

T. C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YARA İYİLEŞME MODELİNDE MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRE DİFFERANSİYASYONUNDA  
FOLİK ASİT ETKİSİ

AHU PAKDEMİRLİ

FİZYOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İZMİR- 2018

TEZ KODU: DEU.HSI. PhD-2012970034

T. C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YARA İYİLEŞME MODELİNDE MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRE DİFFERANSİYASYONUNDA  
FOLİK ASİT ETKİSİ**

**FİZYOLOJİ**

**DOKTORA TEZİ**

**AHU PAKDEMİRLİ**

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Osman AÇIKGÖZ**  
**2. Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR**

TEZ KODU: DEU.HSI. PhD-2012970034


Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü *Fizyoloji* Anabilim Dalı, *Fizyoloji* Doktora programı öğrencisi *Ahu PAKDEMİRLİ'nin* "YARA İYİLEŞME MODELİNDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE DİFFERANSİYASYONUNDA FOLİK ASİT ETKİSİ" konulu *Doktora* tezini 29/08/2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Osman AÇIKGÖZ

BAŞKAN

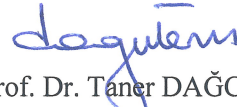
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Taner DAĞCI

ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Ayfer DAYI

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

ÜYE

Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Ayşegül KESER

YEDEK ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. İlkay AKSU

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
1.1. Problemin Tanımı.....	5
1.2. Araştırmanı Amacı.....	6
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	7
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Yara İyileşmesi.....	8
2.2.Mezenkimal Kök Hücre.....	9
2.3. Folik Asit.....	11
2.4. Folik Asit İnhibitörleri.....	15
2.4.1. Metotreksat (MTX).....	15
2.4.2. Pemetreksat (PTX).....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Araştırmanın Tipi.....	17
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	17
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	17
3.4. Çalışma Materyali.....	17

3.5. Araştırmanın Değişkenler.....	17
3.6. Veri Toplama Araçları.....	18
3.6.1. Kullanılan Malzemeler-Cihazlar.....	18
3.6.2. HUVEC Hücre Kültürü .....	19
3.6.3. Kök Hücre Kültürü.....	19
3.6.4. xCELLigence ile Gerçek Zamanlı Hücre Büyümesi ve Çoğalması Deneyi.....	19
3.6.5. <i>In vitro</i> Yara Modeli.....	20
3.6.6. JuLI Br Live Cell Movie Analyser (NanoEnTek).....	20
3.6.7. Ko-Kültür Modeli.....	21
3.6.8. “Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells” Farklılaştırma Protokolü.....	22
3.6.9. Çalışma Grupları.....	23
3.6.9.1. HUVEC Hücre Hattı ile Oluşturulan Proliferasyon Deneyleri.....	23
3.6.9.2. HUVEC Hücre Hattı ile Oluşturulan Yara Modeli.....	24
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	26
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	28
3.8.1. İstatistiksel Yöntemler.....	28
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	28
3.10. Etik Kurul.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. HUVEC Hücre Hattı ile Oluşturulan Proliferasyon Deneyleri.....	29
4.2. HUVEC Hücre Hattı ile Oluşturulan Yara İyileşmesi Deneyleri.....	34
4.2.1. HUVEC Yara İyileşmesi Modeli (Folik Asit Etkisi).....	35

4.2.2. HUVEC Yara İyileşmesi Modeli (Mezenkimal Kök Hücre Etkisi).....	37
5. TARTIŞMA .....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48
8. EKLER.....	54
8.1. Etik Kurul Onayı.....	54
8.2. Laboratuvar İzni.....	57
8.3. Özgeçmiş.....	58

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. MKH'lerde Stro-1 ve CD45'in immünohistokimya ile boyanması.....	9
Şekil 2. Mezenkimal kök hücreler tarafından yönlendirilen yara iyileşmesi.....	10
Şekil 3. Folik asit molekülü.....	11
Şekil 4. Folik asit metabolizması.....	12
Şekil 5. Pluripotent kök hücrelerde metabolizması.....	13
Şekil 6. Folik asit antagonisti metotrexate metabolizması.....	15
Şekil 7. Pemetreksat ile çoklu folat metabolizma enzimlerin inhibisyonu.....	16
Şekil 8. HUVEC hücre hattı ve BMSCs (Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell) hücreleri ile oluşturulan ko-kültür modeli.....	21
Şekil 9. Farklılaştırma protokolü mikroskop görüntüleri.....	22
Şekil 10. Folik asit proliferasyon analizi.....	29
Şekil 11. Pemetreksat (folik asit metabolizma inhibitörü) etkisi.....	30
Şekil 12. Metotrexat (folik asid antagosti) etkisi.....	31
Şekil 13. HUVEC hücreleri üzerine folik asitin etkileri, doz yanıtları 48 saat sonuçları... 32	
Şekil 14. Folik Asit+MKHKO Etkisi.....	33
Şekil 15. HUVEC hücreleri üzerine farklılaştırma protokolü ile elde edilen MDFs etkisi.....	34
Şekil 16. HUVEC yara iyileşme modelinde folik asit etkisi.....	36
Şekil 17 HUVEC yara iyileşmesi modelinde mezenkimal kök hücre etkisi.....	38
Şekil 18. Mezenkimal kök hücrelerin sistemik uygulanması.....	41
Şekil 19. Doku onarımında MKH'lerin parakrin mekanizmalarının bir modeli.....	44
Şekil 20. <i>In vivo</i> yara iyileşmesinde folik asit etkisi.....	46

## **KISALTMALAR**

**MKH:** Mezenkimal kök hücre

**HUVEC:** Human umbilical vein/vascular endothelium/endothelial hücreler

**PABA:** p-amino benzoik asit

**ECM:** Hücre dışı matriks

**SPK:** Deri kaynaklı öncü hücreler

**EpSC:** Epidermal kök hücre

**AMSC:** Amniyon kaynaklı mezenkimal kök hücreler

**SMSC:** Sinoviyum mezenkimal kök hücreler

**BMSC:** Kemik iliğinden türetilmiş kök hücreler

**ASC:** Adipoz türevli kök hücreler

**GPx:** Glutatyon peroksidaz

**HaCaT:** İmmünize insan keratinosit

**HGF:** Hepatosit büyüme faktörü

**ICAM:** İnterselüler adezyon molekülü 1

**IL-1:** Interlökin-1

**MMP-1:** Matriks metalloproteinaz-1

**SOD:** Süperoksit dismutaz

**TNF- $\alpha$ :** Tümör nekroz faktörü-alfa

**VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

**MDFs:** MKH-kaynaklı faktörler

**SAM:** S-adenosilmetionin

**HK:** Heksokinaz



**PFK1:** Fosfokustokinaz 1

**PPP:** Pentoz fosfat yolu

**PGK:** Glikolitik fosfogliserat kinaz

**PK:** Piruvat kinaz

**ETC:** Mitokondriyal elektron taşıma zinciri

**TDH:** Threonine dehydrogenase

**GCAT:** Glisin C-asetiltransferaz

**GLDC:** Glisin dekarboksilaz

**Ac-CoA:** Asetil koenzim A

**F6P:** Fruktoz-6-fosfat

**FBP:** Fruktoz-1,6-bisfosfat

**G6P:** Glikoz-6-fosfat

**GAPDH:** Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz

**GPI:** Glikoz-6-fosfat izomeraz

**LDHA:** Laktat dehidrojenaz A

**OAA:** Oksaloasetat

**PC:** Piruvat karboksilaz

**PDH:** Piruvat dehidrojenaz kompleksi

**PK:** Piruvat kinaz

**TP1:** Triosefosfat izomerazi

**BMSCs:** Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell

**MKHKO:** Mezenkimal kök hücre kültür ortamı

**ATCC:** American Type Culture Collection

**FBS:** Fötal sığır serumu

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO:** Dimetil sülfoksit

**MTX:** Metotreksat

**PTX:** Pemetreksat

**IGF-1:** İnsülin benzeri büyüme faktörü 1

**MCP1:** Monosit kemoattractan protein 1

**bFGF:** Bazik fibroblast büyüme faktörü

**IL6:** İnterlökin 6

**SCF:** Kök hücre faktörü

**LİF:** Lösemi-inhibitör faktör

**MCSF:** Makrofaj kolonistimulasyon faktörü

**SDF1:** Stromal türevli faktör 1

**HGF:** Hepatosit büyüme faktörü

**ADM:** Adrenomedullin

**TGF:** Transforme edici büyüme faktörü

**GMCSF:** Granülosit makrofaj kolonistimulasyon faktörü

**HLA5:** İnsan lökosit antijeni G5

**iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

**İDO:** İndoleamin2,3dioksijenaz

**PGE2:** Prostaglandin E2

**Treg:** Dzenleyici T hcreleri

**NK:** Doğal öldürücü

**DC:** Dendritik hücre

**a-SMA:** a-düz kas aktin

**NPX:** Nefrektomi

**ml:** Mililitre

**µl:** Mikrolitre

**µm:** Mikrometre

**cm:** Santimetre

**µM:** Mikromolar

**mM:** Milimolar

**Dk:** Dakika

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine her danıştığım da kıymetli vaktini bana ayıran, her hangi bir sorun yaşadığımda çekinmeden yanına gidebildiğim, danışman hoca statüsünü layığı ile yerine getiren çok kıymetli Hocam Prof. Dr. Osman Açıkgöz'e,

