendi. Buna göre, farklılaştırılan hücrelerin, endotel hücrelerine özgü belirteçleri %1' den düşük oranda sentezledikleri bulundu (Şekil 4.5). Bu nedenle, oluşturulması planlanan damar modelinin tunika intima tabakasını oluşturmak amacıyla HUVEC hattı kullanıldı. Akım sitometri analizlerine göre, HUVEC' lerin yüksek oranda CD31 ve VEGFR1, düşük oranda VEGFR2 ifade ettikleri gözlemlendi (Şekil 4.6).

4.3.2. Fibroblast Farklılaşması

Perisitler PGM ve FM ile 21 gün inkübe edildikten sonra anti-tenascin-C ve anti-kollagen tip I antikoru ile immünfloresan işaretleme yöntemiyle görüntülendi. Sonuç olarak PGM ile inkübe olan hücrelerin tenascin-C belirteci yönünden pozitif, FM ile farklılaşmaları indüklenen hücrelerin tenascin-C ve kollagen tip I belirteçleri yönünden pozitif olarak boyandıkları gözlemlendi (Şekil 4.7A).

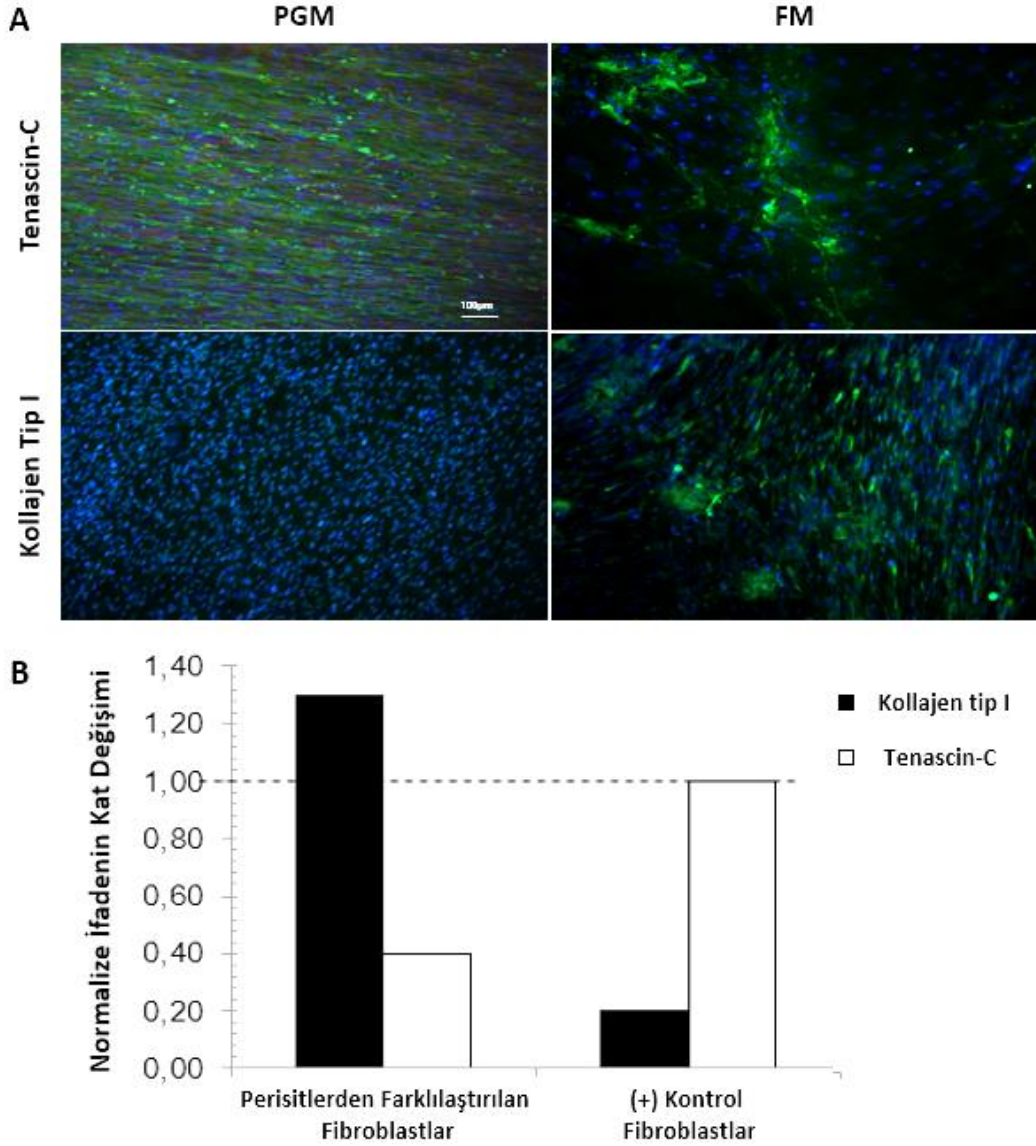


Şekil 4.5. Endotel hücresi farklılaşma prosedürü sonrası perisitlerin CD31, VEGFR-1 ve VEGFR-2 yüzey belirteci ifadelerinin akım sitometri analizleri.



Şekil 4.6. HUVEC'lerin yüzey belirteci ifadelerinin akım sitometri analizleri.

CD146+ perisitlerden farklılaştırılan fibroblastların ve (+) kontrol fibroblastların (sünnet derisi fibroblastları) tenascin-C ve kollajen tip I gen ifadeleri kantitatif gerçek zamanlı PZR ile karşılaştırıldığında, farklılaştırılmış olanların her iki geni de ifade ettikleri ve hatta kollajen tip I' i pozitif kontrolden daha fazla ifade ettikleri tespit edilmiştir (n=3) (Şekil 4.7B). Elde ettiğimiz immünfloresan boyama ve PZR sonuçlarına göre, insan göbek kordonu kökenli perisitlerin tenascin-C ifade ettikleri ve kollajen tip I' in ifadesindeki artışa göre, FM'nin bu hücrelerin fibroblast farklılaşmasında etkin olduğu söylenebilir.



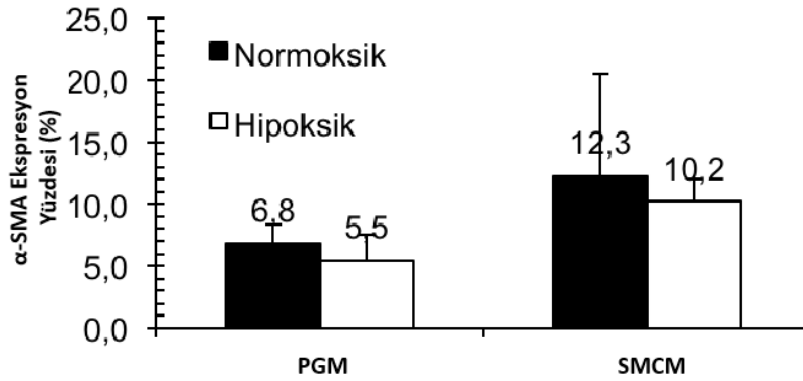
Şekil 4.7. CD146+ perisitlerin fibroblast farklılaşma sonuçları. A) Perisitlerin *pericyte growth medium* (PGM) ve fibroblast farklılaşma besiyeri (FM) ile kültürleri sonrası tenascin-C ve kollajen tip I ifadelerinin immünfloresan mikroskop görüntüleri (162). [Çekirdekler: DAPI (mavi floresan), tenascin-C ve kollajen tip I belirteçlerinin ifadesi: Alexa 488 (yeşil floresan)]. Bar = 100 µm. B) CD146+ perisitlerden farklılaştırılan fibroblastlar ve (+) kontrol fibroblastların tenascin-C ve kollajen tip I gen ifadelerinin kantitatif gerçek zamanlı PZR ile karşılaştırılması.

4.3.3. Düz Kas Hücresi Farklılaşması

Perisitler, normoksik ve hipoksik ortamda PGM ve SMCM içerisinde inkübe edildi ve sonrasında CD146 ve α -SMA belirteçlerinin ifadesi yönünden akım sitometri ile analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre CD146+ hücrelerin,

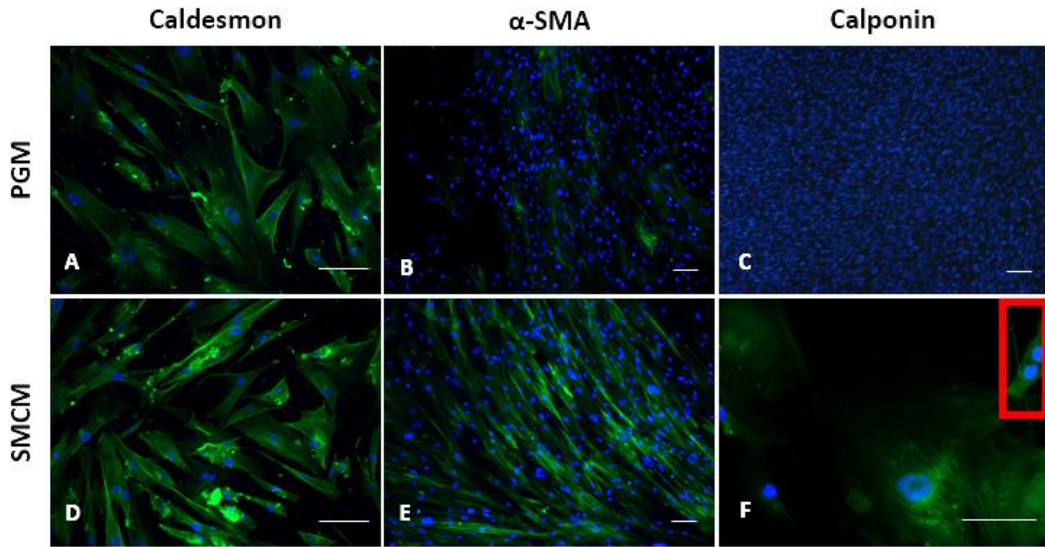
SMCM ile normoksik ve hipoksik ortamda inkübe edildiklerinde PM' ye göre daha fazla α -SMA ifadesi gösterdikleri, ancak istatistiksel anlamda anlamlı olmadıkları bulundu (Şekil 4.8).

Perisitler, PGM ve SMCM ile normoksik koşulda inkübe edildikten sonra anti- α -SMA, anti-caldesmon ve anti-calponin antikorları ile immünfloresan boyamalarla boyandılar. Sonuç olarak, PGM ile inkübe olan hücreler caldesmon (Şekil 4.9A) ve düşük oranda α -SMA (Şekil 4.9B) belirteçleri yönünden pozitif, SMCM ile farklılaşmaları indüklenen hücreler caldesmon (Şekil 4.9D), calponin (Şekil 4.9E) ve α -SMA (Şekil 4.9F) belirteçleri yönünden yüksek oranda pozitif olarak boyandılar. Ayrıca SMCM ile farklılaşmaları indüklenen hücrelerin birden fazla çekirdeğe sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.9F).



Şekil 4.8. Perisitlerin normoksik ve hipoksik ortamda inkübasyonları sonrasında α -SMA ifadelerinin akım sitometri analizi.

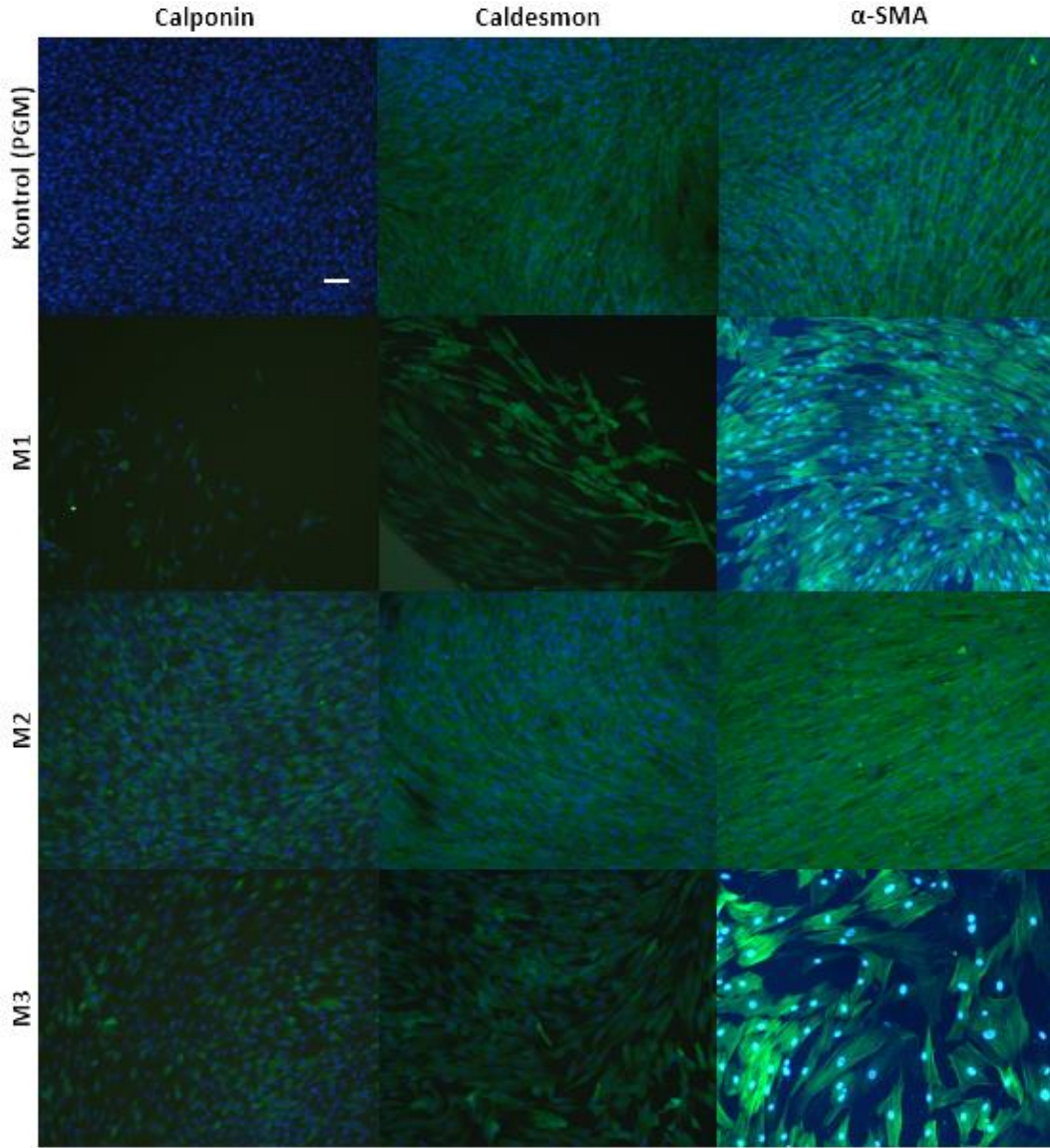
Perisitlerin düz kas farklılaşması için gerekli 21 günlük süreyi azaltmak amacıyla, üç farklı farklılaşma besiyerinin (M1, M2 ve M3) etkinliği denendi. Hücrelerin bu üç besiyeri varlığında yedi günde düz kas hücrelerine farklılaşmaları ve bunların arasından en etkili besiyerinin seçilmesi amaçlandı. Bu üç besiyerinin düz kas farklılaşmasındaki etkileri immünfloresan işaretleme ile analiz edildi ve karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, 1. besiyeri ile inkübe edilen hücrelerin yüksek oranda α -SMA ve düşük oranda caldesmon ifade ettikleri fakat calponin ifade etmedikleri gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.9. Perisitlerin PGM ve SMCM ile inkübasyonu sonucu caldesmon, α -SMA ve calponin ifadelerinin immünfloresan boyamayla incelenmesi. PGM ile inkübe olan hücreler caldesmon ve düşük oranda α -SMA belirteçleri yönünden pozitif (A, B), SMCM ile farklılaşmaları indüklenen hücrelerin caldesmon, α -SMA ve calponin belirteçleri yönünden pozitif olarak boyandıkları gözlemlendi (D, E, F). Aynı zamanda birden fazla çekirdeğe sahip olan hücreler tespit edildi (F). [Çekirdekler: DAPI (mavi floresan), α -SMA, calponin ve caldesmon belirteçlerinin ifadesi: Alexa 488 (yeşil floresan)]. Bar = 100 μ m.