Öğrencisi olmanın haklı gururunu yaşadığım, doktora eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen, akademik hayatımda beni hep daha ileriye taşıyan ve doktora danışmanlığı dışında akademik danışman kimliğinin hakkını veren çok değerli Hocam Prof. Dr. Yasemin Başbınar'a,

Doktora eğitimine başlama konusunda beni yüreklendiren, gerek ders dönemimde gerek tez aşamasında her daim desteğini hissettiren, tezimin özellikle istatistik kısmında büyük katkı veren, güler yüzüyle hep olumlu mesajlar veren, çok sevdiğim Hocam Prof. Dr. Hülya Ellidokuz'a,

Fizyoloji konusunda bilimsel ve akademik eğitimime büyük katkı sağlayan değerli Hocam Doç. Dr. Ayfer Dayı'ya,

Kıymetli öneri ve deneyimlerini paylaşarak yol gösteren Fizyoloji Anabilim Dalı eski başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Abdullah Aslan'a, Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Tecrübelerini ve değerli zamanlarını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan başta Dr. Gizem Çalıbaşı Koçal olmak üzere laboratuvarında çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz arkadaşlarıma,

Yardımlarını esirgemeyen, içtenlikle her zaman yapıcı ve çözüm odaklı olan Sağlık Bilimler Enstitüsü öğrenci işleri biriminden Beyhan Gürkan, Elif Polattürk, Neslihan Artunç, Fulya Küçük ve Meltem Çakaray'a,

Hayatımın her anında olduğu gibi doktora eğitimim sürecinde hep yanımda olan, varlığıyla yolumu aydınlatan eşim Dr. Bekir Pakdemirli'ye ve ders çalışırken bana anlayış ve sabır gösteren evlatlarım Burak, Emir ve Mete'ye

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Ahu PAKDEMİRLİ

İzmir, Ağustos 2018

## ÖZET

Ahu PAKDEMİRLİ

**Yazışma adresi:** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

### **Yara İyileşme Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Differansiyasyonunda Folik Asit Etkisi**

Mezenkimal kök hücreler (MKH) yetişkin dokularından izole edilebilen stromal kök hücrelerin heterojen alt kümesi olup erişkin tip kök hücredir. MKH hem mezodermal hücreler hem de diğer embriyonik hattaki hücreler için farklılaştırıcı olabilir. Stromal kökenli olmalarından dolayı destek hücresi özelliğini taşırlar; dayanıklı ve farklı alanlarda kullanım potansiyeli yüksek hücrelerdir. Çalışmalar, nakledilen MKH'lerin etkilerini farklılaşma özellikleri aracılığıyla veya doku fonksiyonlarını geri getiren ve bağışıklık hücrelerini düzenleyen moleküllerin salınımı aracılığıyla uyguladığını göstermektedir. *In vivo* uygulamalar sonrası MKH'lerin periferik toleransı indüklediği ve hasarlı hücrelere göç ettiği ve hasarlı alanda pro-enflamatuar sitokinlerin salınmasını önlediği ve hasar görmüş hücrelerin hayatta kalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir. Doku yenilenmesi ve onarımında bir diğer önemli faktör olan folik asit, hem yapı taşı moleküllerin sentezindeki rolü hem de differansiyasyon üzerine etkileri nedeniyle araştırılmaktadır. Bu çalışmada yara iyileşme modelinde mezenkimal kök hücre differansiyasyonunda folik asidin etkisi araştırılmıştır. HUVEC hücre hattı ile oluşturulan yara iyileşme modelinde folik asit ve inhibitörleri, MKH salgısal faktörleri kullanılarak doku yenilenmesi değerlendirilmiştir. Yara iyileşme hızı gerçek zamanlı canlı hücre görüntüleme sistemi ile hücre çoğalma fonksiyonları gerçek zamanlı hücre proliferasyon yöntemi ile ölçülmüştür. Folik asidin hücre proliferasyonunu arttırıcı etkisi MKH kültür ortamına salınan salgısal faktörlerce potansiyalize edilmiştir. Folik asit, yara iyileşme hızını arttırmıştır. MKH salgısal faktörleri bu artışı ilk altı saatlik dönemde potansiyalize etmiştir. Bu çalışmada mezenkimal kök hücrelerin folik asit ile birlikte ko-kültürü sonucu ortama salgıladıkları faktörlerin endotel hasarını iyileştirme kapasiteleri *in vitro* yara iyileşme modelinde araştırılmıştır. MKH doku yenilenmesi ve

iyileşme süreçlerinde yalnızca destek hücre fonksiyonları ile değil, differansiyasyonun salgısal fonksiyonlar üzerindeki etkisiyle de katkı sağladığı ve bu katkının folik asidin doku yenilenmesi üzerine olan etkisini güçlendirdiği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yara iyileşmesi, mezenkimal kök hücre, folik asit, folik asit inhibitörleri



## ABSTRACT

Ahu PAKDEMİRLİ

**Corresponding address:** Dokuz Eylül University School of Medicine Department of Physiology  
Izmir.

### **Effect of Folic Acid on Mesenchymal Stem Cell Differentiation in Wound Healing Model**

Mesenchymal stem cells (MSC) are adult type stem cell where the heterogeneous subset of stromal stem cells that can be isolated from adult tissues. MSC can be a differentiator for both mesodermal cells and other embryonic lines. Due to their origin as stromal, they carry the supporting cell feature and are resistant cells with high potency in different areas. Studies show that the effects of transplanted MSC are mediated through differentiation properties or by the release of molecules that regulate immune cells, restoring tissue function. After *in vivo* applications, it has been shown that MSC induce peripheral tolerance and migrate to damaged cells and prevent the release of damaged area pro-inflammatory cytokines and promote the survival of damaged cells. Folic acid, another important factor in tissue regeneration and repair, has been questioned in the literature due to its role in the synthesis of building block molecules and its effects on differentiation. In this study, the effect of folic acid on mesenchymal stem cell differentiation was investigated in the wound healing model. In the wound healing model generated by the HUVEC cell line, tissue regeneration was assessed using folic acid and its inhibitors, MSCs secretory factors. The wound healing rate was measured by a real-time live cell imaging system and cell proliferation functions were measured by real-time cell proliferation. Increasing effect of folic acid on cell proliferation. MSH epidemic factors potentiate this increase during the first six hours. In this study, endothelial damage-enhancing capacities of factors that mesenchymal stem cells secreted co-culture endothelial with folic acid were investigated in an *in vitro* wound healing model. It has been shown that MSCs contribute not only to support cell functions but also to the effect of differentiation on the secretory functions in tissue

regeneration and healing processes, and this contribution potentiates the effect of folic acid on tissue regeneration.

**Key Words:** Mesenchymal stem cell, wound healing, folic acid, cell differentiation





## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

### 1.1. Problemin Tanımı

Mezenkimal kök hücreler (MKH) birçok yetişkin dokularından izole edilebilen stromal kök hücrelerin heterojen alt kümesi olup erişkin tip kök hücredir. MKH hem adipositler, kondrositler ve osteositler gibi mezodermal hattaki hücreler hem de diğer embriyonik hattaki hücreler için farklılaştırıcı olabilir (1). Stromal kökenli olmalarından dolayı destek hücresi özelliğini taşırlar ve birçok dokudan elde edilebilerek sayıca çoğaltılan, dayanıklı, farklı alanlarda kullanım potansiyeli yüksek hücrelerdir (2). MKH, doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi hücreleri ile etkileşerek birçok efektör fonksiyonlarının modülasyonuna neden olur. MKH doğası belirsiz olmasına rağmen, klonal olmayan stromal kültürler tedavi amaçlı MKH kaynağı olarak kullanılmaktadır (3). Preklinik ve klinik çalışmalar, nakledilen MKH'lerin etkilerini farklılaşma özellikleri aracılığıyla veya doku fonksiyonlarını geri getiren ve bağışıklık hücrelerini düzenleyen moleküllerin salınımı aracılığıyla uyguladığını göstermektedir. *In vivo* uygulamalar sonrası MKH'lerin periferik toleransı indüklediği, hasarlı hücelere göç ettiği, hasarlı alanda pro-enflamatuar sitokinlerin salınmasını önlediği ve hasar görmüş hücrelerin hayatta kalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (4).

Mezenkimal kök hücreler uygun mikro çevre koşullarında öncelikle bağ dokusu olmak üzere değişik hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeline sahiptir. *In vitro* koşullarda uygun uyarılarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerinin olduğu ve hematopoetik stroma oluşturabildikleri, ayrıca MKH'lerden pankreas beta hücreleri, hepatosit, endotel ve epiteloid hücelere dönüşüm olduğu gösterilmiştir (5). MKH'ler başka bir dokuda hasar oluşması durumunda diğer dokuya geçer ve bu dokuda oluşan hasarı düzeltmeye ve onarmaya başlar (6, 7).

Folik asit; sağlık, büyüme ve gelişme için eksojen alımı gerekli olan B vitamini kompleks grubunda yer alan suda çözünen bir vitamindir. DNA bazları ve diğer gerekli biyomoleküllerin sentezindeki tek karbon vericileri için ko-faktörlerin prekürsörü olarak folik

asit gereklidir (8). Doku yenilenmesi ve onarımında bir diğer önemli faktör olan Folik asit hem yapı taşı moleküllerin sentezindeki rolü hem de differansiyasyon üzerine etkileri nedeniyle literatürde araştırılmaktadır (9). Folik asidin differansiyasyon (farklılaşma) üzerine olumlu etkisi bilinmektedir. Differansiyasyon köken alınan dokuya morfolojik olarak veya işlev olarak benzeme özelliği olarak tanımlanmaktadır. Folik asit, DNA metiltransferazlar aracılığıyla nöral kök hücrelerin nöronlara differansiyasyonunu indüklemektedir, kök hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (10). Folik asit, DNA replikasyonu ve onarımı, metilasyon, nükleotidlerin ve bazı amino asitlerin sentezi gibi pek çok metabolik işlevde görev almaktadır. Folik asit molekül yapısında formil, metil, metilen, pteridin, p-amino benzoik asit (PABA) ve glutamik asit bulunmaktadır. Folik asit alımı yetersizliğinde ise megaloblastik anemi, büyüme geriliği ve nöral tüp defektleri görülmektedir. Bu çalışmada mezenkimal kök hücrelerin folik asit ile birlikte ko kültürü sonucu ortama salgıladıkları faktörlerin endotel hasarını iyileştirme kapasiteleri *in vitro* yara iyileşme modelinde araştırılmıştır.

## 1.2. Araştırmanın Amacı

Folik asit ve mezenkimal kök hücrenin yara iyileşmesine olumlu etkisi vardır. Bu çalışmanın amacı yara iyileşme modelinde mezenkimal kök hücre differansiyasyonunda folik asit etkisini araştırmaktır. Bu bağlamda mezenkimal kök hücrelerin folik asit ile birlikte ko kültürü sonucu ortama salgıladıkları faktörlerin endotel hasarını iyileştirme kapasiteleri *in vitro* yara iyileşme modelinde araştırılmıştır.

Bu kapsamda yürütülen çalışmada aşağıdaki hedefler üzerine odaklanılmıştır:

1. Folik asit verilmeden sadece mezenkimal kök hücrenin salgısal faktörlerinin yara iyileşmesinde etkinliğinin görülmesi.
2. Folik asidin farklı dozlarının yara iyileşmesinde etkinliğinin gösterilmesi; folik asit inhibitörleriyle bu etkinin inhibe edildiğinin görülmesi.
3. Folik asidin mezenkimal kök hücre farklılandırılması sürecinde MKH kaynaklı faktörler (MDFs) üzerine etkisi ile yara iyileşmesinde etkinliğinin görülmesi.

### **1.3. Araştırmanın Hipotezleri**

Mezenkimal kök hücre differansiyasyonunda folik asidin etkisiyle oluşan salgısal faktörlerin yara iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmamızın hipotezi: ‘Folik asit ve mezenkimal kök hücre salgısal faktörlerinin yara iyileşmesine olumlu etkisi var mıdır?’



## 2. GENEL BİLGİLER

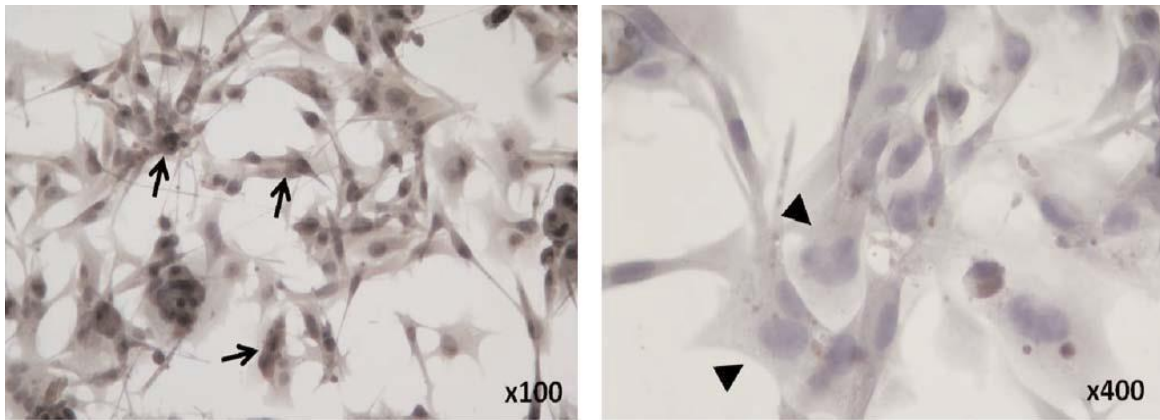
### 2.1. Yara İyileşmesi

Normal yara iyileşmesi, hemostazdan enflamasyona, organize doku rejenerasyonuna kadar giden karmaşık, ancak çoklu parametreler tarafından düzenlenen bir olaylar dizisidir. Doku hasarı, beraberinde nötrofiller ve makrofajlar gibi proinflatuar sitokin üreten hücrelerin infiltrasyonu ile karakterize edilen iyileşme sürecini başlatır, bunu ekstraselüler matriks (ECM) oluşturan fibroblastların gelmesi ve yeni doku formasyonunun oluşumu izler. Bununla birlikte, en iyi koşullar altında bile, bu süreç tipik olarak fibrozis veya skar oluşumu ile sonuçlanabilir ve doku iyileşmesinin karmaşık doğası göz önüne alındığında, klinik kararları ve sonuçları etkileyebilecek çok sayıda adım vardır. Her yıl çeşitli kusurları gidermek için milyonlarca rekonstrüksiyon prosedürü gerçekleştirilmektedir. Endotel gibi özelleşmiş doku hasarlarının tedavisi ve önlenmesi de ayrıca klinik öneme sahiptir. Geliştirilen modern tedavi yöntemlerine rağmen kronik yaraların %50'sinden fazlası tedaviye dirençli kalmaktadır (4). Kronik yaralar, modern tıpta büyük bir sorun olmaya devam etmektedir ve sadece fiziksel ve zihinsel sağlığı değil, aynı zamanda verimliliği, uzun vadeli morbidite ve sağlık harcamalarını da etkileyen önemli bir yük oluşturmaktadır. Bu nedenle doku iyileşmesinin fizyolojisini anlamaya yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır (10).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yara iyileşmesi ile ilgili çeşitli kök hücreleri bildirilmiştir, örn. deri kaynaklı öncü hücreler (SKP'ler), epidermal kök hücre (EpSC'ler), amniyon kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AMSC'ler), sinoviyum mezenkimal kök hücreler (SMSC'ler), kemik iliğinden türetilmiş kök hücreler (BMSC'ler) ve adipoz türevli kök hücreler (ASC'ler). Ancak, araştırmacılar, MKH'lerin avantajlarından dolayı kullanımı konusunda mutabakata varmışlardır. MKH'ler, dokuların çoğuna yol açma kabiliyetleri ve organlarda yara iyileşmesinde rollerinden dolayı artan bir ilgi konusu olmuştur (11).

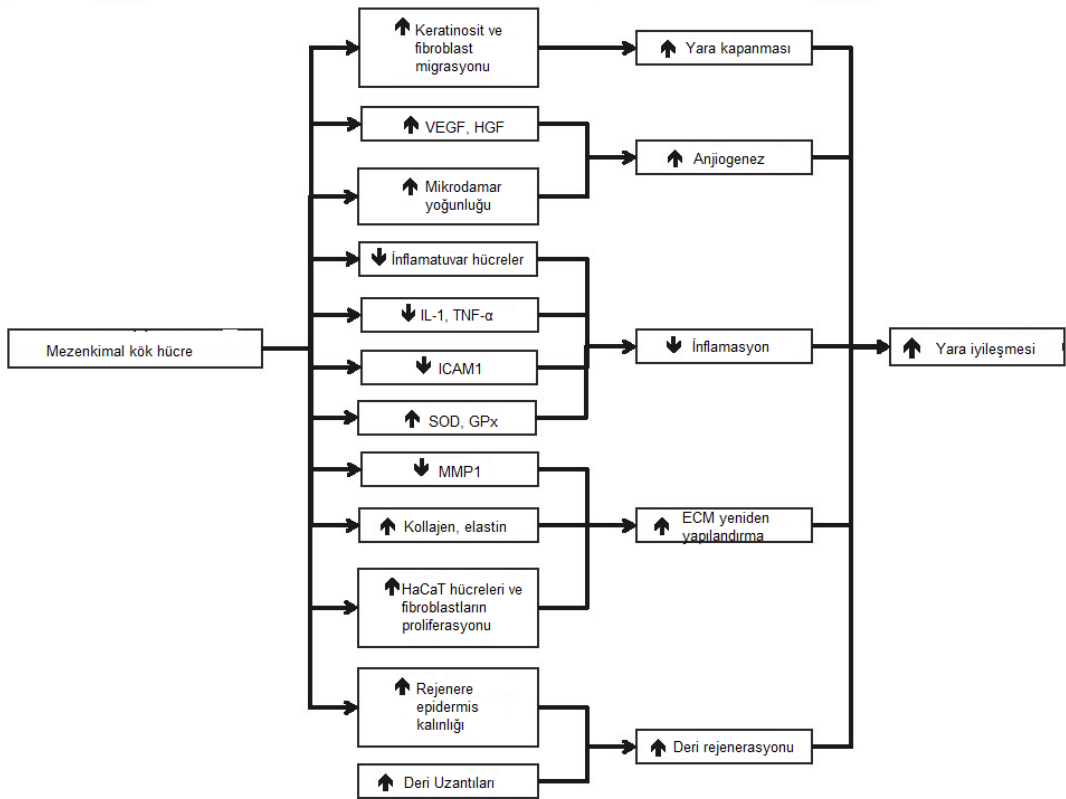
## 2.2. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücreler Şekil 1' de görüleceği gibi (multipotent mezenşimal stromal hücreler olarak da bilinir) kendini yenileme ve çok-soylu farklılaşma kapasitesine sahiptir ve yara iyileşmesini artırma yetenekleri iyi gelişmiştir. Parakrin etkileşimleri ile hareket eden MKH'ler, yara kapanmasını hızlandırır, anjiyojenezi artırır, yara iltihabının çözünürlüğünü teşvik eder, hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesini olumlu bir şekilde düzenler, normal doku mimarisi ve işlevi ile yenilenmesini teşvik eder. Mezenkimal kök hücreler, kendini yenileme ve osteoblastlar, adipositler, kondrositler, tenositler ve miyositler gibi çoklu doku oluşturucu hücre soylarına farklılaşma gösterme kabiliyeti ile karakterize edilir (12). Kemik iliği, adipoz doku ve umbilikal kord dahil olmak üzere bir dizi dokudan elde edilebilen MKH'ler, CD44 +, CD73 +, CD90 + ve CD105 + dahil olmak üzere yüzey CD işaretlerinin ifadesi ile karakterize edilir ve hematopoetik hücrelerden CD34, CD45, CD14 ve HLA-DR negatif olmaları ile ayrılırlar.