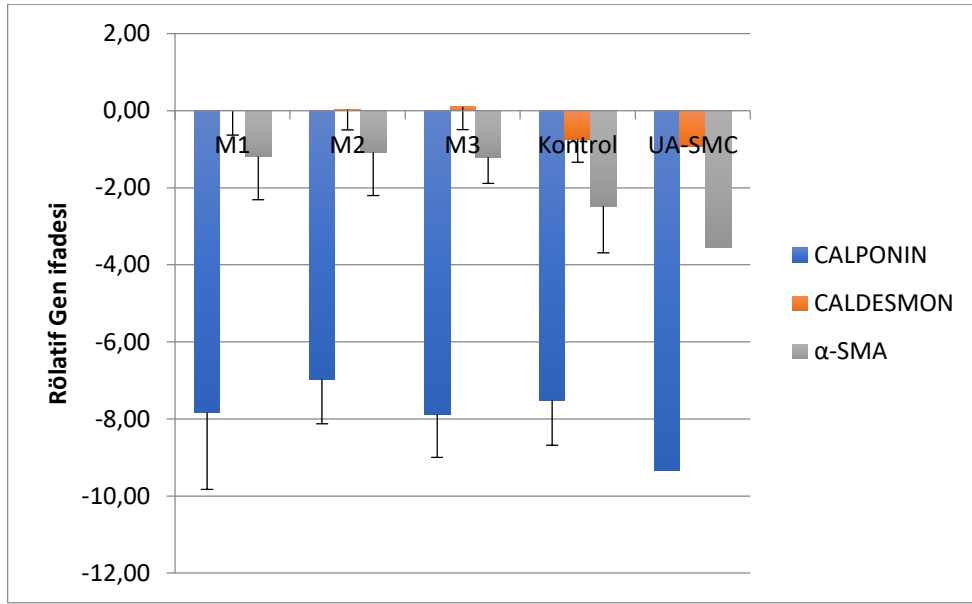
3. besiyeri ile inkübe edilen hücrelerin, yüksek oranda α -SMA ve düşük oranda caldesmon ifade ettikleri ve aynı zamanda 1. besiyeri ile elde edilen sonuçlardan farklı olarak düşük oranda calponin ifade ettikleri gözlemlendi (Şekil 4.10). 2. besiyeri ile bir hafta inkübe edilen hücrelerin üç belirteci (α -SMA, calponin ve caldesmon) de ifade ettikleri gözlemlendi (Şekil 4.10). Bu verilere göre TGF- β 1 ve L-AA içeren 2. besiyerinin perisitlerin düz kas farklılaşmasında daha etkili olduğu sonucuna varıldı.

Perisitleri düz kas hücrelerine farklılaştırmak amacıyla kullanılan SMCM ile hücreler 21 gün kültürde tutuldu. 21 gün sonunda hücrelerin düz kas hücrelerine özgü gen (calponin, caldesmon ve α -SMA) ifadeleri kantitatif PZR ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre; diğer üç besiyeri ile karşılaştırıldığında, SMCM'nin hücrelerin düz kaslara özgü gen ifadelerini anlamlı derecede arttırmadığı gözlemlendi (Şekil 4.12).

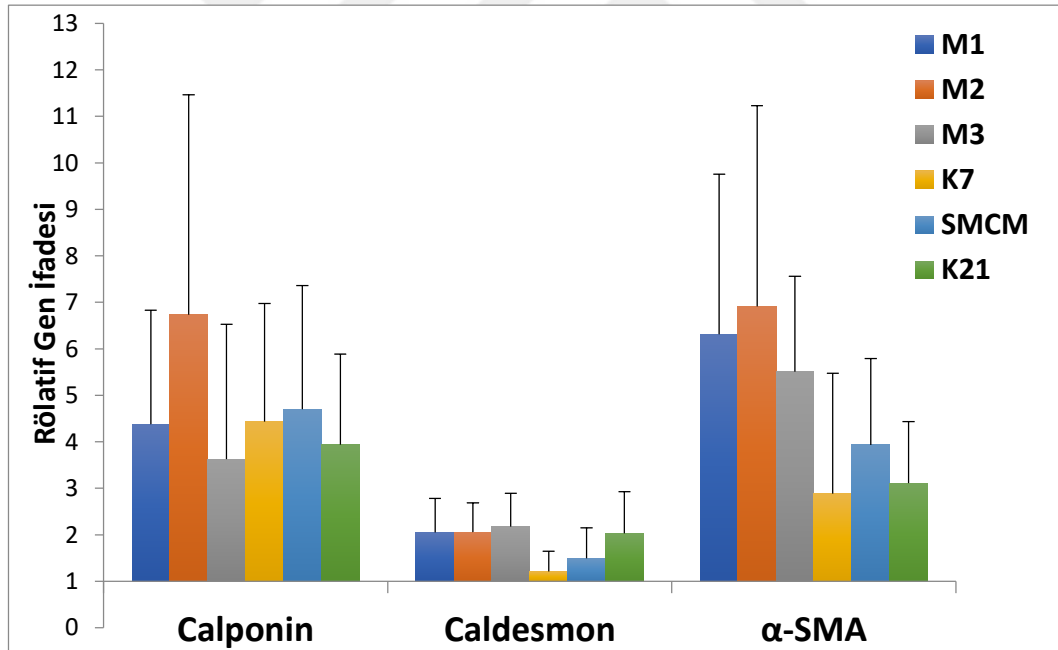


Şekil 4.10. Üç farklı besiyerinin (M1,M2 ve M3) insan göbek kordon veni perisitlerinin düz kas farklılaşmasındaki etkisinin immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi (162). [Çekirdekler: DAPI (mavi floresan), α -SMA, calponin ve caldesmon belirteçlerinin ifadeleri: Alexa 488 (yeşil floresan)]. Bar = 100 μ m.

Bu sonuçlara göre düz kas farklılaşması için 21 gün beklenmesi gerekmediği, uygun içeriğe sahip farklılaşma besiyeri kullanarak yedi gün inkübasyonun yeterli olacağı sonucuna varıldı.



Şekil 4.11. Üç farklı besiyerinin (M1, M2 ve M3) insan göbek kordon veni perisitlerinin düz kas farklılaşmasındaki etkisinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmesi (n=5).

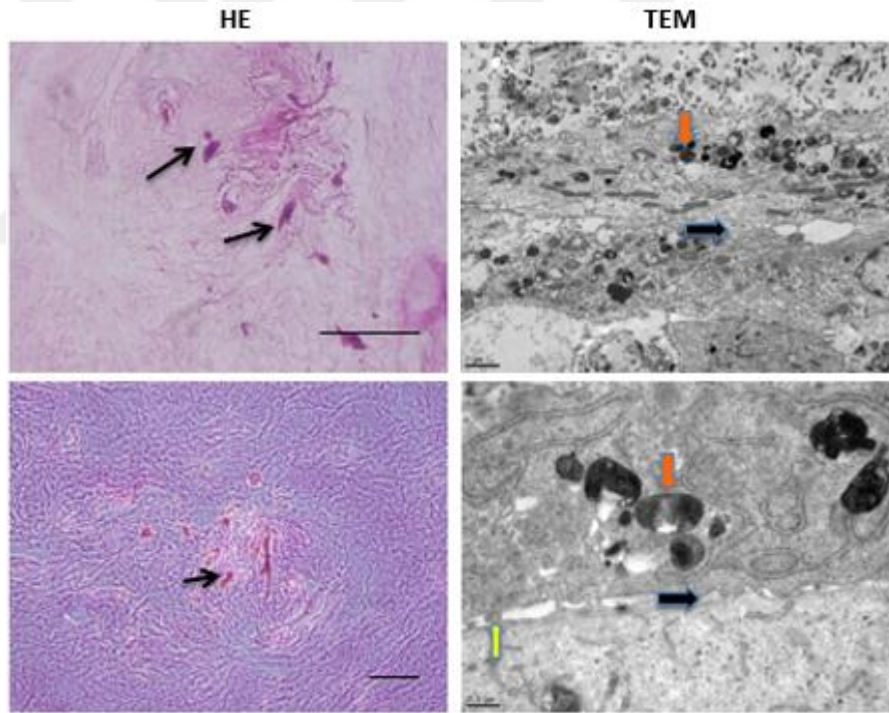


Şekil 4.12. Dört farklı besiyerinin (M1, M2, M3 ve SMCM) insan göbek kordon veni perisitlerinin düz kas farklılaşmasındaki etkisinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmesi (K7: 7. gün kontrol, K21: 21. gün kontrol) (n=5).

4.4. Üç Boyutlu Damar Modeli Oluşturulması ve Karakterizasyonu

4.4.1. Birinci Yöntemle Elde Edilen Model

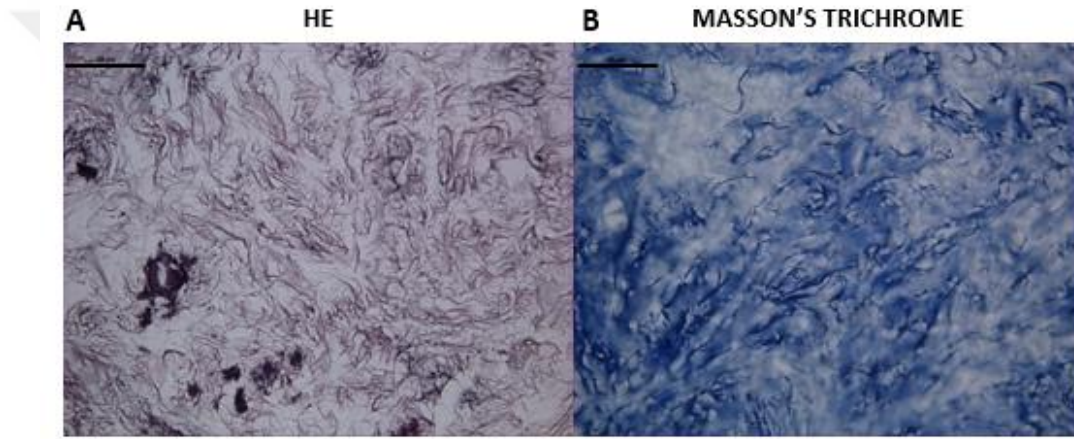
Hücre tabaka mühendisliği yaklaşımıyla elde edilen birinci modelden elde edilen örnekler ışık ve elektron mikroskopunda değerlendirildi. TEM' de ekstrasellüler matriks içinde yerleşmiş hücreler ve aralarındaki bağlantılar gözlendi (Şekil 4.13, Sol Kolon). Işık mikroskopunda kollajen tip I matriks yapısı (pembe renk) ve bu matriks üzerinde yer alan hücreler (koyu pembe, kırmızı renk) gözlendi (Şekil 4.13, Sağ Kolon). Hücreler tek tabaka şeklinde ekildiğinden dolayı yapıdaki hücre yoğunluğu çok düşük bulundu. Bundan sonraki denemelerde hücrelerin matriks yapısı üzerine ya da matriks proteinleriyle karıştırılarak ekilmesine karar verildi.



Şekil 4.13. Hücre tabaka mühendisliği yaklaşımıyla elde edilen damar modelinin ışık (sol kolon) ve elektron (sağ kolon) mikrograflarıdır. Sol kolondaki siyah oklar hücreleri, sağ kolondaki kırmızı oklar ise hücrelerin içindeki lizozomları göstermektedir. Sol kolon HE, sağ kolon uranilasetat kurşun sitrat. Sağ kolondaki Bar = 200 μm .

4.4.2. İkinci Yöntemle Elde Edilen Model

Crosslinking yöntemiyle elde edilen damar medya modeli (kollajen tip I + elastin ve düz kas hücre karışımı) Annexin-PI ile boyandı. Yine aynı yöntemle elde edilen damar adventisya modeli (Kollajen Tip I+Fibrin ve fibroblast) HE, Masson's Trichrome (MT) boyamaları ile boyandı. Elde edilen HE boyama görüntülerinde hücreler hem matriksten bağımsız hem de matriks yapısı içerisinde gözlemlendi (Şekil 4.14). Kollajen matriks yapısı ve fibrin matriks yapısı ayrı ayrı görüntülenebildi. Masson's Trichrome boyama ile kollajen matriks yapısı mavi renkte, hücre çekirdeği kırmızı renkte gözlemlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Crosslinking yöntemiyle elde edilen damar adventisya modelinin HE (A) ve Masson's Trichrome (B) ile boyanmış mikrograflarında, düzensiz yerleşimli kollajen fibriller sırasıyla pembe (A) ve mavi (B) renkte görünmektedir. Bar: 50 μ m.

İki farklı oranda hazırlanan kollajen tip I ve elastin karışımları jel oluşumu yönünden değerlendirildi. 1. kollajen tip I/elastin karışımında (2/1) elde edilen jel yapısı 2. karışıma (1/1,5) göre daha dayanıklı ve katı olarak gözlemlendi. 1. "Crosslinking" yönteminin uygulandığı iki farklı jel yapısı bozulduğundan dolayı kaybedildi. En iyi yapının 2. *crosslinking* yönteminin uygulandığı 1. kollajen tip I/elastin karışımı olduğu saptandı. Fakat tüm yapıların bütünlüğünün farklı oranlarda korunamaması nedeniyle, matriks yapıları üzerinde *crosslinking* yönteminin uygulanmamasına karar verildi.

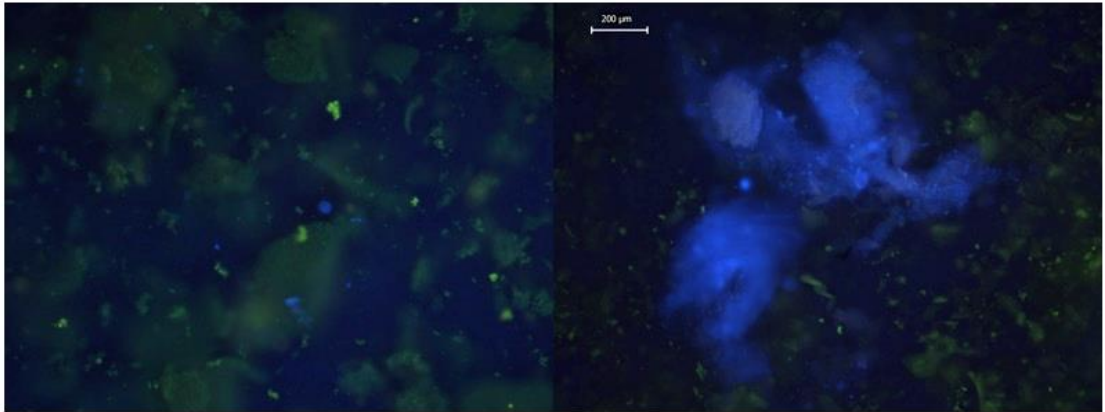
Damar medya modeline yapılan Annexin V + DAPI + PI boyaması sonucu elde edilen görüntülerde matriks yapısı içerisinde yer alan hücreler (yeşil

floresan) gözlendi (Şekil 4.15). Apoptotik hücreler FITC kanalında yeşil floresans verirken, canlı hücreler zayıf yeşil floresans verdi. Ölü veya nekrotik hücrelerin verdiği kırmızı floresansa rastlanmadı.

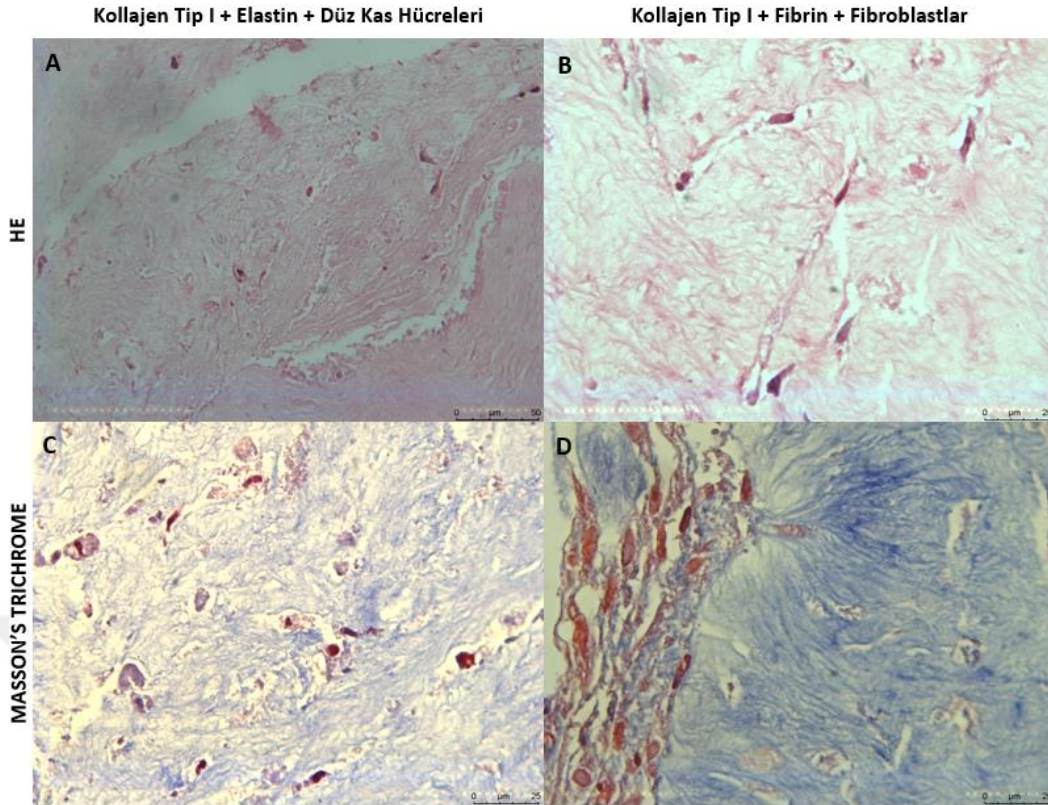
4.4.3. Üçüncü Yöntemle Elde Edilen Model

Damarın orta ve dış katmanını meydana getiren ekstrasellüler matriks proteinleri ve hücreler iki ayrı tabaka şeklinde oluşturuldu ve birleştirilerek birlikte kültürleri yapıldı. Deney sonunda, iki katman, birbirinden ayrıldı fakat karakterizasyon testlerine devam edildi. İki katmanın ayrı ayrı elde edilen paraffin kesitlerine HE ve Masson's Trichrome boyaması yapıldı. Boyamalar sonucunda matriks yapısı içinde yer alan hücreler gözlendi (Şekil 4.16) (Çekirdek: mavi/mor, sitoplazma: kırmızı, kollajen: pembe (HE), mavi (Masson's Trichrome). Bu yöntem sonunda iki katmanlı yapı bütünlüğünü koruyamadığından bir başka yöntemin denenmesine karar verildi.