Şekil 1. MKH'lerde Stro-1 ve CD45'in immünohistokimya ile boyanması. MKH'ler, Stro-1 (a) ile immüno-pozitif iken, CD45 boyaması negatif (b) olarak görülmektedir. Oklar: immünopozitif hücreler, oklar kafaları: immünonegatif hücreler. Büyütme  $\times 100$  a ve  $\times 400$  b de. [Bu şekil, [www.anatomy.org.tr](http://www.anatomy.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyondan alıntılanmıştır].

Yara iyileşmesi, hücre göçü, iltihaplanma, anjiyogenez, granülasyon dokusu oluşumu, yeniden epitelizasyon ve ECM yeniden modellenmesi gerektiren karmaşık bir süreçtir. MKH'lerin bu süreçte aktif bir rolü vardır ve MKH'lerin terapötik uygulamasının yara iyileşmesini arttırdığı ve iyileştirdiği gösterilmiştir. Şekil 2'de ayrıntılandırıldığı gibi, MKH'lerin de immünomodülatör, onarıcı olduğu gösterilmiştir ve parakrin sinyalleme yoluyla oluşan rejeneratif etkilerinin, büyük terapötik potansiyeli tartışılmaktadır (13).



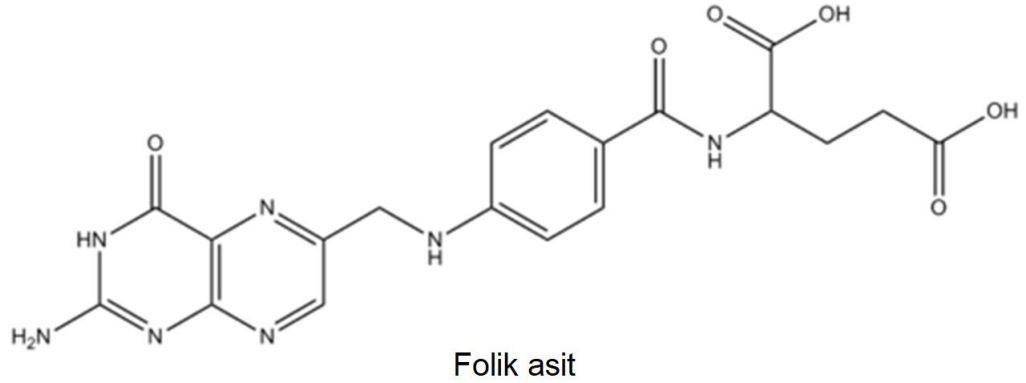
Şekil 2. Mezenkimal kök hücreler tarafından yönlendirilen yara iyileşmesi. Bu, yara kapanmasını hızlandırmayı, angiogenezi arttırmayı, yara inflamasyonunun azalmasını kapsar. Hücre dışı matriksin (ECM) yeniden modellenmesini pozitif olarak düzenler ve normal cilt mimarisinin ve işleyişinin rejenerasyonunu uyarır. Bu etkilere parakrin sinyalleme aracılık eder. GPx glutatyon peroksidaz, HaCaT immünize insan keratinosit, HGF hepatosit büyüme faktörü, ICAM1 interselüler adezyon molekülü 1, IL-1 interlökin-1, MMP-1 matriks

metalloproteinaz-1, SOD süperoksit dismutaz, TNF- $\alpha$  tümör nekroz faktörü-alfa, VEGF vasküler endotelyal büyüme faktörü (14).

MKH'ler pek çok fonksiyonları ile yara iyileşmesine katkıda bulunurlar. Araştırmamız kapsamında, yara iyileşme sürecinde differansiye olarak sürece katılan MKH'lerin ortama salgıladıkları faktörlerin rolü incelenmektedir. MKH'ler tarafından salgılanan düzenleyici ve trofik faktörler, çok sayıda büyüme faktörünü, sitokinleri ve kemokinleri içerir ve MDFs olarak bilinirler. Bu faktörlerin, fizyolojik değişiklikler (hipoksi veya anoksi), küçük molekül uyarımı, sitokin tedavileri ve strese cevap verdiği gösterilmiştir (15).

### 2.3. Folik Asit

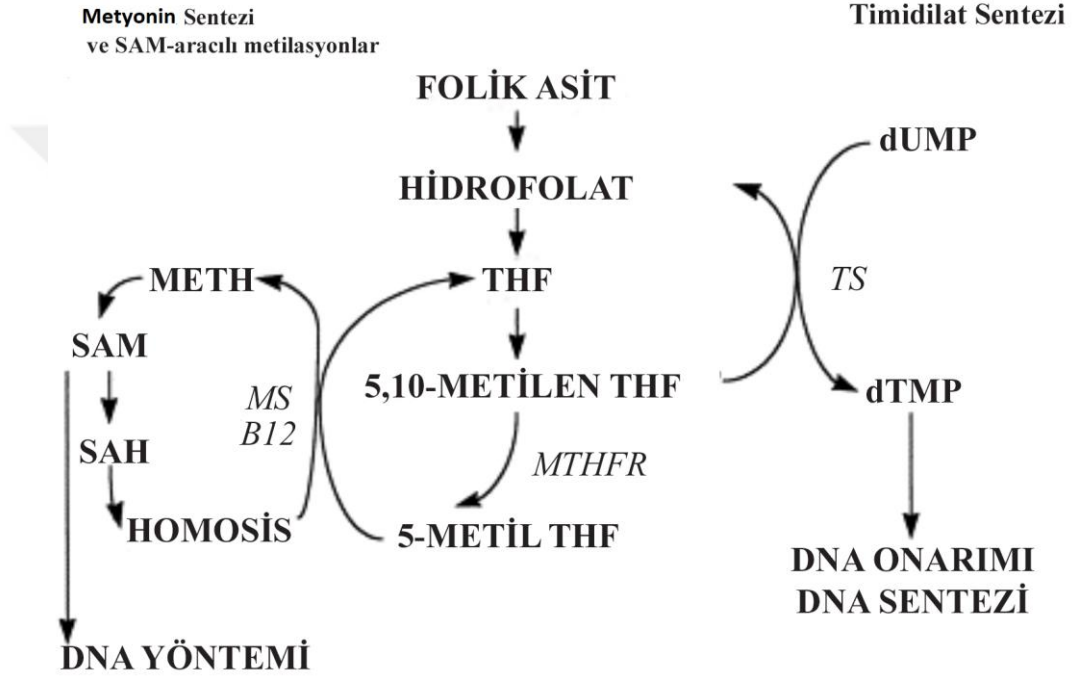
Differansiyasyon ve yara iyileşmesinde rolü olduğu bilinen önemli bir faktör de folik asittir (Şekil 3). Folik asit DNA bazlarının sentezi için gereklidir (16).



Şekil 3. Folik asit molekülü.

Hwank ve arkadaşları hücre morfolojisini inceleyerek folik asidin myoblastların çok çekirdekli mikrotübüllere füzyonunu ve myojenik differansiyasyonunu artırdığını göstermişlerdir (17). Folik asit tedavisi gen ekspresyonunda hücre türüne bağlı değişiklikleri

uyarır (18). Wei ve arkadaşlarının çalışmasında ise folik asidin fare kök hücre pluripotensini sürekli kıldığı gösterilmiştir (19).



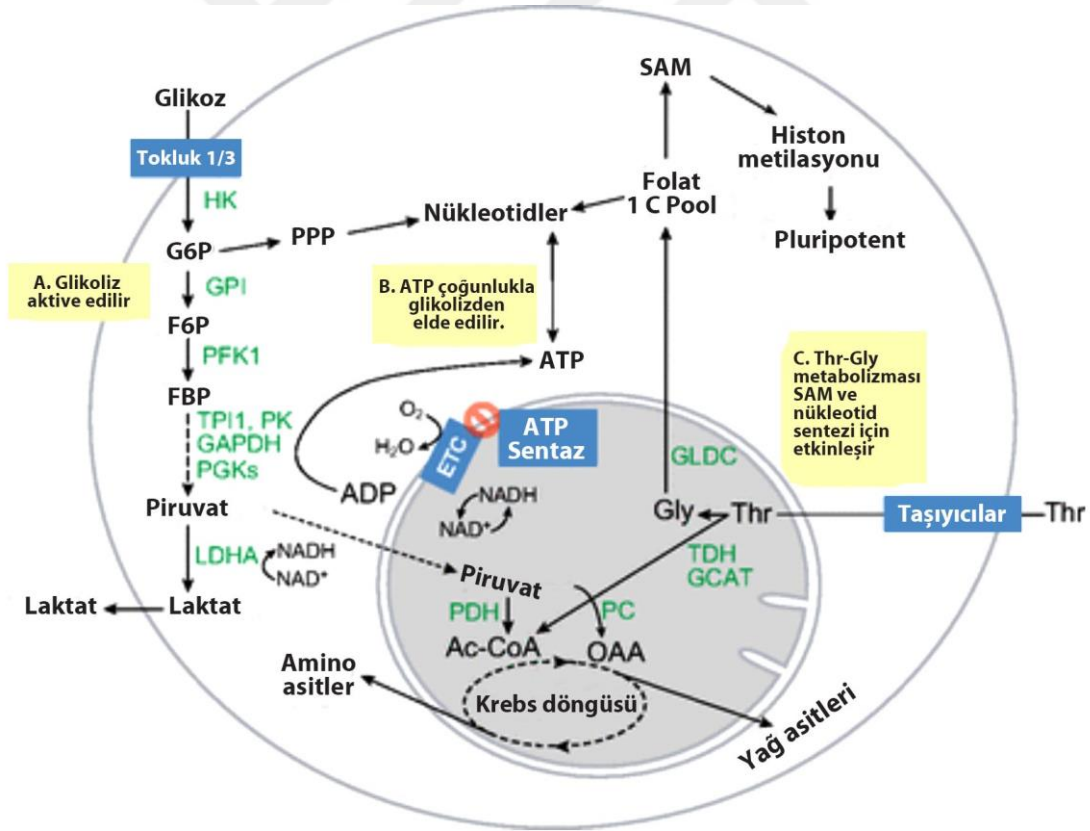
Şekil 4. Folik asit metabolizması

Folik asit Şekil 4’de gösterildiği gibi DNA’ya metil grubu sağlayarak DNA sentezini ve DNA metilasyonunu etkileyebilen bir kanser önleyicidir (20). Aynı zamanda folik asit birçok metabolizma sürecinde önemli rol oynar ve kardiyovasküler, zihinsel hastalıklar, kanser ve doğum kusurlarına karşı korunmaya yardımcı olabilir. Literatürde folik asidin nöral tüp üzerine etkileri (21, 22, 23) ve kanser önleyici etkilerine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (24).

Folik asit (folat, pteroylglutamic asit veya vitamin B9), pteridin halka yapısı ve / veya glutamik asit kalıntılarının sayısı ile üretilen bir grup kimyasal yapı olarak bilinen, vücut



sağlığı, büyüme ve gelişme için gerekli suda çözünür B vitaminidir. Folik asidin hematopoetik sistemle ilişkili klinik etkileri uzun zamandır bilinmektedir. Yeni kanıtlar özelleşmiş doku büyümesi ve gelişimini de içerdiği yönündedir. Çalışmalar folik asidin kök hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (25). Ancak, bu klinik sonuçların temel mekanizmaları hala belirsizliğini korumaktadır. Öncül çalışmalar, folik asidin hücrelerdeki enflamatuar proteinlerin ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını ve hipoksi koşullarında  $Ca^{2+}$  aşırı yüklenmesini önlediğini, differansiyasyonu yönettiği bilinen Notch1 yolağında mRNA ve protein ekspresyonunu etkin şekilde düzenlediğini ve hücreler üzerinde önemli koruyucu etkilere neden olduğunu göstermiştir (26). Şekil 5'te folik asidin kök hücre metabolizmasında SAM üzerinden hücre artışı ve kök hücre differansiyasyonuna olan katkısı görülmektedir.



Şekil 5. Pluripotent kök hücrelerde metabolizma.

(A) GLUT1 / 3 ekspresyonunda artış ile glikoz akışı artar ve heksokinaz (HK) ve fosfofruktokinaz 1 (PFK1) enzimleri glikolitik akışı keskin bir şekilde arttırmak için aktive olur. Sonuç olarak, nükleotit sentezi için pentoz fosfat yoluna (PPP) akış artar.

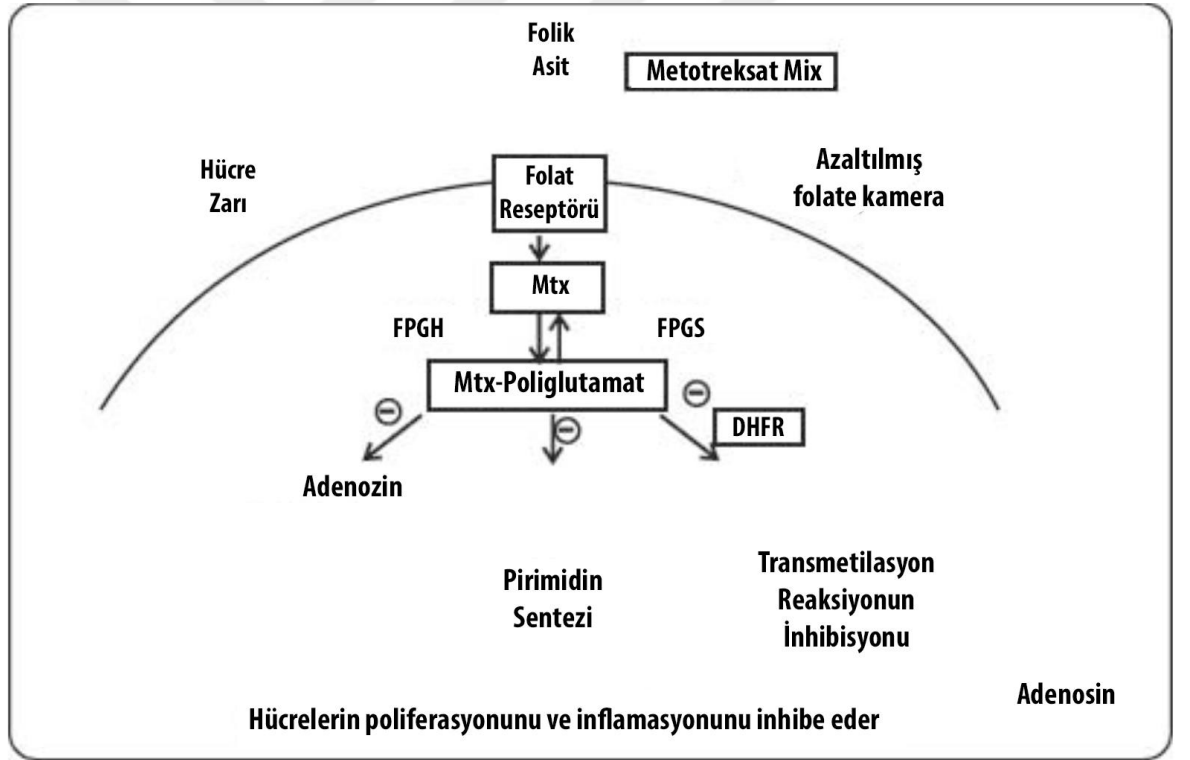
(B) ATP sentezi, glikolitik fosfogliserat kinazlar (PGK) ve piruvat kinazlar (PK) tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlara daha fazla bağımlıdır ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETC) tarafından O<sub>2</sub> tüketiminden ayrıştırılır.

(C) Treonin dehidrogenaz (TDH), glisin C-asetiltransferaz (GCAT) ve glisin dekarboksilazın (GLDC) aktivasyonu, S-adenosilmetionin (SAM) yakıt olan folat bir karbon (1C) havuzunu beslemek için Thr-Gly katabolizmasını ve pluripotensi ve proliferasyon korumak için nükleotid sentezini teşvik eder. Ac-CoA, asetil koenzim A; F6P, fruktoz-6-fosfat; FBP, früktoz-1,6-bisfosfat; G6P, glikoz-6-fosfat; GAPDH, gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz; GPI, glikoz-6-fosfat izomeraz; LDHA, laktat dehidrojenaz A; OAA, oksaloasetat; PC, piruvat karboksilaz; PDH, piruvat dehidrojenaz kompleksi; PK, piruvat kinaz; TP1, triosefosfat izomerazı (kaynak 27'den alıntılanmıştır).