Annexin V ve PI Boyama



Şekil 4.15. Crosslinking yöntemiyle elde edilen damar medya modelinin Annexin V ve PI boyama görüntülerinde çekirdekler DAPI ile mavi, apoptotik hücreler yeşil görünmektedir. Bar = 200 µm.



Şekil 4.16. Damarın orta (Sol Kolon) ve dış katmanı (Sağ Kolon) olarak oluşturan tabakaların HE (Üst Sıra) ve Masson's Trichrom (Alt Sıra) ile boyalı mikrograflarda kollajen fibriller pembe (A, B) ya da mavi (C, D) renkte izlenmektedir. Matrikse gömülü hücreler okla işaretlenmiştir. Bar: 25 µm.

4.4.4. Dördüncü Yöntemle Elde Edilen Model

Perisitlerden farklılaştırılan düz kas hücreleri ve fibroblastların damarı oluşturan doğal ekstrasellüler matriks proteinleri ile bir araya getirildiği 3B yapıda ve HUVEC'lerin heparin ve fibronektin kaplı yüzeyde canlılıklarının ölçülmesi hedeflendi. Bu amaçla öncelikle damarın dış katmanını (tunika adventisya) meydana getiren ekstrasellüler matriks proteinleri (kollajen tip I ve fibrin) ile fibroblastlar belirli oranlarda karıştırılarak 3B bir yapı elde edildi. Diğer yandan; damarın orta katmanını (tunika medya) meydana getiren ekstrasellüler matriks proteinleri (kollajen tip I ve elastin) ile düz kas hücreleri farklı konsantrasyonlarda karıştırılarak 3B bir yapı oluşturuldu. HUVEC'ler heparin ve fibronektin kaplı yüzeye ekildi. Sonrasında 1., 2. ve 3. hafta kültürleri sonunda hücrelerin bu malzemeler içerisindeki canlılıkları WST-1 testi ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; hücreler bu 3B kültür modellerinde

tutunmuş ve canlılıklarını korumuşlardır (Tablo 4.1). WST-1 testi sonuçlarına göre, HUVEC'lerin proliferasyon ve canlılıkları, fibronektin ve heparin kaplı yüzeyde neredeyse üç hafta boyunca değişmeden kalmıştır (Tablo 4.1). Kollajen tip I-elastin-dermatan sülfat iskelesi içinde kültür edilen düz kas hücreleri ve kollajen tip I-fibrin iskelesi içinde kültür edilen fibroblastların proliferasyonları 21 gün boyunca artmıştır. Hücre canlılıkları matris proteinleri varlığında zamanla azalmamıştır.

Tablo 4.1. 1., 2. ve 3. hafta sonunda ilgili matris proteinleri ve glikozaminoglikanlar ile kültüre edilen proliferatif ve canlı hücrelerin oranları. (Bağımsız deneylerin sonuçları Ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Anlamlı farklılıklar Student t-test ile belirlendi; *: $p < 0,05$).

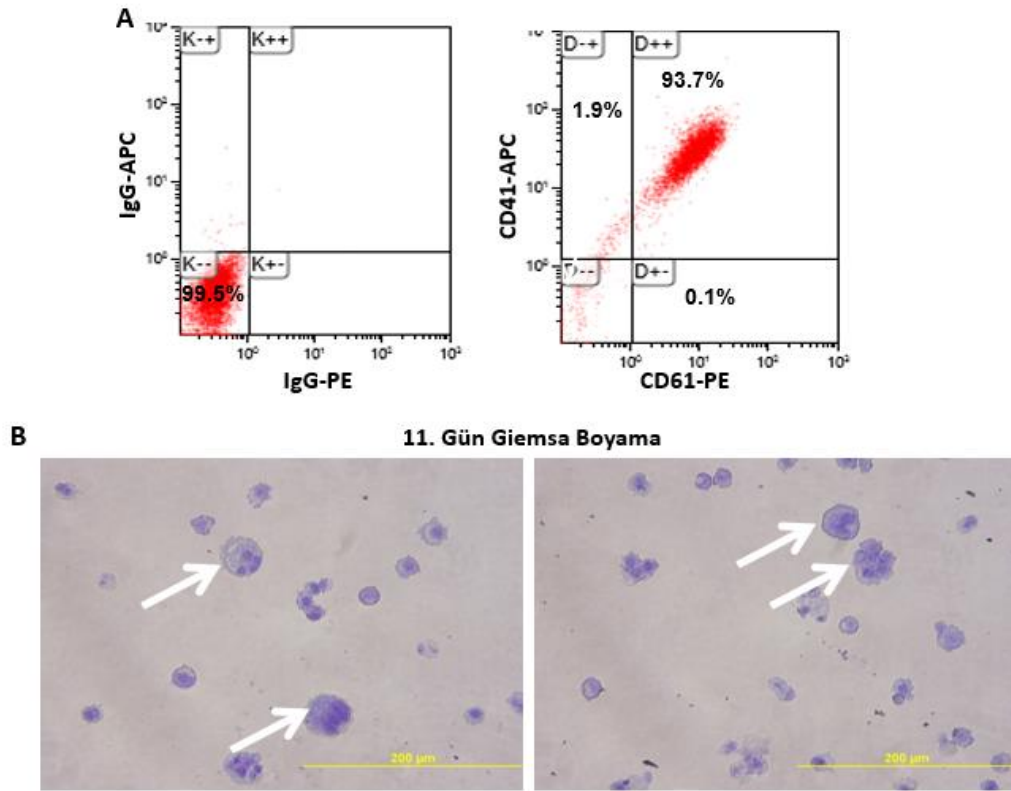
WST-1 TESTİ SONUÇLARI	7. gün	14. gün	21. gün
Heparin/Fibronectin Matris + HUVEC	87,79 \pm 0,17	84,20 \pm 0,30*	86,78 \pm 3,78
Kollajen Tip I / Elastin/Dermatan sülfat Matris + Düz Kas Hücreleri	63,10 \pm 1,15	78,15 \pm 5,88	81,71 \pm 0,76
Kollajen Tip I/Fibrin Matris + Fibroblastlar	74,17 \pm 2,31	91,95 \pm 1,93	90,84 \pm 1,21

CD146+ perisitlerde farklılaştırılan düz kas hücreleri ve fibroblastlar doğal insan kaynaklı ekstrasellüler matris proteinleri ve glikozaminoglikanlarla biraraya getirilerek damar katmanları oluşturuldu. Tunika adventisya katmanı yapıya eklendikten 24 saat sonra petri kabı içindeki 3B yapı üçte bir oranında kompakt hale geldi ve küçüldü (Şekil 4.20A).

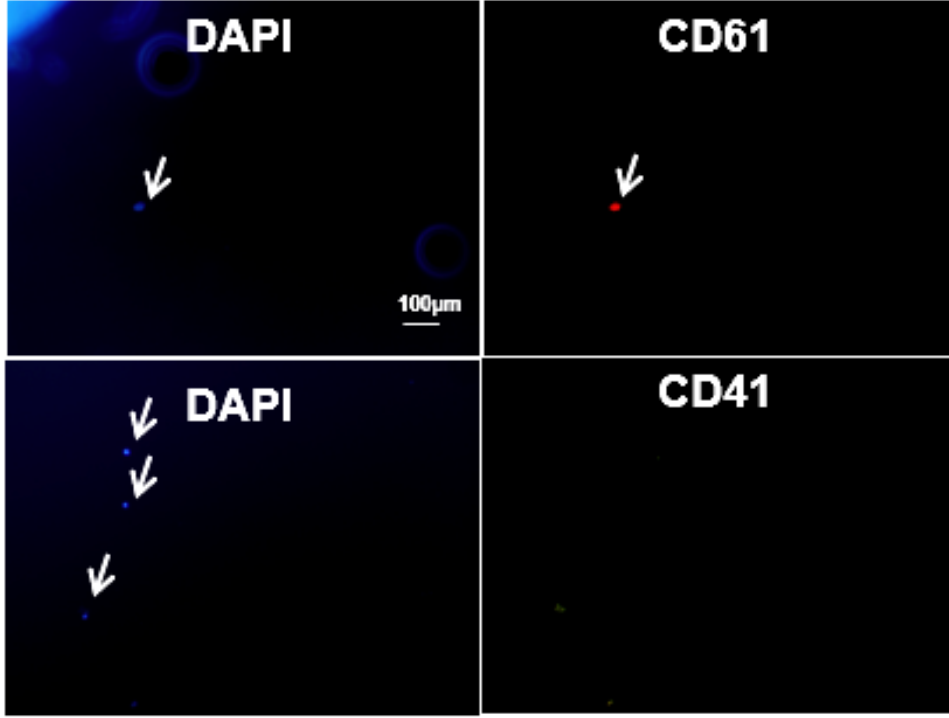
Petri kabı içinde bulunan üç katmanlı yapının HUVEC tabakası üzerine CD34+ hücrelerden farklılaştırılmış megakaryositler/trombositler eklenip adezyon testi yapıldı. Bu test yapılmadan önce akım sitometri ve Giemsa boyaması yöntemleriyle megakaryositlerin/trombositlerin karakterizasyonları gerçekleştirildi (Şekil 4.17). Akım sitometri analizi sonucu, hücrelerin trombositlere özgü belirteçleri (CD41 ve CD61) ifade ettikleri gösterildi (Şekil

4.17A). Giemsa boyaması ile, kendilerine özgü morfolojik özellikleriyle; geniş sitoplazmalı, büyük çekirdekli megakaryositler görüntülendi (Şekil 4.17B).

Sonrasında, HUVEC tabakası üzerine hücrelerin tutunup tutunmadığı, CD41 ve CD61 varlığının immünfloresan boyama ile bakılmasıyla test edildi. Sonuç olarak, bu belirteçlere ait az oranda (birkaç hücre) floresan ışına tespit edildi (Şekil 4.18). Yüzeze yapışan hücrelerin sayısının yok denecek kadar az olması, HUVEC tabakasının anti-trombojenik özelliğini koruduğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. Akım sitometri (A) ve Giemsa boyaması (B) yöntemleriyle megakaryositlerin ve trombositlerin karakterizasyonu.



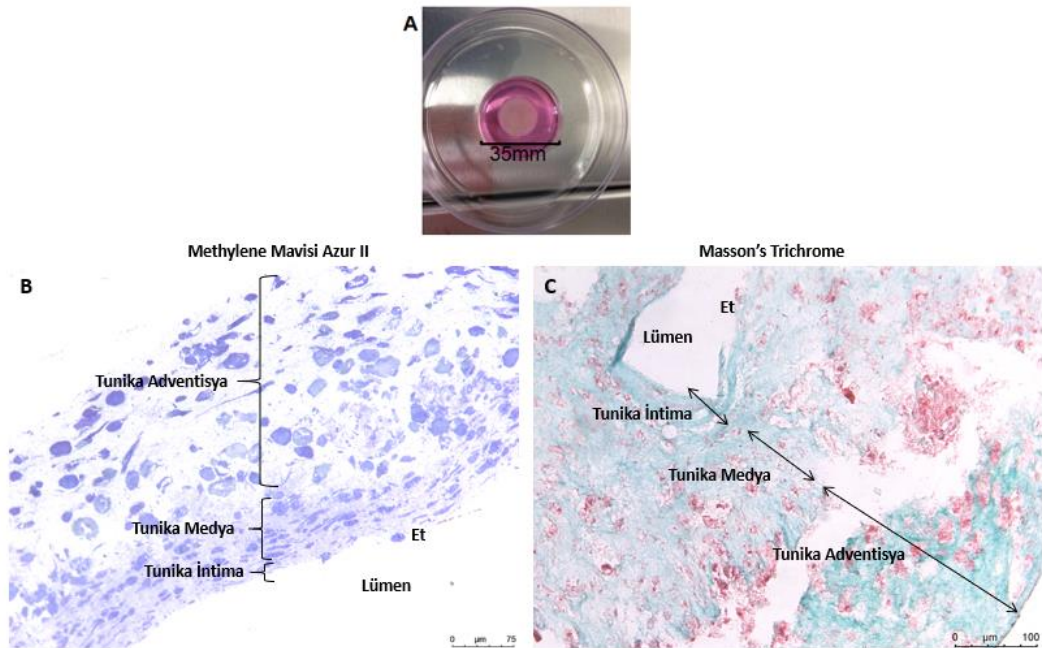
Şekil 4.18. HUVEC tabakası üzerinde, trombositlere özgü belirteçlerin (CD41 ve CD61) varlığının immünfloresan boyama ile test edilmesi. Çekirdekler DAPI ile mavi, hücreler yeşil ve kırmızı görünmektedir. Bar = 100 µm.

Oluşturulan 3B damar yapısı içinde bulunan hücrelerin canlılıkları Annexin V-PI boyaması ile test edildi. Elde edilen konfokal mikroskop görüntülerine göre, yapı içerisinde canlı hücrelerin yanında, beklendiği üzere, az oranda da olsa ölü ve erken apoptotik hücrelerin varlığı da tespit edildi (Şekil 4.19).

Petri kabı içinde bulunan üç katmanlı yapı metal mandrel etrafına sarıldığında meydana gelen tübüler yapının uzunluğu yaklaşık 1,5-2 cm kadar, çapı 4 mm civarındadır (Bkz. Şekil 3.4D). Histolojik, elektron mikroskobu ve immünfloresan analizleri bu tübüler yapı üzerinden yapıldı.