## 2.4. Folik Asit İnhibitörleri

### 2.4.1. Metotreksat (MTX)

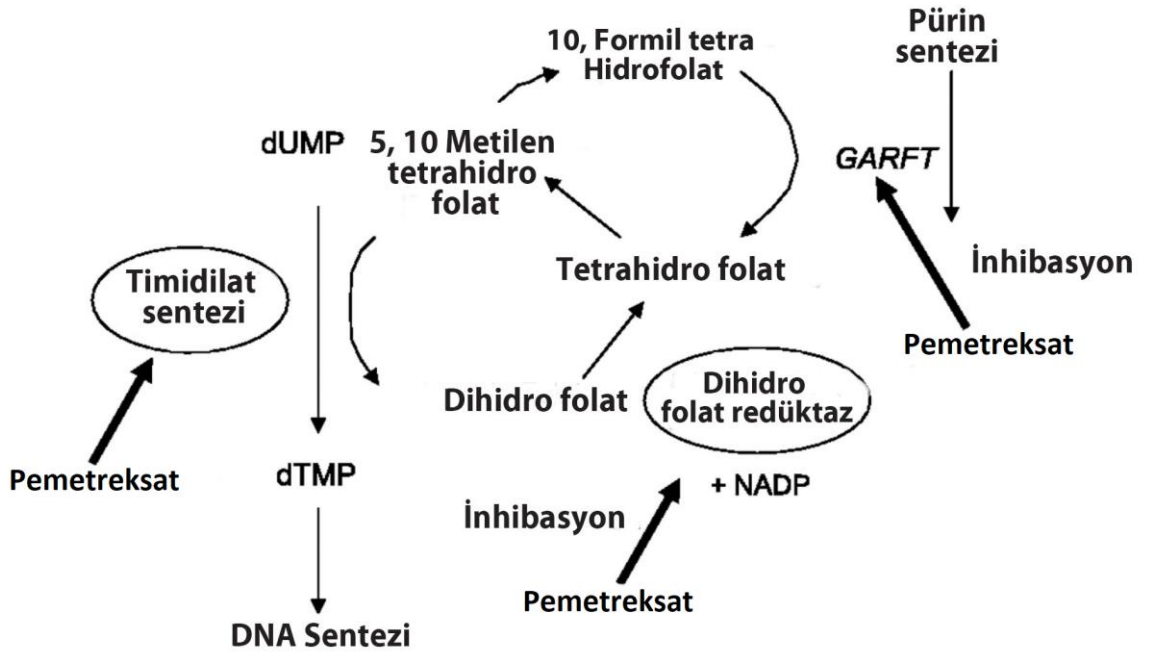
Metotreksat kimyasal yapısı, “4-Amino-10-methylfolic acid hydrate” olan bir “Antifolan hydrate”dir. Metotreksat, dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümünü katalize eden enzim olan dihidrofolat redüktazın (DHFR) allosterik inhibitörüdür. Şekil 6’da özetlendiği gibi pürin ve pirimidin sentezi için tetrahidrofolat gerekli olduğundan, metotreksat etkisi DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanır (28).



Şekil 6. Folik asit antagonisti metotreksat metabolizması

### 2.4.2. Pemetreksat (PTX)

Pemetreksat, kimyasal yapısı “N-(4- (2- (2-Amino-3,4- dihydro- 4-oxo-7 H-pyrrolo (2,3-d) pyrimidin- 5 yl) ethyl) benzoyl) glutamic acid sodium salt hydrate”olarak bilinmektedir. Şekil 7’de özetlendiği gibi folik asid metabolizmasının 3 enzimini de inhibe ederek folat metabolizmasını durdurur (29).



Şekil 7. Pemetreksat ile çoklu folat metabolizma enzimlerin inhibisyonu

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 Araştırmanın Tipi**

Bu çalışma *in vitro* deneysel bir araştırma olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı**

Bu çalışma Eylül 2013'de tez konusu belirleme ve literatür tarama ile başlamış; Ağustos 2018'de tez savunmasıyla sonlanmıştır. Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Moleküler Onkoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

#### **3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi:**

Çalışma *in vitro* yara modelinde yapılmış olup, örneklem alınmamıştır.

#### **3.4. Çalışma Materyali**

Bu çalışmada, HUVEC [umbilical vein/vascular endothelium/endothelial] ve Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells [Normal] hücre hatları kullanılmıştır. Hücre hatları, *DMSZ* ve *ATCC* 'den satın alınmıştır.

#### **3.5. Araştırmanın Değişkenleri**

Bu çalışmada endotel kaynaklı hasarın mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması ile giderilmesinde MDFs ve folik asidin etkisi araştırılmaktadır. MKH farklılaşmasının (farklılaşma protokolüne göre) folik asit etkisi ve folik asit etkisi olmaksızın doku ortamına salgıladığı MDFs olarak bilinen düzenleyicilerin endotel hasarını tamiri, *in vitro* yara iyileşmesi deneysel modelinde araştırılmıştır. Yara iyileşmesi hızı bağımlı değişken; folik asit, MKH bağımsız değişkendir.

### 3.6. Veri Toplama Araçları

#### 3.6.1. Kullanılan Malzemeler - Cihazlar

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 4 g/L glucose, 4.0 mM L-Glutamine) (Gibco by Life Technologies, Katalog no: 11965-092, Grand Island, NY, USA)
- Mesenchymal Stem Cell Basal Medium , 485 mL (Cat no: PCS-500-030, ATCC, USA)
- Essential 6™ Medium, 500 mL, (Catalog number: A1516401, Gibco™ USA.)
- HUVEC [umbilical vein/vascular endothelium/endothelial] hücre hattı
- Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells [Normal] hücre hatı
- Fötal sığır serumu (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Penisilin- Streptomisin (10,000U/ml) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, Katalog no: 15140-122, NY, USA)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (1X) ([-] kalsiyum klorür [-] Magnezyum klorür) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, USA)
- Mikropipet set (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Kimwipes (Kimtech Science Brand, Kimberly-Clark Worldwide, Inc, USA)
- 0.05% Tiripsin-EDTA (1X), Fenol-Kırmızı (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)
- 25cm<sup>2</sup> hücre kültür flaskı (MedSupply Partners, USA)
- 75cm<sup>2</sup> hücre kültür flaskı (MedSupply Partners, USA)
- 50 mililitre (ml) tüp (MedSupply Partners, USA)
- 15 ml tüp (MedSupply Partners, USA)
- Serolojik pipet-10 ml (MedSupply Partners, USA)
- Serolojik pipet-5 ml (MedSupply Partners, USA)
- Etanol (MedSupplyPartners, USA)
- Karbondioksit inkübatör (Thermo Scientific, USA)

- xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA)
- JuLI Br Live Cell Movie Analyser (NanoEnTek)

### 3.6.2. HUVEC Hücre Kültürü

HUVEC hücre hattı uygun hücre kültürü ortamlarında üretildi (37°C'de, %5'lik CO<sub>2</sub> , %10 FBS (fetal bovine serum) (Biochrom), %1 antibiyotik içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium low-glucose (L-DMEM 1 g/L glucose, 4.0 mM L-Glutamine) hücre besleyici normoksik inkübatör ortamda çoğaltıldı.

### 3.6.3. Kök Hücre Kültürü

BMSCs (Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell) hücreleri, Mesenchymal Stem Cell Basal Medium for Adipose, Umbilical and Bone Marrow-derived MSCs (ATCC® PCS-500-030™) ve Fetal bovine serum (%10) (Cat no: S0113, Biochrom GmbH, Germany), L-glutamin (4,5 mM) (Cat no: K0283, BIOCHROM AG, Germany), Penicilin/Streptomisin (Cat no: A2210, BIOCHROM , AG, Germany) 37°C'de 5% CO<sub>2</sub> içeren normoksik inkübatör ortamında çoğaltıldı.

### 3.6.4. xCELLigence İle Gerçek Zamanlı Hücre Büyümesi ve Çoğalması Deneyi

xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) hücre canlılık analizi için hücreler uygun besi ortamında çoğaltıldı. En az %80 konfluent olan hücreler kullanıldı. Plate düzeni tasarlanırken kontrol grubu, her bir bileşen ve konsantrasyon için E-plate 96 üzerinde 3 tekrar yapıldı ve her bileşen 7 farklı konsantrasyonda ölçüldü. Konsantrasyonlar ½ log seri seyreltmeyle hazırlandı. Negatif kontrol için en az 3 kuyucuk sadece ortam içerecek şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce xCelligence programı çalıştırılarak plate düzeni ve çalışma planı girildi. E-plate 96'nın her kuyucuğuna 100 µl hacimde hücre kültür ortamı eklenerek ve 30dk. oda sıcaklığında bekletildi. Cihazın kendi protokolünde olan arka plan

ölçümü yapıldı. Hücreler flask yüzeyinden kaldırılarak sayıldı ve gerekli hesaplamalar yapılarak hücre süspansiyonu hazırlandı. E-plate 96, inkübatör içindeki RT-CES bölümüne yerleştirilerek arka plan ölçümü yapıldı. E-plate 96 RT-CES bölümünden çıkartılarak ve hücre hattının ikilenme süresine bağlı olarak 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre içeren 100 µl ortam plate'e aktarıldı. E-plate 96 oda sıcaklığında 30 dk. bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanına çökmesi sağlandı. CI (cell index-hücre içeriği) değerlerine 48 saat boyunca her 15 dakikada bir kaydedildi. DMEM içeren kuyucuklar, öz direnç ana hattı ölçümleri için negatif kontrol olarak kullanıldı. Deney boyunca mikro kuyucukların son hacmi 200 µL olacak şekilde ayarlandı.