0.0 μm	5.5 μm	11.0 μm	16.4 μm	21.9 μm	27.4 μm
32.9 μm	38.4 μm	43.8 μm	49.3 μm	54.8 μm	60.3 μm
65.8 μm	71.2 μm	76.7 μm	82.2 μm	87.7 μm	93.1 μm
98.6 μm	104.1 μm	109.6 μm	115.1 μm	120.5 μm	126.0 μm
131.5 μm	137.0 μm	142.5 μm	147.9 μm	153.4 μm	158.9 μm
164.4 μm	169.9 μm	175.3 μm	180.8 μm	186.3 μm	191.8 μm

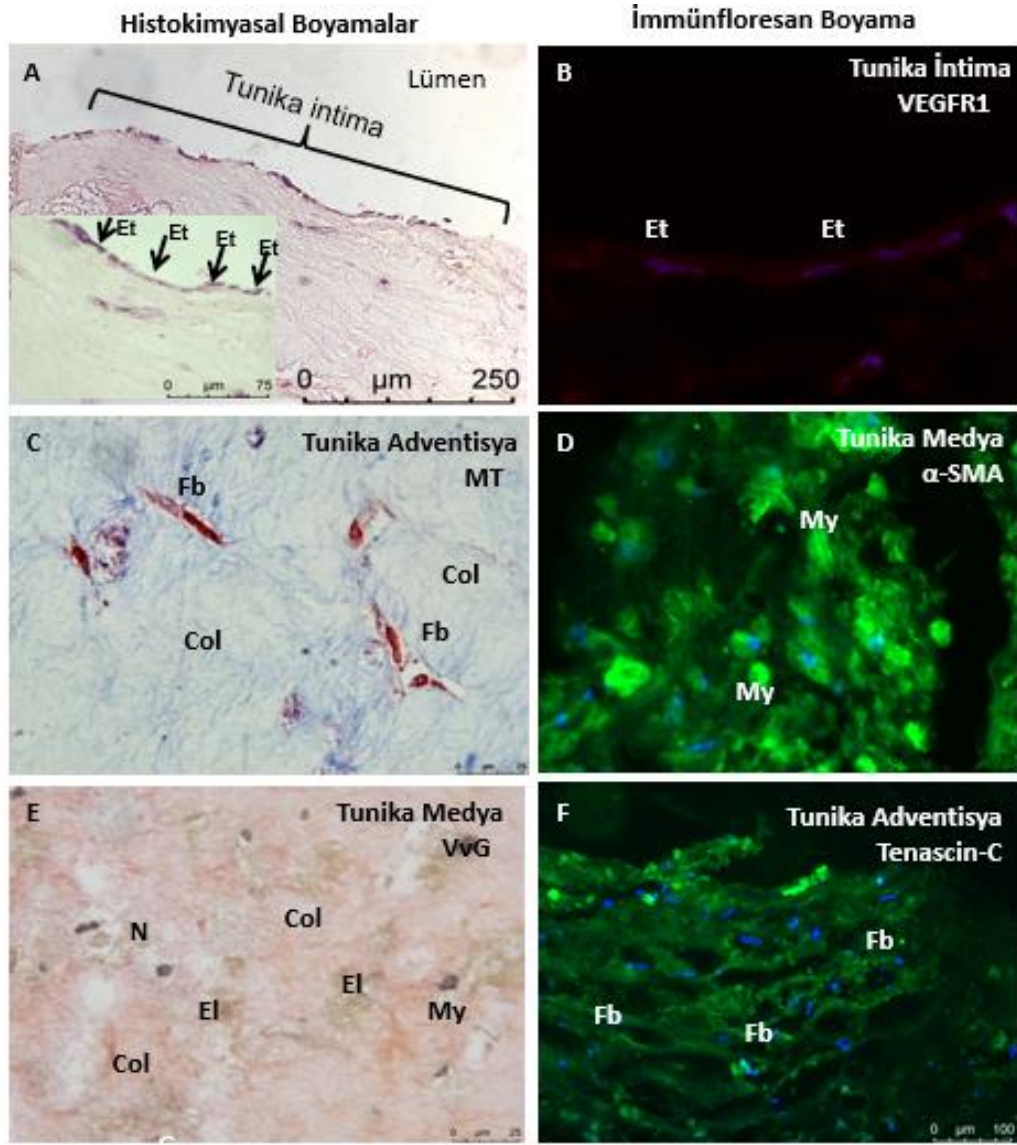
Şekil 4.19. 3B damar yapısı içinde bulunan hücrelerin canlılıklarının test edilmesi amacıyla yapılan Annexin V-PI boyamasının konfokal mikroskop görüntüleri. Canlı hücreler zayıf yeşil, erken apoptotik hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı görünmektedir.



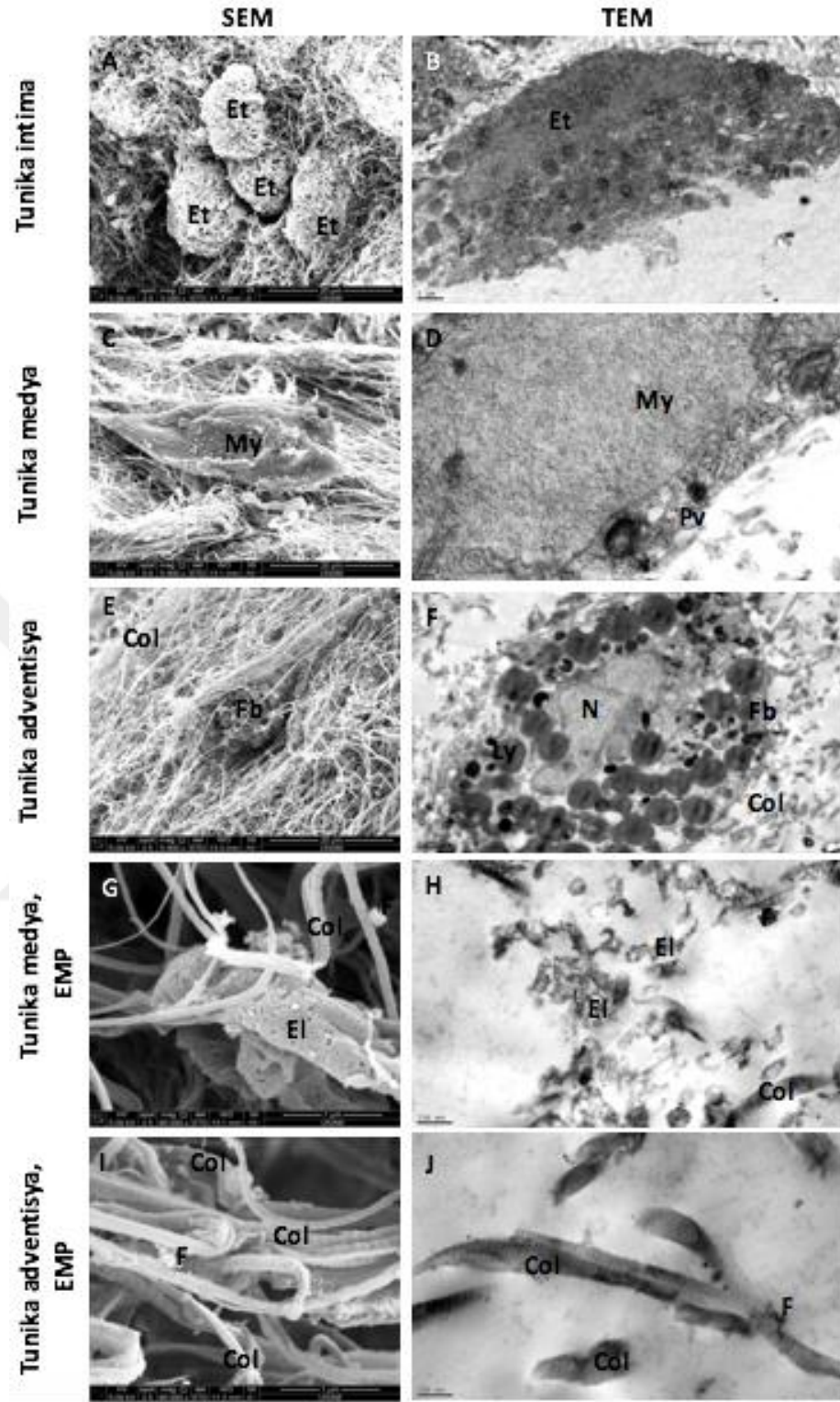
Şekil 4.20. 3B damar modeli. A) Üç katmanlı damar yapısının petri kabı içerisindeki makroskopik görünümü. 3B damar yapısının B) Yarı ince ve C) parafin kesitlerinin metilen mavisi (B) ve Masson's Trichrome (C) boyaması sonrası mikrograflarda tunika intima, medya ve adventisyanın bütünlüğünü koruduğu görülmektedir. [Kollajen fiberler: mavi (metilen mavisi), yeşil-mavi (Masson's trichrome), Et: Endotel Hücresi].

Üç boyutlu damar yapısının ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu düzeyinde yapılan morfolojik analizleri üç damar katmanının varlığını ortaya koymuştur (Şekil 4.20B ve C). Tunika intima tabakası ince tek katmanlı endotel hücreleri tabakasını içermektedir. Bu tabaka mikroskopik incelemeler için örnek hazırlama aşamasında yer yer zarar gördü. Subendotelyal tabaka görülmedi fakat tunika medya ve tunika adventisya tabakaları, ekstrasellüler matriks protein fiberleri arasına yerleşmiş hücre katmanları şeklinde görüldü (Şekil 4.20B ve C, 4.21). Histokimyasal boyamalar ile hücre dışı matriks proteinleri arasında kollajen ve elastik fiberler gözlemlendi (Şekil 4.20B ve C, 4.21A, C ve E). İmmünofloresan işaretleme ile tunika intima içerisinde VEGFR1 ifade eden endotel hücreleri (Şekil 4.21B), tunika medya içerisinde α -SMA ifade eden düz kas hücreleri (Şekil 4.21D), tunika adventisya içerisinde tenascin-C ifade eden fibroblastlar (Şekil 4.21F) ortaya çıkarıldı.

Taramalı elektron mikroskobu ve TEM ile gerçekleştirilen ultra yapısal analizlerle, 3B damar yapısının birbiriyle bütünlük sağlayan üç damar katmanını içerdiği ve böylelikle doğal damar duvarına benzediği kanıtlanmıştır (Şekil 4.22). Tunika intimada endotel hücreleri ve kollajen fibriller gözlenmiştir (Şekil 4.22A ve B). Tunika medyada pinositotik vezikülleri olan fuziform düz kas benzeri hücreler, elastik ve kollajen fibrilleri içeren amorf yapıdaki ekstrasellüler matriks proteinlerinin içine gömülü şekilde izlenmiştir (Şekil 4.22C, D, G ve H). İğ veya oval şekilli fibroblast benzeri hücreler, lizozomlardan zengin sitoplazmalarıyla yüksek endozomal aktivite sergilemektedir. Bu fibroblastlar, tunika adventisya içindeki kollajen fibriller ve ekstrasellüler matriks bileşenleri arasında dağılmışlardır (Şekil 4.22E, F, I ve J). Elektron migrograflarda kollajen fibrillerin tipik ultra yapısal özellikleri ve düzensiz yapıda elastik fibriller ortaya konmuştur (Şekil 4.22G, H, I ve J). Ekstrasellüler matriks proteinlerinin görünen bu yapısal özellikleri, literatürde tanımlanan özelliklerle birebir örtüşmektedir.



Şekil 4.21. Histokimyasal ve immünfloresan olarak işaretlenmiş 3B damar yapısının histolojik katlarına ait mikrograflar. Kollajen fibriller (Col), elastin (El), fibroblastlar (Fb), miyositler (My), endotel hücreleri (Et), alfa düz kas aktin (α -SMA)]. Çerçekler DAPI ile mavi boyanmıştır. HE: *Hematoxylin-Eozin* (A), MT: Mallory Trikrom (C), VvG: Verhoeff van Gieson (E). A-F: x630.



Şekil 4.22. 3B damar modeline ait taramalı (sol kolon) ve geçirimli (sağ kolon) elektron mikrografları. Endotel hücreleri (Et), düz kas hücresi (My), fibroblast (Fb), kollagen fibriller (col), pinositotik vezküller (Pv), elastik fibriller (El), estrasellüler matriks proteinleri (EMP), lizozomlar (Ly), fibrin (F), çekirdek (N). A, B, C, E, F: x15 000, D: x30 000, H, I, J: x80 000.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, insan göbek kordon veni perisitlerinden farklılaştırılan damar hücreleri (düz kas hücreleri ve fibroblastlar), HUVEC' ler ve insan ekstrasellüler matriks proteinleri/glikozaminoglikanlar (kollajen tip I, elastin, fibrin, heparin ve dermatan sülfat) kullanılarak *in vitro* 3B damar modeli meydana getirildi. Öncelikle CD146+ perivasküler hücreler (perisitler) insan göbek kordonu veni etrafından iki farklı grup olarak, önceden yayınlanan çalışmamızda açıkladığımız yöntem (161) ve modifiye edilmiş farklı bir yöntem (93) kullanılarak izole edildi ve bu iki yöntemin etkinliği birbiriyle karşılaştırıldı. Bu çalışmaya benzer olarak, Sarugaser ve ark., insan göbek kordonu perivasküler hücrelerini üç farklı yöntemle izole etmişler (mekanik yıkım-eksplant kültür, dispaz ile enzimatik yıkım ve kollajenaz ile enzimatik yıkım) ve bu yöntemler sonucu elde ettikleri hücreleri fenotipik özellikleri yönünden karşılaştırmışlardır (93). Sonuç olarak kollajenaz enzimini kullanarak yaptıkları izolasyon işlemi sonrası, hücrelerde MKH ve perivasküler hücre belirteçlerinin çok daha fazla oranda görüldüğünü tespit etmişlerdir (93). Bu tez çalışmasında ise, "kollajenaz ile enzimatik yıkım" ve "enzimatik yıkım+eksplant kültür" yöntemleri kullanıldı ve bu yöntemler sonucu kültürde üretilen hücrelerin arasından CD146+ olanlar ayrıldı. Bu iki hücre grubu, morfolojileri, farklılaşma kapasiteleri ve gen ifade profilleri yönünden karşılaştırıldı. 1. Grup ve 2. Grup CD146+ perisitlerin, fibroblast benzeri morfolojileri, diğer çalışmalarda bu tip hücrelerin sahip oldukları mikroskobik görüntüler ile benzer oldukları gözlemlendi (89, 90). Ayrıca bu morfolojik özellikler, Crisan ve ark., büyük ve yıldız biçimli hücreler olarak tanımladığı perisit morfolojisiyle örtüşmektedir (29). Zaniboni ve ark., domuz aortundan izole ettikleri perisit-benzeri hücrelerin replikasyon sürelerinin pasaj ikiden sonra arttığını tespit etmişlerdir (175). Bizim elde ettiğimiz verilere göre, 1. Gruptaki hücrelerin kültürde sayılarını ikiye katlama süreleri, 2. Gruptaki hücrelere göre daha kısa bulundu. 2. Gruptaki hücrelerin 1. Gruptakilere göre kültürde çok daha yavaş çoğaldıkları gözlemlendi. Transkriptom analizlerine göre, 1. Grupta yer alan hücrelerin PDGFRa, CXCL3, STC1, HGF, CYGB, ESM1, E2F7 gen ifadelerinin perisitlere özgü gen ifadeleri olarak literatürde yer aldıkları

bilinmektedir. 1. Grupta yer alan hücrelerin bu gen ifadeleri, 2. Grupta yer alan hücrelerinkine kıyasla 9, 40, 29, 12, 25, 14 ve 10,5 kat daha fazla bulunmuştur. Her iki grup hücrenin de benzer düzeyde insan Kİ kaynaklı MKH' lere benzediği tespit edildi. Birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, her iki grubun da diğerinden daha yüksek düzeyde ifade ettiği MKH' lere özgü genler bulundu. Bu genlerin rol aldığı hücrel olaylar ele alındığında, 1. Gruptaki hücrelerin daha çok endotel hücreleri aracılığıyla etki gösterdiği, miyosit farklılaşmasında, oksijen transportunda, anjiyogenez ve doku yenilenmesinde rol aldığı söylenebilir (176). İnsan göbek kordonu kökenli CD146+ perisitlerin izolasyonu amacıyla kullanılan bu iki farklı yöntemi birbiriyle karşılaştıran başka bir çalışma bulunmamaktadır.

Adipojenik ve osteojenik farklılaşma deneyleri sonunda yapılan oil red o ve alizarin kırmızısı boyamaları sonuçlarına göre, iki gruba ait perisit popülasyonu da adipojenik farklılaşma göstermelerine rağmen osteojenik farklılaşma kapasitelerinin zayıf olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, kordon kanı MKH' leri ile perisitler karşılaştırıldığında, iki grup hücrenin birbirlerinden farklı düzeyde multipotent farklılaşma özelliği gösterdikleri söylenebilir. Fakat literatürde bunun tersini gösteren yayınlar bulunmaktadır (89, 90, 177-181). Montemurro, Tsang ile Ennis ve ark.' na göre, göbek kordonu perivasküler hücrelerinin osteojenik farklılaşma kapasiteleri vardır (89, 90, 178). Greenwood-Goodwin ve ark. çalışmalarında elde ettikleri sonuçlara göre, perivasküler öncül hücrelerin multipotent farklılaşma özellikleri yoktur fakat bu hücrelerin, osteojenik potansiyeli olan veya perisit-benzeri fonksiyona sahip diğer öncül hücreleri meydana getirme potansiyelleri vardır (179). Murray ve ark., yayınlarında, CD146+ perivasküler MKH öncüllerinin, osteojenik farklılaşma kapasitelerinin, bu hücrelerin endotel hücreleriyle ko-kültürleri sonucu korunabileceğini ve arttırılabileceğini belirtmişlerdir (180). An ve ark., göbek kordonu perivasküler hücrelerinin, enzimatik olmayan yöntemle izole edildiklerinde, yüksek homojenite gösterdiklerini ve daha yüksek osteojenik potansiyele sahip olduklarını göstermişlerdir (181). Bu tez çalışmasında ise, her iki izolasyon tekniğinde de kollajenaz enziminin kullanıldığı enzimatik yıkım yöntemi kullanılmıştır. Bu da diğer damar hücrelerinin içinde bulunduğu heterojen bir hücre popülasyonu elde edilmesine ve böylelikle osteojenik farklılaşmanın daha

az meydana gelmesine sebep olmuş olabilir. Perivasküler hücre popülasyonlarının, izole edildikleri alana, izolasyon yöntemine ve *in vitro* kültür koşullarına bağlı olarak, birbirleri arasında değişken farklılaşma kapasitelerine sahip oldukları düşünülmektedir (55, 161, 177, 179, 181).

Perisit izolasyonu ve karakterizasyonunu içeren birçok çalışma yapılmasına rağmen, henüz perisitlere özgü belirteçler kesin olarak belirlenememiştir (30). Fakat CD146, NG-2 ve PDGFR- β gibi bazı perivasküler hücre belirteçleri, perisitleri tanımlamak amacıyla kullanılmaktadır (29). Crisan ve ark., CD146 ve NG-2 belirteçlerini perivasküler bölgede, PDGFR- β ve α -SMA belirteçlerini kılcal damarlarda değil arteriyol ve venüllerde tespit etmişlerdir (29). MAP-1B de perisitler tarafından ifade edilmektedir (101). Bu bilgilere benzer olarak, insan göbek kordonu veni perisitlerinin CD146, NG-2 ve MAP-1B ifade ettikleri akım sitometri ve immünfloresan boyama ile bu doktora çalışmasında gösterilmiştir. Murray ve ark. yayınladıkları derlemede belirttikleri üzere, perisitler MKH belirteçlerini ifade etmektedirler (55). İzole ettiğimiz perisitlerin, CD146+ belirtecinin yanında MKH' lere ait CD105 belirtecini de ifade ettiği, akım sitometri analizleriyle tayin edildi.

Küçük ve büyük çaplı kan damarlarının yapısında bulunarak, onların gelişiminde, yeniden modellenmesinde ve fonksiyonunda önemli rollere sahip perisitlerin, son yıllarda damar doku mühendisliğindeki kullanımları ön plana çıkarak hız kazanmıştır (32-34, 139). Bu nedenle bu tez çalışmasında, oluşturulması planlanan doku mühendisliği kaynaklı damar grefti yapısındaki hücrelerin kaynağı olarak perisitler kullanıldı. Damar medya tabakasının yapısında bulunması gereken düz kas hücrelerinin perisitlerden farklılaştırılması hedeflendi. Literatürde, perisitlerin düz kas farklılaşması için tanımlanmış bir protokol bulunmadığından, MKH' lerin farklılaşmasını sağlayan farklı protokoller denendi. MKH' lerin damar düz kas hücrelerine farklılaşabildiğini gösteren çalışmalarda, TGF- β 1' in bu amaç için kullanılan öncül faktör olduğu görülmektedir (167, 182, 183). Bu faktörün ayrıca embriyonik gelişim evresinde vaskülogenezde ve düz kas hücre farklılaşmasında kritik rolü vardır (184). BMP-4' ün de vaskülogenezin asıl düzenleyicilerinden olduğu gösterilmiştir (185). Lagna ve ark., TGF- β 1 ve BMP-4' ün birlikte, α -SMA gibi düz kas genlerinin

aktivasyonunu ve farklılaşmış düz kas hücre fenotipinin devamlılığını sağladıklarını göstermişlerdir (186). Wang ve ark., TGF- β 1 ve BMP-4' ün tek başlarına, insan adipöz kökenli kök hücrelerin düz kas farklılaşmasını uyardığını fakat birlikte kullanıldıklarında sinerjistik olarak düz kas yönünde farklılaşmayı daha kuvvetli şekilde indüklediklerini öne sürmüşlerdir (167). Çalışmalarında bu faktörlerin, farklılaşma besiyerinde kullanılması gereken uygun konsantrasyonlar belirlenmiştir (167). İmmünofloresan boyama ve gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre, yedi gün farklılaşma besiyerinde kültür edilen hücrelerin, *smooth muscle protein 22-alpha* (SM22a), calponin, α -SMA ve *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC) ifadelerinde anlamlı düzeyde artma görülmüştür (167). Bu tez çalışmasında, perisitlerin düz kas farklılaşmasını sağlamak amacıyla kullanılan ilk besiyerinde (M1) Wang ve ark. belirlediği TGF- β 1 ve BMP-4' ün uygun konsantrasyonları kullanıldı. PZR analizi ve immünofloresan boyama sonuçlarına göre, hücrelerin α -SMA ifadesinde artış gözlemlenirken, caldesmon ifadesi düşük bulundu. Calponin ifadesi immünofloresan boyama sonucunda gözlemlenmezken, PZR ile tespit edildi.

Franke ve ark., FBS ve at serumunun, α -SMA ifadesi üzerindeki etkisi incelenmiş ve at serumunun bu konuda FBS'den daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (187). Ayrıca bir başka çalışmada, farklılaşma besiyeri içerisinde FBS yerine %2' lik at serumu kullanıldığında, hücrelerin düz kasa özgü gen ifadelerinde (SM22a, SM-calponin, caldesmon, SM myosin light chain kinase, SM-actin ve SM-MHC) artış olduğu tespit edilmiştir (169). Bu çalışmalar dikkate alınarak, düz kas farklılaşması, "M3" besiyeri içerisinde büyüme faktörleri ya da FBS yerine %2' lik at serumu eklenmiş ve perisitlerin düz kas farklılaşması üzerine etkisi araştırılmıştır. α -SMA ve caldesmon ifade düzeyleri dikkate alındığında birinci (M1) besiyeri ile benzer sonuçlar alınmıştır. Fakat calponin ifadesi düşük bulunmuştur ve farklılaşmış hücrelerin morfolojileri farklılaşmamış olanlarla benzer görülmüştür.

Narita ve ark., insan Kİ MKH' lerinin düz kas farklılaşması üzerinde TGF- β 1 ve L-AA' nın birbirlerine bağlı etkilerinin bulunduğunu ortaya çıkarmışlardır (168). Bu faktörleri içeren farklılaşma besiyeri ile yedi gün kültür sonrası, kantitatif PZR, immünofluoresan boyama ve western blot analizlerine göre, MKH' lerde düz kasa özgü belirteçlerin (SM22a, calponin ve α -SMA) ifadesi artmıştır (168). Bu sonuca

bağlı olarak çalışmamızda kullanılan ikinci düz kas farklılaşma besiyeri (M2) içerisine TGF- β 1 ve L-AA eklenerek, perisitlerin yedi gün kültürü yapıldı. İmmünfluoresan boyama ve PZR sonuçlarına göre perisitlerin yedi gün sonunda düz kas hücrelerine özgü belirteçleri (α -SMA, caldesmon ve calponin) ifade ettikleri, özellikle calponin ifadesinin yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. Böylelikle TGF- β 1 ve L-AA içeren M2 besiyerinin, perisitlerin düz kas farklılaşması üzerine diğer iki besiyerine (M1 ve M3) göre daha etkili olduğu sonucuna varıldı.

Perisitlerin, düz kas hücrelerine farklılaşmasını sağlamak için, çeşitli büyüme faktörlerinin kullanımı yerine özel kültür koşullarının denendiği çalışmalar da mevcuttur (166, 188, 189). Wang ve ark., sıçan akciğerinden izole ettikleri perisitlerin düz kas farklılaşmasını uyarmak amacıyla hipoksik kültür koşullarını (%3 O₂, %5 CO₂ and %92 N₂) denemiş ve iki gün sonunda hücrelerde daha yüksek bFGF RNA ve protein ifade miktarı tespit etmişlerdir (166). Elde ettikleri bu sonuç, damar düz kas hücre farklılaşması ile ilişkilidir (166). Truettner ve ark., primer sıçan kortikal perisitlerini hipoksik koşullarda (%1 O₂) iki gün kültür etmişler ve TGF- β 1 ifadesi gibi farklı mRNA ifade profilleri tespit etmişlerdir (188). Yang ve ark. ise çalışmalarında, insan perisitlerini 24 saat hipoksiye maruz bırakmışlar ve α -SMA ifadesinde artış tespit etmişlerdir (189). Bu tez çalışmasında, hipoksik kültür koşullarının, insan göbük kordon veni perisitlerinin düz kas farklılaşmasında bir etkisinin olmadığı ortaya kondu. Sonuçlardaki bu farklılığın, hücrelerin izole edildiği dokuların farklı oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin, *in vitro* fibroblast farklılaşmasının CTGF ile uyarıldığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (165, 190). Lee ve ark. yaptıkları çalışmada, Kİ MKH' lerini dört hafta CTGF içeren besiyerinde kültüre etmişler ve sonrasında kollajen tip I ve tenascin-C gibi fibroblastlara özgü belirteçlerin sentezinin arttığını *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA, enzim ilintili immün test) testiyle tespit etmişlerdir (165). Tong ve ark., yapay malzemeyle oluşturulmuş bir iskele içindeki Kİ MKH' lerini CTGF ve L-AA içeren farklılaşma besiyeri ile 21 gün inkübe etmişlerdir (190). Fibroblastlara özgü *fibroblast-specific protein-1*, kollajen 1 ve kollajen 3 ifadesini kantitatif PZR ve immünfloresan boyama ile göstermişlerdir (190). Bu tez çalışmasında, perisitler, CTGF ve L-AA

içeren besiyeri ile 21 gün kültüre edilmişler ve sonrasında yapılan immünfloresan boyama ve PZR sonuçlarına göre, fibroblastlara özgü belirteçler olan kollajen tip I ve tenascin-C' yi ifade etmişlerdir. Fibroblastlara farklılaştırılan perisitler, tez çalışması sonunda oluşturulan damar yapısının tunika medya tabakasında yer almışlardır.

Perisit benzeri hücrelerin ve MKH' lerin endotel farklılaşmalarını sağlamaya yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur (114, 115, 175, 191). Janeczek Portalska ve ark. çalışmalarında Kİ MKH' lerini ticari EGM ile önce 3B çalkalayıcı sonra Matrijel varlığında kültüre etmişler ve endotel hücrelerine farklılaşmalarını sağlamışlardır (115). Wharton peltesi ve Kİ' den elde edilen MKH' leri VEGF içeren farklılaşma besiyeri kullanarak endotel hücrelerine farklılaştıran başka çalışmalar da vardır (114, 191). Zaniboni ve ark., domuz aortu etrafından izole ettikleri perisit benzeri damar kök hücrelerini, 21 gün insan VEGF içeren besiyerinde inkübe etmişler, sonrasında hücrelerde, CD31, VE-cadherin, vWF ve eNOS ifadelerindeki artışı kantitatif PZR, CD31 ve vWF ifadelerini immünfloresan boyama ile göstermişlerdir (175). Bu tez çalışmasında, izole edilen perisitlerin, damar yapısının intima tabakasını oluşturmak üzere endotel hücrelerine farklılaştırılması hedeflendi. Literatürdeki çalışmalara yönelik olarak, perisitler VEGF ve EGF içeren farklılaşma besiyeri ile 14 gün kültüre edildi. Fakat sonuç olarak endotel hücrelerine özgü belirteçlerin (VEGFR1, VEGFR2, CD31, vWF) ifadesi akım sitometri ve immünfloresan boyamalar sonucunda gösterilemedi. Bunun, elde edilen hücre tipinin ve izolasyon kaynağının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, doğal insan kaynaklı ekstrasellüler matriks proteinleri (kollajen tip I, elastin, fibrin) ve glikozaminoglikanlar (dermatan sülfat ve heparin) ile insan göbek kordonu kaynaklı perisitlerden farklılaştırılan damar düz kas hücreleri ve fibroblastlar birleştirilerek tunika medya + tunika adventisya tabakaları, HUVEC' ler ile tunika intima tabakası benzeri yapılar oluşturuldu. Bu üç tabaka bir araya getirilerek 3B damar modeli meydana getirildi. Hücreler, hem jel ile karıştırılarak hem de hücre tabaka mühendisliği yöntemiyle elde edilen katmanlar halinde yapıya transfer edilerek kültüre edildi, böylelikle doğal kan damarının sahip olduğu çok katmanlı yapı taklit edilmeye çalışıldı. Damar greft

modelinde bulunan bu üç tabakanın varlığı ışık ve elektron mikroskopi incelemeleri ile doğrulandı. Üç katmanlı damar modeli oluşturmadan önce, düz kas hücrelerinin, fibroblastların ve HUVEC'lerin, insan hücre dışı matriks proteinleri ve glikozaminoglikanlar ile kültürleri sırasındaki canlılıkları ve proliferasyon kapasiteleri, WST-1 testi ile ölçüldü. Bu testler sonucunda hücrelerin, üç hafta süreyle bu doğal malzemeler içinde canlılıklarını korudukları (\geq %75) tespit edildi. Literatürde, perisitlerin damar doku mühendisliği alanında kullanıldıkları çalışma sayısı kısıtlıdır (32-34). He ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada, insan iskelet kasından elde ettikleri perisitleri, elastomerik, tübüler ve porlu yapıdaki iskelelerle karıştırmalı biyoreaktör içerisinde kültüre ettikten sonra bu grefti sıçan aortuna implante etmişlerdir (34). Sekiz hafta sonunda damar grefti incelendiğinde, düz kas ve endotel hücreleri tabakalarının varlığı yapılan incelemelerle gösterilmiştir (34). Bu çalışmayla perisitlerin *in vivo* ortamda damar tabakalarında bulunan diğer hücre tiplerine farklılaşabildiği kanıtlanmıştır. Van der Meer ve ark.'nın çalışması ise damar greft modeli oluşturma esnasında, perisitlerin ve kollajen tip I' in arasındaki etkileşimi vurgulayan tek çalışmadır (33). Aynı grup, bu tez çalışmasından farklı olarak, insan embriyonik kök hücre kökenli perisitleri ve ksenojenik kollajen tip I kullanmışlardır (33). 12 saat sonrasında, iç kısmı olgun endotel tek tabakası içeren, perisitlerin tübüler oluşum içerisine dahil olduğu, kan damarına benzer bir yapı meydana geldiği gözlemlenmiştir (33). Chong ve ark., insan göbek kordonu veni perivasküler hücreleri ve endotel hücrelerini, sentetik malzemedan meydana gelen iskele üzerine ekerek, medya ve intima tabakalarından oluşan çift fazlı damar modeli oluşturmuşlardır (32). Sonuç olarak, iki hücre tipi birbirinden ayrı olarak buldukları kompartmanlarda konfluent tabakalar oluşturmuşlardır (32). Chong ve ark.'nın çalışmasına benzer olarak, bu tez çalışmasında, perisitler insan göbek kordonu veninden izole edildi, fakat tunika medya ve adventisya tabakasının oluşturulması için bu hücreler damar hücre tiplerine (düz kas hücresi ve fibroblast) farklılaştırıldı. Çalışmamızda, biyoyumlu damar medya ve adventisya tabakalarının oluşabilmesi için, perisitlerden farklılaştırılan bu damar hücreleri başarılı bir şekilde insan kaynaklı kollajen, elastin, fibrin heparin ve dermatan sülfat ile bir araya getirildi.

Damar doku mühendisliği kapsamında kullanılan sentetik materyallerin sahip olduğu dezavantajlara karşılık kollajen tip I, fibrin ve elastin gibi insan kaynaklı doğal malzemelerin kullanımı, küçük çaplı damar greftlerin oluşturulmasında ön plana çıkmaktadır. Literatürde, hücreleri doğal malzemeler ile birleştirerek, oluşturulan damar yapılarının özelliklerini iyileştiren araştırmalar vardır (9-13, 148, 154-156, 192). Bunlardan ilki, Weinberg ve Bell'in 1986 yılında damar düz kas hücrelerini ve fibroblastları kollajen içinde kullanarak tamamen biyolojik yapıya sahip damar grefti oluşturdukları çalışmadır (9). Bu çalışma sonunda, vWF ifade eden endotel hücreleri, doğal kan damarı endoteliumuna benzer yapı içerisinde tespit edilmiş fakat Dacronun yapıya ilavesi sonucunda bile mekanik dayanıklılık sağlanamamıştır (9). Sonrasında bu alanda pek çok araştırmacı doğal ekstraselüler matriks proteinlerini damarı oluşturan hücrelerle birleştirerek 3B damar yapıları meydana getirmeye çalışmıştır. Tamamen biyolojik yapıya sahip ve doku mühendisliği kaynaklı damar yapımında, L'Heureux ve ark., hücre tabakalarını oluşturma ve sonrasında bu tabakaları tübüler mandrel etrafına sarma yöntemini kullanmışlardır (148). Damar düz kas hücre tabakasıyla tunika medya katmanını, fibroblast hücre tabakasıyla tunika adventisya katmanını ve tübüler yapının lümen kısmına endotel hücrelerini ekerek tunika intima'yı oluşturmuşlardır (148). Buijtenhuijs ve ark. çalışmalarında çözünmeyen elastin ve kollajenden oluşan, poröz yapıya sahip, 3B tübüler bir iskele meydana getirmişler ve göbek kordonu kaynaklı düz kas hücrelerinin bu iskele üzerindeki canlılıklarını ve davranışlarını test etmişlerdir (13). Elde ettikleri verilere göre, 14 günlük kültür sonrasında hücrelerin bu yapı üzerinde ve porlar arasında tutunarak çoğaldıkları ve canlılıklarını korudukları gözlenmiştir (13). Aynı grup sonrasında yaptıkları çalışmada bu damar yapısını biyoreaktör içerisinde kültüre etmişler ve statik kültür koşullarıyla karşılaştırıldığında doku formasyonunun daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir (192). Ryan ve O'Brien aynı şekilde oluşturdukları damar yapısında kollajen tip I ile birlikte insolubl elastin kullanmış ve böylelikle yapının viskoelastik özelliğinin arttığını ve düz kas hücrelerinin proliferasyonlarının azaldığını ve kontraktil özelliklerinin arttığını görmüşlerdir (154). Daamen ve ark. damar grefti iskelesi meydana getirmek için kullandığı kollajen tip I, elastin ve kondroitin sülfat karışımı, bizim tunika medya

tabakası için kullandığımız karışımla (kollajen tip I, elastin ve dermatan sülfat) benzerlik göstermektedir. Buna ek olarak, damar yapılarının karakterizasyon verileri de bizimkilerle uyumludur (155). Tez çalışmamızda, kollajen tip I, elastin ve dermatan sülfat, perisitlerden farklılaştırılan düz kas hücreleriyle birleştirilerek, etkili bir şekilde tunika medya tabakası taklit edildi. Işık (HE ve van Gieson boyama) ve elektron (TEM, SEM) mikroskopi görüntüleri ile, düz kas hücrelerinin başarılı bir şekilde ekstrasellüler matriks proteinleri ve glikozaminoglikanlar ile bütünleştiği gözlemlendi.