### **3.6.5. *In vitro* Yara Modeli**

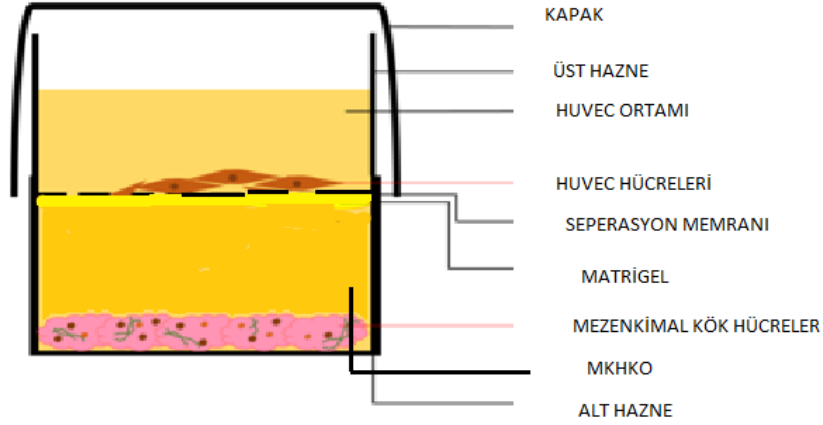
Hücreler  $10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plate'in kuyucuklarına ekildi. Konfluent hale geldiklerinde 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla çizilerek yara oluşturuldu. Belirlenen kimyasal konsantrasyonları kuyucuklara eklendi. Hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli ortamda inkübe edildi. JuLI Br, live cell movie analyser (NanoEnTek, Korea) kullanılarak 0, 24 ve 48. saatlerde yara kapanmasının bar çizgisi eklenmiş görüntüleri alındı. Yara kapanması miktarı ImageJ software 1.49 ile hesaplandı.

### **3.6.6. JuLI Br Live Cell Movie Analyser (NanoEnTek)**

JuLI Br canlı hücre görüntüleme ve analiz cihazıdır. Bu cihaz hücre göçü çalışmaları, hücre temelli optimizasyon çalışmaları, hücre kültürü kalite kontrolü, kök hücre gelişimi ve hücre proliferasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. JuLI Br ile minimum 30 saniye zaman ayarlı fotoğraf çekimi ve video hazırlama, otomatik hücre konfluens ölçümü yapılabilen ve gerçek zamanlı hücre büyüme eğrisi oluşturulabilmektedir.



### 3.6.7. Ko-Kültür Modeli



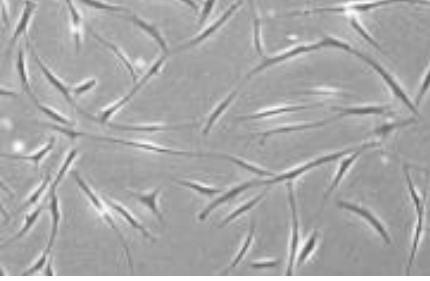
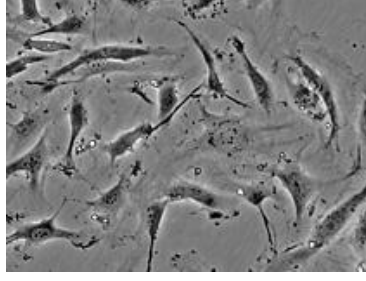
Şekil 8. HUVEC [umbilical vein/vascular endothelium/endothelial] hücre hattı ve BMSCs (Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell) hücreleri ile oluşturulan ko-kültür modeli.

HUVEC hücre hattı iki bölmeli kültür kuyucuğunda matrijel üzerine ekildi. Üst hazneye L-DMEM ortamı eklendi. Alt hazneye BMSC hücre hattı ekildi. Mezenkimal hücre ortamında çoğaltılan hücreler alt hazneye eklendikten sonra farklılaştırma protokolü uygulandı ve kültüre Essential medium 6 (Gibco) ile devam edildi. 37°C'de 5% CO<sub>2</sub> içeren normoksik inkübatör ortamında 48 saat boyunca çoğaltıldı. Deney değişkeni olarak folik asit, alt hazneye uygulandı. 48 saat sonunda alt hazne hücre kültür ortamı MDFs içeren Mezenkimal Kök Hücre Kültür Ortamı (MKHKO) olarak toplandı ve deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C derecede bekletildi. Bu ortamın farklı konsantrasyonları (% 12.5, 25, 50, 75 ve 100) HUVEC hücre hatlarında proliferasyon etkisi için test edildi. HUVEC hattında EC50 dozu % 25 olarak (50µL) saptandı. Yara iyileşmesi ve kombine etkilerde bu doz esas alındı.

### 3.6.8. ‘Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells’ Farklılaştırma Protokolü

Kök hücre kültüründe kullanılan basal ortamların aksine, Essential 6 Medium bFGF veya TGF $\beta$  içermez. Bu nedenle, Essential 6 Medium motor nöronlar dahil olmak üzere endodermal, mezodermal ve ektodermal soylardaki çeşitli hücre tiplerinin yönlendirilmiş farklılaşması için bir baz olarak kullanılır.

Uygulama Gibco protokülü esas alınarak uygulandı (30). Mezenkimal kök hücrelerin, unipotent hücrelerle ko-kültürü sonrasında transdiferansiyasyonu esasına göre HUVEC hücre hattı ile ko-kültürü yapıldı (31, 32) Şekil 8 de açıklanan deney ortamında alt haznede essential 6 hücre ortamı kullanıldı. 48 saat sonrasında alt haznede bulunan kök hücreler, inverted mikroskop altında gözlemlendi. Endotelial karakter kazanımı, diagonal hücre şekli farklılaşması olarak değerlendirildi (Şekil 9).

“Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells” Basal hücre ortamı ile	“Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells” Farklılaştırma protokülü 48h
	

Şekil 9. Farklılaştırma protokolü mikroskop görüntüleri

### 3.6.9. Çalışma Grupları

#### 3.6.9.1. HUVEC hücre hattı ile oluşturulan proliferasyon deneyleri

Yara iyileşmesinin ilk komponenti hücre çoğalmasdır. HUVEC hücre hattı ile oluşturulan proliferasyon modelinde araştırma değişkenleri uygulanarak gerçek zamanlı hücre canlılık analizi yapıldı. Bu hücre hattı, normal hücre olmasına karşın 50-60 kez pasajlanabilen, kordon vasküler endotelinden çoğaltılmış sürdürülebilir bir hücre hattıdır. *In vitro* damar entoteli çalışmaları için en uygun model olarak kabul edilir (33). Deney her bir değişkenin, her bir konsantrasonu için en az 4 kuyucuk tekrarı ile gerçekleştirilmiştir.

#### Hücre Çoğalması Deneyi Çalışma Grupları:

##### Folik asidin etkisi

Grup 1: Kontrol (hücre büyüme ortamı)

Grup 2: Folik asit (2.5-100 $\mu$ M) arasında  $\frac{1}{2}$  log yedi konsantrasyon aralığında uygulanmıştır.

Grup 3: Metotreksat (folik asit antagosti) (0.25-20  $\mu$ M/ düşük doz etkisi) ve (125 $\mu$ M-2.5mM yüksek doz etkisi)  $\frac{1}{2}$  log yedi konsantrasyon aralığında uygulanmıştır.

Grup 4: Pemetreksat (folik asit metabolizma inhibitörü) (0.25-20  $\mu$ M düşük doz etkisi) ve (125 $\mu$ M-2.5mM yüksek doz etkisi)  $\frac{1}{2}$  log yedi konsantrasyon aralığında uygulanmıştır.

### MDFs etkisi

Grup 1: Kontrol (ko-kültür ortamında alt haznede yalnızca mezenkimal kök hücre bulunan ortam) EC50 dozu 50µL

Grup 2: Folik asit 2.5-100µM arasında ½ log yedi konsantrasyon aralığında uygulanmıştır.

Grup 3: Ko-kültür ortamında alt haznede folik asidin 2.5-100µM arasında 7 farklı konsantrasyonu için mezenkimal kök hücre ortamı (her kuyucuğa 50µL-toplam hacim 200µL) .

### **3.6.9.2 HUVEC hücre hattı ile oluşturulan yara modeli**

Yara iyileşmesinin ikinci komponenti yaranın kapanma hızıdır. Bu parametre hücrelerin hem çoğalması hem migrasyonuna bağlıdır. HUVEC hücre hattı ile oluşturulan *in vitro* endotel yara modelinde araştırma değişkenleri uygulanarak başlangıç (0. saat), 24. ve 48. saatlerde yara kapanması ölçüldü. Gerçek zamanlı hücre görüntüleme ile yara kapanma hızı değerlendirildi.