Grassl ve Aper, oluşturdukları damar grefti yapısı içinde sadece fibrin kullanmışlar ve düz kas hücrelerinin bu iskele içindeki canlılıklarını göstermişlerdir (12, 156). Böylelikle yapıya dayanıklılık katıp aynı zamanda jel içerisinde bulunan hücrelerin, ekstrasellüler matriks sentezlemelerini sağlamışlardır (12). Kollajen ve fibrin bazlı damar yapılarını karşılaştırdıklarında, fibrin örneklerinin çok daha iyi organizasyona ve kollajen-fibrin yerleşimine sahip olduklarını ve fibrinin damar yapısına dayanıklılık kattığını göstermişlerdir (12). Gui ve ark., damar düz kas hücreleri ve dermal fibroblastları, fibrin jel içerisinde kültüre ederek, damar yapısı içerisinde kollajen sentezinin yanı sıra elastin üretiminin artmasını hedeflemişlerdir (11). 30 gün pulsatil akışlı biyoreaktörde kültür sonrası mekanik ve biyokimyasal özellikleri doğal artere benzer, küçük çaplı, damar grefti oluşturabilmişlerdir (11). Bu araştırmacıların meydana getirdiği damar yapılarından farklı olarak, bu tez çalışmasında, fibrine ek olarak kollajen tip I yapıya eklenerek perisitlerden farklılaştırılan fibroblastlar ile doğal dokuya benzer bir tunika adventisya tabakasının oluşması sağlandı. Tenascin-C ifade eden fibroblastik hücreler ve fibrin, kollajen fibrilleri içinde efektif bir şekilde dağılmış olarak gözlemlendi. Tunika medya ve tunika adventisya tabakalarının birlikte iki hafta kültürü sonucu hücrelerin yapıya adezyonu ve infiltrasyonu ve de yapı içerisindeki canlılıkları test edildi. Statik kültür koşulları sonucu elde edilen histolojik boyama sonuçlarına göre düz kas hücreleri ve fibroblastlar 3B damar yapısına tutundu ve yapı içerisinde canlılıklarını yüksek ölçüde koruyabildi. Loy ve ark. kollajen tip I' i fibroblastlar ve düz kas hücreleriyle birleştirerek tunika adventisya ve medya benzeri tabakaları, HUVEC' ler ile tunika intima benzeri tabakayı oluşturmuşlardır (10). 24 saatte planar yapıda bir damar modeli

tasarlamışlardır (10). Aynı araştırmacılar, planar damar yapısını histolojik ve immünfloresan analizler ile karakterize etmişler ve her bir tabakanın varlığını ve bu tabakalarda bulunan farklı hücre tiplerini ayrı ayrı göstermişlerdir (10). Loy ve ark. meydana getirdiği damar yapısına benzer olarak, bu tez çalışmasında da kollajen tip I ve üç farklı damar hücresi kullanılarak, üç tabakalı bir yapı oluşturuldu. Onların elde ettiği sonuçlara benzer olarak, bu tez çalışmasında da histolojik boyama ve immünfloresan işaretleme ile, VEGFR1 ifade eden HUVEC'ler, α -SMA ifade eden düz kas hücreleri ve tenascin-C ifade eden fibroblastlar, ekstrasellüler matriks proteinleri ve glikozaminoglikanlar içine gömülü şekilde tespit edildi. Ayrıca yine benzer bir sonuç olarak, oluşturulan üç tabakalı yapı düz kas hücrelerinin ve kollajen tip I' in varlığı nedeniyle üçte bir oranında kompaktlaştı (10). Fakat bu tez çalışmasında, onların çalışmasından farklı olarak, üç katmanlı bu yapının adventisya tabakasına fibrin, medya tabakasına elastin ve dermatan sülfat eklendi ve böylelikle doğal damar dokusuna en yakın yapı oluşturulmaya çalışıldı.

Bu tez çalışmasında, ekstrasellüler matriks proteinleri perisitlerden farklılaştırılan damar hücreleriyle bir araya getirildi ve yeni bir endotelizasyon yöntemiyle intakt bir damar yapısı elde edilebildi. Endotelizasyonun başarılı şekilde gerçekleşmesini sağlamak için, sıcaklık-duyarlı akıllı yüzeylerin kullanıldığı hücre tabaka mühendisliği yaklaşımıyla, kendi ekstrasellüler matriks yapısını bozmadan, HUVEC tek tabakası elde edilmeye çalışıldı. HUVEC ekiminden önce, endotelizasyonun etkinliğini arttırmak amacıyla, iki katmanlı damar yapısının medya tabakasının üzeri heparin ve fibronektin ile kaplandı (15, 17). Sonuç olarak, kollajen tip I fibrilleri üzerine entegre olmuş, VEGFR1 ifade eden ince endotel hücresi tek tabakası başarılı bir şekilde tunika intima tabakası olarak gözlendi. Bu uygulama, hücre tabaka mühendisliği yaklaşımıyla, endotel hücresi tabakasının oluşturulduğu ilk damar grefti uygulamasıdır. Williams ve Backman, damar doku mühendisliği kapsamında, düz kas hücreleri ve MKH tabakaları elde etmek amacıyla PNIPAAm kaplı yüzeyleri kullanmışlardır (19, 20). Hücre bazlı damar greftlerinin oluşturulmasında istenilen tek katlı hücre tabakalarını elde etmede başarılı olmuşlardır. Diğer yandan, bu tez çalışmasında, damar yapılarının endotelizasyonu için hücre tabaka mühendisliğinin efektif bir şekilde kullanımı

gösterilmiştir. Endotelizasyon uygulamalarında karşılaşılabilecek en önemli sorunlardan bir tanesi, işlevini yerine getiremeyen endotel hücreleri tabakasının kan pıhtılaşmasına sebep olmasıdır. Loy ve ark. çalışmalarında, kan pıhtılaşma testi ile endotel hücreleri tek tabakasının fonksiyonel olduğunu kanıtlamışlardır (10). Bu tez çalışmasında da benzer bir yöntem olan trombosit adezyon testi ile endotel hücreleri tabakasına CD34+ hücrelerden farklılaştırılan megakaryositlerin /trombositlerin yapışıp yapışmadığı test edildi. Oluşturulan endotel tek tabakasının anti-trombojenik özelliği, bu hücrelerin yapı üzerinde az oranda tespit edilmesiyle kanıtlanmış oldu.

Doku mühendisliği kaynaklı damar greftlerinin, cerrahi müdahalelere dayanmaları, nakil sonrası zorlu hemodinamik çevreye uyum sağlayabilmeleri için yeterli mekanik kuvvete sahip olması gerekir ki bu özellikler uygun içeriğe ve bütünlüğe sahip olmaları ile sağlanabilir (154). Damar greftinin uygun mekanik özelliklere sahip olması gerekliliği dışında, iyileşme sürecindeki verdiği tepki de önem taşımaktadır. Neointimal hiperplazi, tromboz ve enflamasyon karşılaşılabilecek en önemli sorunlardır (7). Bu çalışmanın en önemli limitasyonu, oluşturulan bu damar yapısının biyoreaktör içinde geliştirilmemiş olması ve böylelikle yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olmamasıdır. Gui ve ark., fibrin, düz kas hücreleri ve fibroblastlar ile oluşturdukları damar greftini 30 gün biyoreaktörde kültüre etmiş ve greftin mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin doğal artere benzer olmasını sağlamışlardır (11). Syndein ve ark. ise damar greftinin, mekanik dayanıklılığını geliştirebilecek bir biyoreaktör düzeneğinde yedi-dokuz hafta kültürünü yapmışlardır (151).

Damar hastalıklarının tedavisinde otolog ve allojenik kan damarlarının transplantasyonu öncelikli yöntemdir. Ancak doku mühendisliğindeki gelişmeler, kan damarı ihtiyacını gidermek amacıyla üretilen greftlerin alternatif yöntem olarak tedavide uygulanabilirliklerini ortaya koymaktadır. Yakın tarihli bir klinik araştırmaya göre, 3686 hasta, Avrupa ve Avrasya ülkelerinde hücresel veya doku mühendisliği kaynaklı tedaviler almıştır. Bu hastalardan 2513 (%68) otolog hücrelerle, 1173'ü (%32) allojenik hücrelerle tedavi edilmiştir. Bu bağlamda, kardiyovasküler rahatsızlıkların endikasyonları %12 oranında görülmüş, bunların %69' unda da otolog transplantasyon uygulanmıştır (193). Bu nedenle,

biyomimetik allojenik damar yapılarının geliştirilmesi ve in vitro/in vivo testleri, klinikte yeni doku mühendisliği kaynaklı tedavilerin tasarımı için ilk adımdır. Bu amaçla, bu tez çalışmasında, yeni bir allojenik, biyomimetik 3B damar yapısı önerilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, üç tip damar hücresi tamamen doğal malzemelerle oluşturulmuş ve damar yapısının içerisinde canlılıklarını sürdürebildi. Bu hücre-ekstrasellüler matrik protein yapılarıyla, doğal kan damarlarının yapısına benzer üç tabakalı damar modeli oluşturuldu. Bu model; KAH'ın tedavisinde, kan damarlarının yapısına en yakın içeriğe sahip, tamamen doğal küçük çaplı damar greftlerinin oluşturulabilmesi için önemli bir basamaktır. Gelecekte, yapıyı mekanik olarak güçlendirebilmek, iskele içerisine dağılmış hücreleri kolaylıkla besleyebilmek ve intima tabakası içeriğini kontrol altında tutabilmek için, oluşturulan damar yapısını peristaltik akışa sahip biyoreaktör içerisinde kültüre etmeyi hedefliyoruz.

Koroner arter hastalıklarının tedavisine yönelik damar doku mühendisliği kapsamında Dünya' da ve Türkiye' de küçük çaplı damar greftlerinin oluşturulmasına yönelik mevcut olan verilere ek olarak bu tez çalışması sonunda;

1. Göbek kordonundan perisit izolasyonunun yapılmasında kullanılan farklı yöntemler bir arada denendi ve en uygun yöntem ortaya kondu,
2. CD146+ perisitler damar yapısında bulunan düz kas hücrelerine ve fibroblastlara farklılaştırıldı,
3. Göbek kordonu perisitlerinden farklılaşmış hücrelerden oluşan damar katmanlarının doğal malzemelerle birlikteliği gösterildi,
4. Damar greftlerinin oluşturulmasında hücre kaynağı olarak insan göbek kordon veni perisitlerinden köken alan damar hücreleri ve yöntem olarak "hücre tabaka mühendisliği" ilk defa birlikte kullanıldı,
5. Perisitlerin damar doku mühendisliği alanında kullanıldığı Türkiye' deki ilk çalışma oldu,
6. KVH' nin tedavisinde kullanılabilecek küçük çaplı damar greftleri oluşturulmasına yönelik bir damar modeli ortaya koyuldu,
7. İleride tasarlanacak biyoreaktörde geliştirilmesi planlanan damar greftinin 3B taslağı oluşturuldu,
8. Klinik uygulamalara yönelik patentli bir ürünün ortaya çıkarılmasına yönelik veriler elde edildi,

9. Geliştirilmiş olan hücre izolasyon teknikleri ve ko-kültür yöntemleri kök hücre çalışmaları ve doku mühendisliği açısından sonraki bilimsel çalışmalara ışık tutabilecek niteliğe geldi.



7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) 2017 [Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>]
2. Wilkins E WL, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. European Heart Network, Brussels. 2017.
3. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;131(4):e29-322.
4. Bajpai VK, Andreadis ST. Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2012;18(5):405-25.
5. Grandi C, Martorina F, Lora S, Dalzoppo D, Amista P, Sartore L, et al. ECM-based triple layered scaffolds for vascular tissue engineering. *Int J Mol Med*. 2011;28(6):947-52.
6. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials*. 2007;28(34):5009-27.
7. Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, Finn AV, Davis HR, Joner M, et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(2):79-98.
8. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015.
9. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986;231(4736):397-400.
10. Loy C, Meghezi S, Levesque L, Pezzoli D, Kumra H, Reinhardt D, et al. A planar model of the vessel wall from cellularized-collagen scaffolds: focus on cell-matrix interactions in mono-, bi- and tri-culture models. *Biomater Sci*. 2016;5(1):153-62.
11. Gui L, Boyle MJ, Kamin YM, Huang AH, Starcher BC, Miller CA, et al. Construction of tissue-engineered small-diameter vascular grafts in fibrin scaffolds in 30 days. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(9-10):1499-507.
12. Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. A fibrin-based arterial media equivalent. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66(3):550-61.
13. Buijtenhuijs P, Buttafoco L, Poot AA, Daamen WF, van Kuppevelt TH, Dijkstra PJ, et al. Tissue engineering of blood vessels: characterization of smooth-muscle cells for culturing on collagen-and-elastin-based scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;39(Pt 2):141-9.
14. Coelho NM, Gonzalez-Garcia C, Planell JA, Salmeron-Sanchez M, Altankov G. Different assembly of type IV collagen on hydrophilic and hydrophobic substrata alters endothelial cells interaction. *Eur Cell Mater*. 2010;19:262-72.

15. De Visscher G, Mesure L, Meuris B, Ivanova A, Flameng W. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1 α . *Acta Biomater.* 2012;8(3):1330-8.
16. Hoshi RA, Van Lith R, Jen MC, Allen JB, Lapidos KA, Ameer G. The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. *Biomaterials.* 2013;34(1):30-41.
17. Zhou M, Liu Z, Wei Z, Liu C, Qiao T, Ran F, et al. Development and validation of small-diameter vascular tissue from a decellularized scaffold coated with heparin and vascular endothelial growth factor. *Artif Organs.* 2009;33(3):230-9.
18. Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for regenerative medicine: current challenges and strategies. *Biotechnol J.* 2014;9(7):904-14.
19. Williams C, Xie AW, Emani S, Yamato M, Okano T, Emani SM, et al. A comparison of human smooth muscle and mesenchymal stem cells as potential cell sources for tissue-engineered vascular patches. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(9-10):986-98.
20. Backman DE, LeSavage BL, Shah SB, Wong JY. A Robust Method to Generate Mechanically Anisotropic Vascular Smooth Muscle Cell Sheets for Vascular Tissue Engineering. *Macromol Biosci.* 2017;17(6).
21. Sekiya S, Muraoka M, Sasagawa T, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Three-dimensional cell-dense constructs containing endothelial cell-networks are an effective tool for in vivo and in vitro vascular biology research. *Microvasc Res.* 2010;80(3):549-51.
22. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-13.
23. Nees S, Weiss DR, Juchem G. Focus on cardiac pericytes. *Pflugers Arch.* 2013;465(6):779-87.
24. Mendes LF, Pirraco RP, Szymczyk W, Frias AM, Santos TC, Reis RL, et al. Perivascular-like cells contribute to the stability of the vascular network of osteogenic tissue formed from cell sheet-based constructs. *PLoS One.* 2012;7(7):e41051.
25. Stefanska A, Peault B, Mullins JJ. Renal pericytes: multifunctional cells of the kidneys. *Pflugers Arch.* 2013;465(6):767-73.
26. Kutcher ME, Herman IM. The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res.* 2009;77(3):235-46.
27. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011;21(2):193-215.

28. Avolio E, Alvino VV, Ghorbel MT, Campagnolo P. Perivascular cells and tissue engineering: Current applications and untapped potential. *Pharmacol Ther.* 2017;171:83-92.
29. Crisan M, Corselli M, Chen WC, Peault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med.* 2012;16(12):2851-60.
30. Gokcinar-Yagci B, Uckan-Cetinkaya D, Celebi-Saltik B. Pericytes: Properties, Functions and Applications in Tissue Engineering. *Stem Cell Rev.* 2015;11(4):549-59.
31. Kajiyama S, Ujiie Y, Nishikawa S, Inoue K, Shirakawa S, Hanada N, et al. Bone formation by human umbilical cord perivascular cells. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(8):2807-14.
32. Chong MS, Chan J, Choolani M, Lee CN, Teoh SH. Development of cell-selective films for layered co-culturing of vascular progenitor cells. *Biomaterials.* 2009;30(12):2241-51.
33. van der Meer AD, Orlova VV, ten Dijke P, van den Berg A, Mummery CL. Three-dimensional co-cultures of human endothelial cells and embryonic stem cell-derived pericytes inside a microfluidic device. *Lab Chip.* 2013;13(18):3562-8.
34. He W, Nieponice A, Soletti L, Hong Y, Gharaibeh B, Crisan M, et al. Pericyte-based human tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials.* 2010;31(32):8235-44.
35. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
36. Uckan D, Hicsonmez G, Tunc B, Cetin M, Tezcan I, Tuncer M. The analysis of eosinophil and lymphocyte phenotype following single dose of high-dose methylprednisolone in two siblings with marked hypereosinophilia. *Clinical and laboratory haematology.* 2001;23(1):33-7.
37. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16(3):381-90.
38. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
39. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell.* 2002;13(12):4279-95.
40. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2004;6(6):543-53.
41. Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology.* 2004;18(6):893-908.
42. Kluth SM, Buchheiser A, Houben AP, Geyh S, Krenz T, Radke TF, et al. DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and

- mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem cells and development*. 2010;19(10):1471-83.
43. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human reproduction*. 2004;19(6):1450-6.
 44. Asakura A, Komaki M, Rudnicki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation; research in biological diversity*. 2001;68(4-5):245-53.
 45. Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, et al. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Experimental cell research*. 2003;287(2):289-300.
 46. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(4):696-704.
 47. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
 48. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature cell biology*. 2001;3(9):778-84.
 49. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.
 50. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
 51. Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *The Korean journal of internal medicine*. 2013;28(4):387-402.
 52. Prasongchean W, Ferretti P. Autologous stem cells for personalised medicine. *New biotechnology*. 2012;29(6):641-50.
 53. Marion NW, Mao JJ. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods in enzymology*. 2006;420:339-61.
 54. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Jr., Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology*. 2008;36(5):642-54.

55. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(8):1353-74.
56. Nees S, Weiss DR, Senftl A, Knott M, Forch S, Schnurr M, et al. Isolation, bulk cultivation, and characterization of coronary microvascular pericytes: the second most frequent myocardial cell type in vitro. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2012;302(1):H69-84.
57. Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue & cell.* 1998;30(1):127-35.
58. Mills SJ, Cowin AJ, Kaur P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. *Cells.* 2013;2(3):621-34.
59. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev.* 2009;89(3):957-89.
60. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and tissue research.* 2003;314(1):15-23.
61. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology.* 2005;7(4):452-64.
62. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *The EMBO journal.* 2002;21(7):1743-53.
63. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995;376(6535):70-4.
64. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277(5322):55-60.
65. Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development.* 2003;130(20):4769-84.
66. Paik JH, Skoura A, Chae SS, Cowan AE, Han DK, Proia RL, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes & development.* 2004;18(19):2392-403.
67. Pfister F, Przybyt E, Harmsen MC, Hammes HP. Pericytes in the eye. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2013;465(6):789-96.
68. Sims DE. Diversity within pericytes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 2000;27(10):842-6.
69. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research.* 2005;97(6):512-23.
70. Rajkumar VS, Shiwen X, Bostrom M, Leoni P, Muddle J, Ivarsson M, et al. Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for

- fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. *The American journal of pathology*. 2006;169(6):2254-65.
71. Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Peault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(6):1104-9.
 72. Davidoff MS, Middendorff R, Muller D, Holstein AF. The neuroendocrine Leydig cells and their stem cell progenitors, the pericytes. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. 2009;205:1-107.
 73. Maier CL, Pober JS. Human placental pericytes poorly stimulate and actively regulate allogeneic CD4 T cell responses. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(1):183-9.
 74. Balabanov R, Washington R, Wagnerova J, Dore-Duffy P. CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2. *Microvascular research*. 1996;52(2):127-42.
 75. Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain research Brain research reviews*. 1999;31(1):42-57.
 76. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*. 2004;16(1):1-13.
 77. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nature medicine*. 2003;9(6):661-8.
 78. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of anatomy*. 2002;200(6):629-38.
 79. Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell structure and function*. 2003;28(2):105-12.
 80. Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, et al. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *The American journal of pathology*. 1999;154(1):153-67.
 81. Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(4):215-28.
 82. Corselli M, Chin CJ, Parekh C, Sahaghian A, Wang W, Ge S, et al. Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 2013;121(15):2891-901.
 83. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine*. 2003;47(3):149-61.
 84. Lamagna C, Bergers G. The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(4):677-81.

85. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine*. 2003;9(6):685-93.
86. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular research*. 1996;32(4):687-98.
87. Crisan M, Huard J, Zheng B, Sun B, Yap S, Logar A, et al. Purification and culture of human blood vessel-associated progenitor cells. *Current protocols in stem cell biology*. 2008;Chapter 2:Unit 2B 1-2B 13.
88. Mogensen C, Bergner B, Wallner S, Ritter A, d'Avis S, Ninichuk V, et al. Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle. *Acta physiologica*. 2011;201(4):413-26.
89. Tsang WP, Shu Y, Kwok PL, Zhang F, Lee KK, Tang MK, et al. CD146+ human umbilical cord perivascular cells maintain stemness under hypoxia and as a cell source for skeletal regeneration. *PLoS One*. 2013;8(10):e76153.
90. Montemurro T, Andriolo G, Montelatici E, Weissmann G, Crisan M, Colnaghi MR, et al. Differentiation and migration properties of human foetal umbilical cord perivascular cells: potential for lung repair. *J Cell Mol Med*. 2011;15(4):796-808.
91. Maier CL, Shepherd BR, Yi T, Pober JS. Explant outgrowth, propagation and characterization of human pericytes. *Microcirculation*. 2010;17(5):367-80.
92. Park TS, Gavina M, Chen CW, Sun B, Teng PN, Huard J, et al. Placental perivascular cells for human muscle regeneration. *Stem cells and development*. 2011;20(3):451-63.
93. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. 2005;23(2):220-9.
94. Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, Schmidt BT, Askew Y, Nance JJ, et al. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:789526.
95. Bryan BA, D'Amore PA. Pericyte isolation and use in endothelial/pericyte coculture models. *Methods in enzymology*. 2008;443:315-31.
96. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry international*. 2009;54(3-4):253-63.
97. Tigges U, Welser-Alves JV, Boroujerdi A, Milner R. A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvascular research*. 2012;84(1):74-80.
98. Neng L, Zhang W, Hassan A, Zemla M, Kachelmeier A, Fridberger A, et al. Isolation and culture of endothelial cells, pericytes and perivascular resident macrophage-like melanocytes from the young mouse ear. *Nature protocols*. 2013;8(4):709-20.

99. Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Okamoto T, Takeuchi M, Makita Z. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal pericytes from advanced glycation end product-induced injury through its antioxidative properties. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;296(4):877-82.
100. Blocki A, Wang Y, Koch M, Peh P, Beyer S, Law P, et al. Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem cells and development*. 2013;22(17):2347-55.
101. Wanjare M, Kusuma S, Gerecht S. Perivascular cells in blood vessel regeneration. *Biotechnol J*. 2013;8(4):434-47.
102. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-36.
103. Papetti M, Shujath J, Riley KN, Herman IM. FGF-2 antagonizes the TGF-beta1-mediated induction of pericyte alpha-smooth muscle actin expression: a role for myf-5 and Smad-mediated signaling pathways. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(11):4994-5005.
104. Wakui S. Epidermal growth factor receptor at endothelial cell and pericyte interdigitation in human granulation tissue. *Microvascular research*. 1992;44(3):255-62.
105. Corselli M, Crisan M, Murray IR, West CC, Scholes J, Codrea F, et al. Identification of perivascular mesenchymal stromal/stem cells by flow cytometry. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013;83(8):714-20.
106. Nehls V, Drenckhahn D. The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry*. 1993;99(1):1-12.
107. Xueyong L, Shaozong C, Wangzhou L, Yuejun L, Xiaoxing L, Jing L, et al. Differentiation of the pericyte in wound healing: The precursor, the process, and the role of the vascular endothelial cell. *Wound Repair Regen*. 2008;16(3):346-55.
108. Wang L, Xiong M, Che D, Liu S, Hao C, Zheng X. The effect of hypoxia on expression of basic fibroblast growth factor in pulmonary vascular pericytes. *J Tongji Med Univ*. 2000;20(4):265-7.
109. Ivarsson M, Sundberg C, Farrokhnia N, Pertoft H, Rubin K, Gerdin B. Recruitment of type I collagen producing cells from the microvasculature in vitro. *Experimental cell research*. 1996;229(2):336-49.
110. Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF, Detmar M, Dvorak HF. 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. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2002;82(4):387-401.

111. Rodriguez A, Karen J, Gardner H, Gerdin B, Rubin K, Sundberg C. Integrin alpha1beta1 is involved in the differentiation into myofibroblasts in adult reactive tissues in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(9B):3449-62.
112. Pierce GF, Vande Berg J, Rudolph R, Tarpley J, Mustoe TA. Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *The American journal of pathology*. 1991;138(3):629-46.
113. Sundberg C, Ivarsson M, Gerdin B, Rubin K. Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996;74(2):452-66.
114. Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2009;37(5):629-40.
115. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, et al. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e46842.
116. Li S, Sengupta D, Chien S. *Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2014;6(1):61-76.
117. Mendis S, Davis S, Norrving B. Organizational update: the world health organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease. *Stroke*. 2015;46(5):e121-2.
118. Institute TS. *Causes of Death Statistics, 2013*. 2014.
119. Kirali K, Sacli H. *Coronary Artery Bypass Surgery*. In: Kirali K, editor. *Coronary Artery Disease - Assessment, Surgery, Prevention*: Intech; 2015.
120. Harskamp RE, Lopes RD, Baisden CE, de Winter RJ, Alexander JH. Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions. *Ann Surg*. 2013;257(5):824-33.
121. Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(7):410-21.
122. Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
123. Salgado AJ, Oliveira JM, Martins A, Teixeira FG, Silva NA, Neves NM, et al. *Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future*. *International review of neurobiology*. 2013;108:1-33.
124. Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. *Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds*. *Journal of anatomy*. 2008;213(1):66-72.
125. Mravic M, Asatrian G, Soo C, Lugassy C, Barnhill RL, Dry SM, et al. From pericytes to perivascular tumours: correlation between pathology, stem cell biology, and tissue engineering. *International orthopaedics*. 2014;38(9):1819-24.

126. Tourovskaia A, Fauver M, Kramer G, Simonson S, Neumann T. Tissue-engineered microenvironment systems for modeling human vasculature. *Experimental biology and medicine*. 2014;239(9):1264-71.
127. Sirabella D, De Angelis L, Berghella L. Sources for skeletal muscle repair: from satellite cells to reprogramming. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2013;4(2):125-36.
128. Fuoco C, Sangalli E, Vono R, Testa S, Sacchetti B, Latronico MV, et al. 3D hydrogel environment rejuvenates aged pericytes for skeletal muscle tissue engineering. *Frontiers in physiology*. 2014;5:203.
129. James AW, Zara JN, Zhang X, Askarinam A, Goyal R, Chiang M, et al. Perivascular stem cells: a prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(6):510-9.
130. James AW, Zara JN, Corselli M, Askarinam A, Zhou AM, Hourfar A, et al. An abundant perivascular source of stem cells for bone tissue engineering. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(9):673-84.
131. McBane JE, Sharifpoor S, Labow RS, Ruel M, Suuronen EJ, Santerre JP. Tissue engineering a small diameter vessel substitute: engineering constructs with select biomaterials and cells. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(3):347-60.
132. Askarinam A, James AW, Zara JN, Goyal R, Corselli M, Pan A, et al. Human perivascular stem cells show enhanced osteogenesis and vasculogenesis with Nel-like molecule I protein. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(11-12):1386-97.
133. Morin KT, Smith AO, Davis GE, Tranquillo RT. Aligned human microvessels formed in 3D fibrin gel by constraint of gel contraction. *Microvascular research*. 2013;90:12-22.
134. Kim S, Lee H, Chung M, Jeon NL. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab on a chip*. 2013;13(8):1489-500.
135. Chen CW, Okada M, Proto JD, Gao X, Sekiya N, Beckman SA, et al. Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem cells*. 2013;31(2):305-16.
136. Andrejcsk JW, Cui J, Chang WG, Devalliere J, Pober JS, Saltzman WM. Paracrine exchanges of molecular signals between alginate-encapsulated pericytes and freely suspended endothelial cells within a 3D protein gel. *Biomaterials*. 2013;34(35):8899-908.
137. Anfuso CD, Motta C, Satriano C, Gennaro S, Marletta G, Giurdanella G, et al. Microcapillary-like structures prompted by phospholipase A2 activation in endothelial cells and pericytes co-cultures on a polyhydroxymethylsiloxane thin film. *Biochimie*. 2012;94(9):1860-70.
138. Saik JE, Gould DJ, Watkins EM, Dickinson ME, West JL. Covalently immobilized platelet-derived growth factor-BB promotes angiogenesis in

- biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogels. *Acta biomaterialia*. 2011;7(1):133-43.
139. Campagnolo P, Gormley AJ, Chow LW, Guex AG, Parmar PA, Puetzer JL, et al. Pericyte Seeded Dual Peptide Scaffold with Improved Endothelialization for Vascular Graft Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(23):3046-55.
 140. Zebardast N, Lickorish D, Davies JE. Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVC): A mesenchymal cell source for dermal wound healing. *Organogenesis*. 2010;6(4):197-203.
 141. Dall'Olmo L, Zanusso I, Di Liddo R, Chioato T, Bertalot T, Guidi E, et al. Blood vessel-derived acellular matrix for vascular graft application. *Biomed Res Int*. 2014;2014:685426.
 142. Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9214-9.
 143. Koens MJ, Faraj KA, Wismans RG, van der Vliet JA, Krasznai AG, Cuijpers VM, et al. Controlled fabrication of triple layered and molecularly defined collagen/elastin vascular grafts resembling the native blood vessel. *Acta Biomater*. 2010;6(12):4666-74.
 144. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med*. 2011;17(8):424-32.
 145. Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L'Heureux N. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs*. 2012;195(1-2):144-58.
 146. Bourget JM, Gauvin R, Larouche D, Lavoie A, Labbe R, Auger FA, et al. Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(36):9205-13.
 147. Wystrychowski W, Cierpka L, Zagalski K, Garrido S, Dusserre N, Radochonski S, et al. Case study: first implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access. *J Vasc Access*. 2011;12(1):67-70.
 148. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*. 1998;12(1):47-56.
 149. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet*. 2009;373(9673):1440-6.
 150. Mandarino LJ, Sundarraj N, Finlayson J, Hassell HR. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res*. 1993;57(5):609-21.

151. Syedain ZH, Meier LA, Bjork JW, Lee A, Tranquillo RT. Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. *Biomaterials*. 2011;32(3):714-22.
152. Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(3):H1451-60.
153. Kielty CM, Stephan S, Sherratt MJ, Williamson M, Shuttleworth CA. Applying elastic fibre biology in vascular tissue engineering. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362(1484):1293-312.
154. Ryan AJ, O'Brien FJ. Insoluble elastin reduces collagen scaffold stiffness, improves viscoelastic properties, and induces a contractile phenotype in smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2015;73:296-307.
155. Daamen WF, van Moerkerk HT, Hafmans T, Buttafoco L, Poot AA, Veerkamp JH, et al. Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(22):4001-9.
156. Aper T, Wilhelmi M, Gebhardt C, Hoeffler K, Benecke N, Hilfiker A, et al. Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix. *Acta Biomater*. 2016;29:21-32.
157. Gauvin R, Ahsan T, Larouche D, Levesque P, Dube J, Auger FA, et al. A novel single-step self-assembly approach for the fabrication of tissue-engineered vascular constructs. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(5):1737-47.
158. Liu L, Michowski W, Inuzuka H, Shimizu K, Nihira NT, Chick JM, et al. G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2017;19(3):177-88.
159. Yamato M, Akiyama Y, Kobayashi J, Yang J, Kikuchi A, Okano T. Temperature-responsive cell culture surfaces for regenerative medicine with cell sheet engineering. *Progress in Polymer Science*. 2007;32(8-9):1123-33.
160. Feletou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease*. San Rafael (CA)2011.
161. Gokcinar-Yagci B, Ozyuncu O, Celebi-Saltik B. Isolation, characterisation and comparative analysis of human umbilical cord vein perivascular cells and cord blood mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(2):345-52.
162. Gokcinar-Yagci B, Celebi-Saltik B. Comparison of different culture conditions for smooth muscle cell differentiation of human umbilical cord vein CD146+ perivascular cells. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(4):501-11.

163. Peters EB, Liu B, Christoforou N, West JL, Truskey GA. Umbilical Cord Blood-Derived Mononuclear Cells Exhibit Pericyte-Like Phenotype and Support Network Formation of Endothelial Progenitor Cells In Vitro. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(10):2552-68.
164. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 2011;7(2):463-77.
165. Lee CH, Shah B, Moiola EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J Clin Invest.* 2010;120(9):3340-9.
166. Wang L, Xiong M, Che D, Yuan Y, Liu S. [Effect of hypoxia on proliferation and differentiation of the pulmonary vascular pericytes]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 1999;22(3):176-8.
167. Wang C, Yin S, Cen L, Liu Q, Liu W, Cao Y, et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-4. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(4):1201-13.
168. Narita Y, Yamawaki A, Kagami H, Ueda M, Ueda Y. Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell Tissue Res.* 2008;333(3):449-59.
169. Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, Olson EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(12):7129-34.
170. Cummings CL, Gawlitta D, Nerem RM, Stegemann JP. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials.* 2004;25(17):3699-706.
171. Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng.* 2006;34(6):971-85.
172. Madhavan K, Belchenko D, Motta A, Tan W. Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomater.* 2010;6(4):1413-22.
173. Miwa H, Matsuda T, Tani N, Kondo K, Iida F. An in vitro endothelialized compliant vascular graft minimizes anastomotic hyperplasia. *ASAIO J.* 1993;39(3):M501-5.
174. Celebi-Saltik B, Gokcinar-Yagci B. Expansion of human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with cord vein pericytes. *Turkish Journal of Biology.* 2017;41:49-57.
175. Zaniboni A, Bernardini C, Bertocchi M, Zannoni A, Bianchi F, Avallone G, et al. In vitro differentiation of porcine aortic vascular precursor cells to endothelial and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015;309(5):C320-31.

176. National Center for Biotechnology Information US. Genes and Expression [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>].
177. Vezzani B, Pierantozzi E, Sorrentino V. Not All Pericytes Are Born Equal: Pericytes from Human Adult Tissues Present Different Differentiation Properties. *Stem Cells Dev.* 2016.
178. Ennis J, Sarugaser R, Gomez A, Baksh D, Davies JE. Isolation, characterization, and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods Cell Biol.* 2008;86:121-36.
179. Greenwood-Goodwin M, Yang J, Hassanipour M, Larocca D. A novel lineage restricted, pericyte-like cell line isolated from human embryonic stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:24403.
180. I. R. Murray ZG, C. C. West, M. Corselli, G. Miranda-Carboni, B. Peault. Osteogenic Differentiation of Perivascular MSC Precursors is Enhanced by Endothelial Cells. ORS 2014 Annual Meeting. 2014;Poster No: 1464.
181. An B, Na S, Lee S, Kim WJ, Yang SR, Woo HM, et al. Non-enzymatic isolation followed by supplementation of basic fibroblast growth factor improves proliferation, clonogenic capacity and SSEA-4 expression of perivascular cells from human umbilical cord. *Cell Tissue Res.* 2015;359(3):767-77.
182. Lachaud CC, Lopez-Beas J, Soria B, Hmadcha A. EGF-induced adipose tissue mesothelial cells undergo functional vascular smooth muscle differentiation. *Cell death & disease.* 2014;5:e1304.
183. Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, Gadelorge M, Sensebe L, Bourin P. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2014;18(1):104-14.
184. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development.* 1995;121(6):1845-54.
185. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Current opinion in genetics & development.* 1996;6(4):432-8.
186. Lagna G, Ku MM, Nguyen PH, Neuman NA, Davis BN, Hata A. Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(51):37244-55.
187. Franke J, Abs V, Zizzadoro C, Abraham G. Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC veterinary research.* 2014;10:119.
188. Truettner JS, Katyshev V, Esen-Bilgin N, Dietrich WD, Dore-Duffy P. Hypoxia alters MicroRNA expression in rat cortical pericytes. *Microna.* 2013;2(1):32-44.

189. Yang Z, Zhang F, Ma W, Chen B, Zhou F, Xu Z, et al. A novel approach to transplanting bone marrow stem cells to repair human myocardial infarction: delivery via a noninfarct-related artery. *Cardiovasc Ther.* 2010;28(6):380-5.
190. Tong Z, Sant S, Khademhosseini A, Jia X. Controlling the fibroblastic differentiation of mesenchymal stem cells via the combination of fibrous scaffolds and connective tissue growth factor. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(21-22):2773-85.
191. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84.
192. Engbers-Buijtenhuijs P, Buttafoco L, Poot AA, Dijkstra PJ, de Vos RA, Sterk LM, et al. Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials.* 2006;27(11):2390-7.
193. Ireland H, Gay MHP, Baldomero H, De Angelis B, Baharvand H, Lowdell MW, et al. The survey on cellular and tissue-engineered therapies in Europe and neighboring Eurasian countries in 2014 and 2015. *Cytotherapy.* 2018;20(1):1-20.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni - 1



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

02 Ağustos 2013

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.07.00
Sayı: 16969557 -840


ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24.07.2013 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2013/14
Proje No : GO 13/ 417 (Değerlendirme Tarihi 24.07.2013)
Karar No : GO 13/ 417 - 27

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim görevlilerinden Dr.Betül Çelebi SALTİK'ın sorumlu araştırmacı olduğu Arş.Gör.Beyza Gökçınar YAĞCI, Prof.Dr.Duygu Uçkan ÇETİNKAYA ve Doç.Dr.Özgür ÖZYÜNCÜ ile birlikte çalışacakları GO 13/417 kayıt numaralı ve "Biyoreaktör ile Damar Doku Mühendisliği: Göbek Kordonu Kök Hücreleri ve Matris Proteinleri ile Damar Tabakaları Oluşumu" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örneken (Üye) | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye) | 11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 14. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni - 2

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**
Güçsüzel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16669557-483

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 15.04.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/08
Proje No : GO 15/297 (Değerlendirme Tarihi: 15.04.2015)
Karar No : GO 15/297 - 26

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkez öğretim görevlisi Dr. Betül CELEBI SALTIK'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Arş. Gör. Beza Gökçınar YAĞCI ve Doç. Dr. Özgür ÖZYÜNCÜ ile birlikte çalışacakları, GO 15/297 kayıt numaralı ve "İnsan Göbek Kordonu Venüsünden CD146+ Hücrelerin Eldesi ve Vasküler Düz. Kas Hücrelerine Farklılaştırılması" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nuriye Akcaş (Başkan)	(Üye)	9. Prof. Dr. Rahime Nebutça	(Üye)
2. Prof. Dr. Nürcan Örnek Bakır (Üye)	(Üye)	10. Prof. Dr. R. Koksal Özgül	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yılmaz Sara (Üye)	(Üye)	11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan	(Üye)
4. Prof. Dr. Seyda F. MİHOĞLU (Üye)	(Üye)	12. Doç. Dr. S. Kutay Domarcıoğlu	(Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sokmazcıoğlu (Üye)	(Üye)	13. Prof. Dr. Leyla Dınc	(Üye)
6. Prof. Dr. Volga Bayraktar Tunç (Üye)	(Üye)	14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu	(Üye)
7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye)	(Üye)	15. Av. Meltem Onurlu	(Üye)
8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin Turunçoğlu (Üye)	(Üye)		

Hacettepe Üniversitesi Güçsüzel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
50100 Sıhhiye-Ankara

Ayrıntılı bilgi için:

EK-3: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni - 3



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16990557-416
Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 12.04.2016 SALI
Toplantı No : 2016/08
Proje No : GÖ 16/213 (Değerlendirme Tarihi : 12.04.2016)
Karar No : GÖ 16/213 - 13

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim elemanlarından Öğr. Gör. Dr. Betül Çelebi SAĞTIK'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Arş. Gör. Beyza Çelikkaya YAĞCI ile birlikte çalışacakları, GÖ 16/213 kayıt numarası ve "İnsan Göbek Kordonu Vani CD146+ Hücrelerinden Farklılaştırılan Düz Kas Hücrelerinde Karakterizasyonu ve Ekstrasellüler Matris Proteinleri ile Etkileşimleri" başlıklı proje önerisi araştırmanın gereçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|---|
| 1. Prof. Dr. Sevinç F. MÜFTÜOĞLU (Başkan) | 10. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nürten AKARŞU (Üye) | 11. Prof. Dr. Neader SAĞLAM (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yılmaz SARA (Üye) | 12. Doç. Dr. Gülsede GİRGIN (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Cem SÖKMENSÜER (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 5. Prof. Dr. İlhançe Doğan BUZOĞLU (Üye) | 14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin TURNAĞOL (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Muge DEMİR (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye) | 17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Merve Kerem GÜNEL (Üye) | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye) |

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Beyza GÖKÇINAR YAĞCI
Doğum Tarihi: 02 Şubat 1984
Doğum Yeri: Karabük
Uyruk: TC
Ünvanı: Uzman Biyolog
Ev Adresi: Konutkent Mahallesi, Konutkent 1 Sitesi E6 Blok No:26
Çayyolu/ANKARA
E-posta Adresi: beyza.gokcinar@hacettepe.edu.tr
beyza_gok@yahoo.com
Telefon (Cep): 0536 503 5720

II. Eğitimi

Doktora 2011-2018	Hacettepe Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü /Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı Tez Adı: Hücre Tabaka Mühendisliği ile Göbek Kordonu Perisitlerinden Üç Boyutlu Damar Grefti Eldesi Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Betül Çelebi Saltık
Yüksek Lisans 2008-2010	Hacettepe Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tez Adı: <i>Chlamydomydia pneumoniae</i> 'nin alt solunum yolu enfeksiyonu görülen hastalarda serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cumhur Özkuyumcu
Lisans 2003-2007	Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi / Biyolojik Bilimler Bölümü / Biyoloji Anabilim Dalı

III. Mesleki Deneyimi

Araştırma Görevlisi 2011-2017	Hacettepe Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü /Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
----------------------------------	--

IV. Bilimsel Faaliyetler

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. **Gökçinar-Yağcı B.**, Uçkan-Çetinkaya D., Çelebi-Saltık B. Pericytes: properties, functions and applications in tissue engineering. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2015, 11(4): 549-59.
2. **Gökçinar-Yağcı B.**, Ozyuncu O., Çelebi-Saltık B. Isolation, characterization and comparative analysis of human umbilical cord vein perivascular cells and cord blood mesenchymal stem cells. *Cells and Tissue Banking*. 2016, 17(2), 345-352.
3. Çelebi-Saltık, B.; **Gökçinar-Yağcı, B.** Expansion of human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with cord vein pericytes. *Turkish Journal of Biology*. 2017, 41: 49-57.
4. **Gokcinar-Yagci, B.**, Celebi-Saltik B. Comparison of different culture conditions for smooth muscle cell differentiation of human umbilical cord vein CD146+ perivascular cells. *Cell and Tissue Banking*. 2017, 18(4): 501-511.
5. Mendi H.A., **Gökçinar-Yağcı B.**, Kızıloğlu M., Sarac N., Ugur A., Yılmaz D., Uçkan D. *Thymra spicata* var. *intricata* induces mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2017, Volume 60, e17160391.
6. Mendi H.A., **Gökçinar-Yağcı B.**, Kızıloğlu M., Sarac N., Yılmaz D., Ugur A., Uçkan D. The effects of *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, and *Salvia triloba* extracts on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *Journal of Applied Oral Science*. 2017.

Ulusal / Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Yapılan Sözlü Sunumlar

1. **Gökçinar-Yağcı B.** Göbek Kordonundan Perisit İzolasyonu ve Karakterizasyonu, H.Ü. Kök Hücre Günü 2014, 19 Kasım 2014, Ankara, Türkiye.
2. **Gökçinar-Yağcı B.**, Çelebi-Saltık B. Smooth muscle cell differentiation of human umbilical cord vein pericytes: Effect of hypoxia, 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, 15-18 October 2015, Antalya, Türkiye.
3. **Gokcinar-Yagci B.**, Çelebi-Saltık B., "Interaction of human umbilical cord vein derived smooth muscle cells and fibroblasts with natural scaffolds composed of human vascular extracellular matrix proteins", 41st FEBS Congress, 3-8 September 2016, Aydın, Türkiye. (SSCI)
4. Mendi A, **Gökçinar Yağcı B**, Saraç N, Kızıloğlu M, Uğur A, Yılmaz D, Uçkan D. Effect of *Ocimum basilicum* on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation: Does the effect change according to niches? 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, 10-12 Mayıs 2017, Konya, Türkiye.

Ulusal / Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Posterler

1. Çelebi-Saltik B., **Gökçınar-Yağci B.** Improved ex vivo expansion of human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with cord pericytes. ISSCR Annual Meeting 2015, 24-27 Haziran 2015, Stockholm, Sweden.
2. **Gökçınar-Yağci B.**, Çelebi-Saltik B. Human umbilical cord vein pericyte differentiation for vascular tissue engineering, 2015 TERMIS 4th World Congress, 8-11 Eylül 2015, Boston, ABD. (SCI-E)
3. Çelebi-Saltik B., **Gökçınar-Yağci B.** Engineered small diameter vascular grafts by cell sheet engineering with human umbilical cord vein perivascular cells, 10th World Biomaterials Congress, 17-22 Mayıs 2016, Montreal, Kanada.
4. **Gökçınar-Yağci B.**, Çelebi-Saltik B. Pericyte-based collagen scaffold for vascular tissue engineering, 10th World Biomaterials Congress, 17-22 Mayıs 2016, Montreal, Kanada.
5. **Gökçınar-Yağci B.**, Çelebi-Saltik B. CD146+ perivascular cells isolated by two different techniques from human umbilical cord vein have different characteristics according to their marker expressions and differentiation capacities, The 41 FEBS Congress, 3-8 Eylül 2016, İzmir, Türkiye.
6. Çelebi-Saltik B., **Gökçınar-Yağci B.** Effect of three different culture media on smooth muscle cell differentiation of umbilical cord vein-derived CD146+ perivascular cells, ISEH 46th Annual Scientific Meeting, 24-27 Ağustos 2017, Frankfurt, Almanya. (SCI-E)
7. Çelebi-Saltik B., Ozen Akarca Dizakar, Suna Omeroglu, **Gökçınar-Yağci B.** Combination of smooth muscle cells and fibroblasts differentiated from human umbilical cord vein CD146 + cells with human extracellular matrix proteins, ISEH 46th Annual Scientific Meeting, 24-27 Ağustos 2017, Frankfurt, Almanya. (SCI-E)
8. Çelebi-Saltik B., **Gökçınar-Yağci B.** Combination of human umbilical cord vein perivascular cells and human extracellular matrix proteins for vascular tissue engineering, 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 4 - 8 Eylül 2017, Athens, Yunanistan.
9. Mendi AH, **Gökçınar Yağci B**, Saraç N, Kızıloğlu M, Uğur A, Çetikaya Uçkan D, Yılmaz D. Effect of Hypericum perforatum on mesenchymal stem cells, 1st International Health Sciences Congress, 23-25 Kasım 2017, Edirne, Türkiye.

Aldığı Ödüller

1. **Tepha Trainee Award:** Engineered small diameter vascular grafts by cell sheet engineering with human umbilical cord vein perivascular cells, 10th World Biomaterials Congress, 17-22 Mayıs 2016, Montreal, Kanada.

Görev Aldığı Projeler

1. Alveolit önlenmesinde farklı doğal ekstraların mezenkimal kök hücre farklılaşma ve immünolojik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması, TÜBİTAK 1001 Projesi, Bursiyer, 10/10/2013-10/10/2014.
2. Biyoreaktör ile damar doku mühendisliği: Göbek kordonu kök hücreleri ve matriks proteinleri ile damar tabakaları oluşumu, TÜBİTAK 3501 Projesi, Bursiyer, 04/2014 – 05/2017.
3. İnsan göbek kordonu veninden CD146+ hücrelerin eldesi ve vasküler düz kas hücrelerine farklılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Hızlı Destek Projesi, Araştırmacı, 18/05/2015- 21/11/2015.
4. İnsan göbek kordonu veni CD146+ hücrelerinden farklılaştırılan düz kas hücrelerinin karakterizasyonu ve ekstraselüler matriks proteinleri ile etkileşimleri, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Hızlı Destek Projesi, Araştırmacı, 28/06/2016 – 30/03/2017.

Katıldığı Kongre, Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

1. Kök Hücre Günü 2013, 8 Kasım 2013, Ankara, Türkiye.
2. Kök Hücre Günü 2014, 19 Kasım 2014, Ankara, Türkiye.
3. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, 15-18 Ekim 2015, Antalya, Türkiye.
4. Kök Hücre Günü 2015, Ankara, Türkiye.
5. 10th World Biomaterials Congress, 17-22 Mayıs 2016, Montreal, Kanada.
6. Kök Hücre Günü 2016, Ankara, Türkiye.