### Folik asit etkisi

Grup 1: Kontrol (hücre büyüme ortamı)

Grup 2: Folik asit (25µM) (hücre çoğalması deneylerinde EC 50 dozu)

Grup 3: Folik asit (25µM) + Metotreksat (folik asit antagosti) (Folik asidin ilgili dozunu %90 inhibe eden dozu 625 µM)

Grup 4: Folik asit (25µM)+ Pemetreksat (folik asit metabolizma inhibitörü) (Folik asidin ilgili dozunu %90 inhibe eden dozu 625 µM)

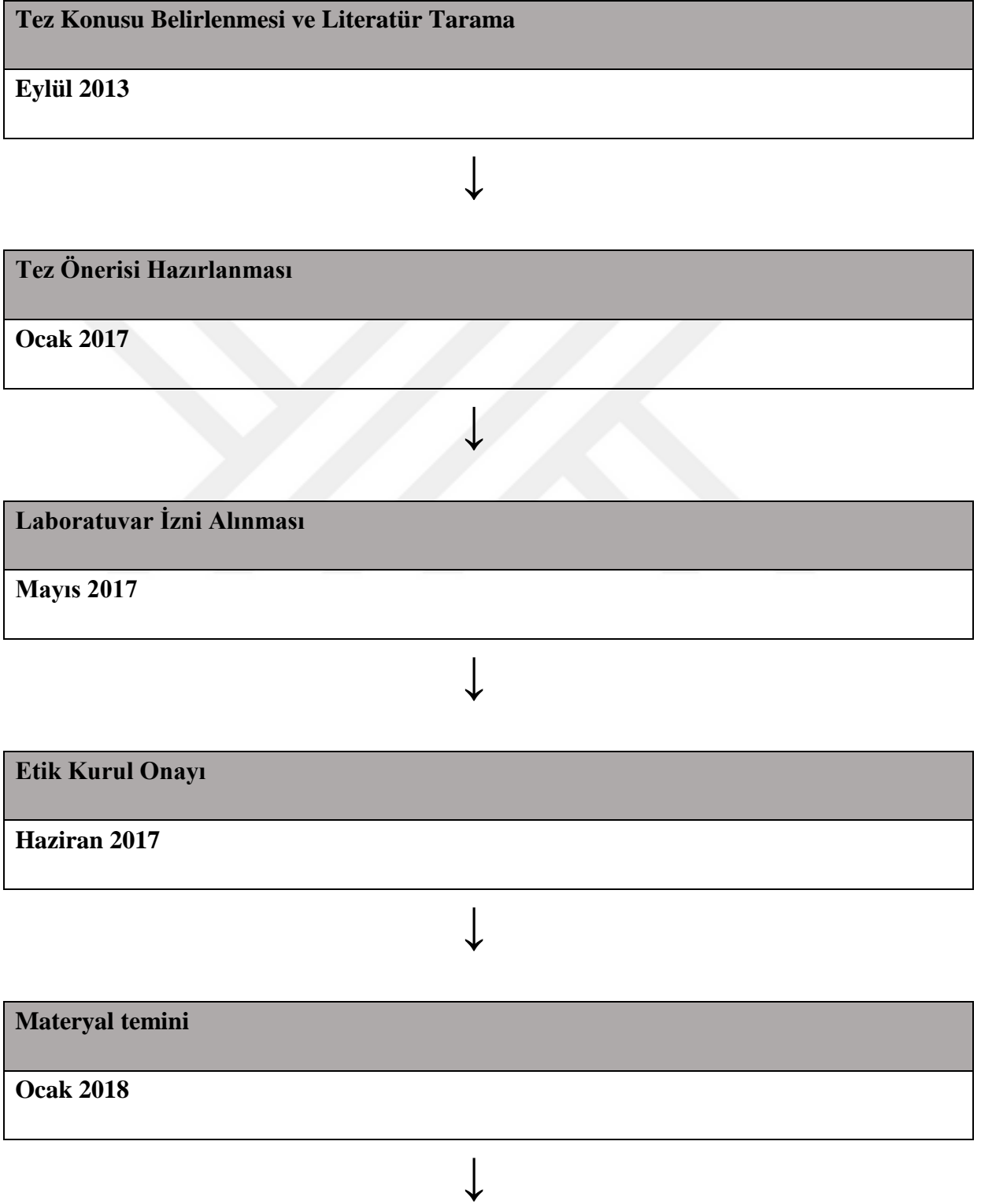
## MDFs etkisi

Grup 1: Kontrol (ko-kültür ortamında alt haznede yalnızca mezenkimal kök hücre bulunan ortam) EC50 dozu 50 $\mu$ L

Grup 2: Folik Asit (25 $\mu$ M) (hücre çoğalması deneylerinde EC 50 dozu)

Grup3: Ko-kültür ortamında alt haznede folik asidin (2.5-100 $\mu$ M) arasında 7 farklı konsantrasyonu için mezenkimal kök hücre ortamı (her kuyucuğa 50 $\mu$ L-toplam hacim 200 $\mu$ L)

### 3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



**Veri Toplaması**

**Şubat 2018**



**Verilerin Değerlendirilmesi**

**Mart 2018**



**Tez Yazımı**

**Haziran 2018**



**Tez Savunması**

**Ağustos 2018**

### **3.8. Verilerin Değerlendirilmesi**

#### **3.8.1. İstatiksel Yöntem(ler):**

Veri analizinde SPSS.20.0 istatistik analiz programı kullanıldı. İki grup arasındaki farklılıkların analizi için Mann-Whitney U testi uygulandı. Gerçek zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCelligence Real Time Cell Analyzer, ACEA, Biosciences, San Diego, CA) kullanılarak hücre artışı, folik asit ile inhibitörlerinin etkisi ölçüldü. Yara modelinde folik asit ve MKHKO için EC50 dozları, Folik asit inhibitörleri için IC90 dozları kullanıldı. EC 50 dozu aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Deneyin başındaki sıfır zamanı (time zero, (Tz)) kontrol (C), ve bileşiklerin bulunduğu konsantrasyonlarda yapılan ölçüm (Ti) değerleri kullanılarak artış oranı yüzde cinsinden ve EC50 değeri:  $[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 = +50$  formülü ile hesaplandı. p değeri <0.05 olarak kabul edildi.

### **3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları**

Çalışma yalnızca *in vitro* ortamda gerçekleştirileceği için; olası yan etki ve komplikasyon yoktur ve sonlandırma kriteri belirlenmemiştir. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF) hazırlanmamıştır. Etik sorun içermemektedir.

Araştırma değişkenlerinden MKHKO içeriğinin moleküler tanımlanması, yeterli bütçe kaynağı bulunamadığı için belirlenmemiştir. Ancak TUBİTAK 1002 kapsamında bir yeni proje ile değerlendirilecektir.

### **3.10. Etik Kurul**

Etik kurul onayı 08.06.2017 tarih ve 2017/15-23 sayısı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel olmayan Etik Kurulu tarafından verilmiştir.

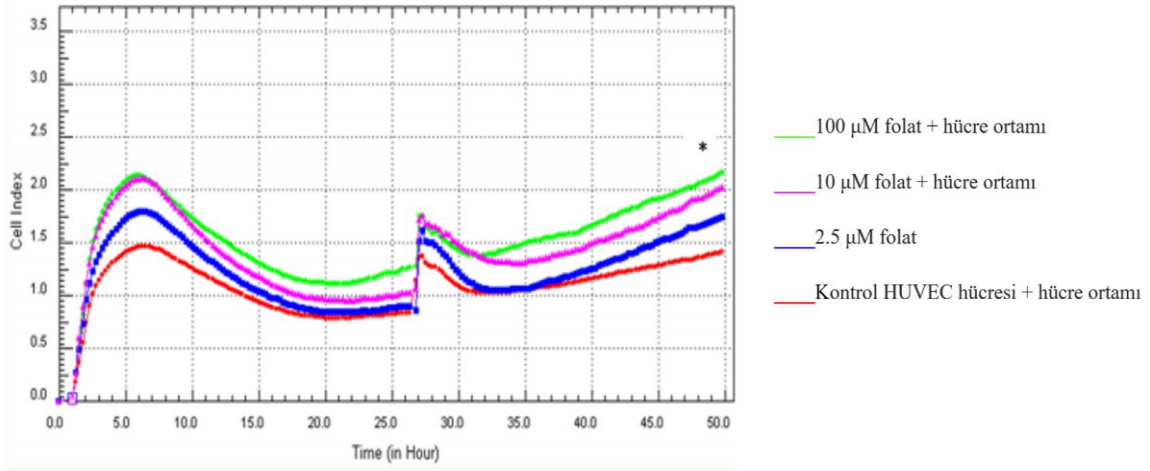


## 4. BULGULAR

### 4.1. HUVEC hücre hattı ile oluşturulan proliferasyon deneyleri

Yara iyileşmesinin ilk komponenti hücre çoğalmasdır. HUVEC hücre hattı ile oluşturulan proliferasyon deneylerinde folik asidin farklı konsantrasyonlarda hücre proliferasyonuna etkisi araştırılmıştır. Bu etkinin folik asitten kaynaklandığını göstermek için folik asidin iki farklı inhibitörü olan MTX ve PTX toksik olmayan dozları saptanmıştır.

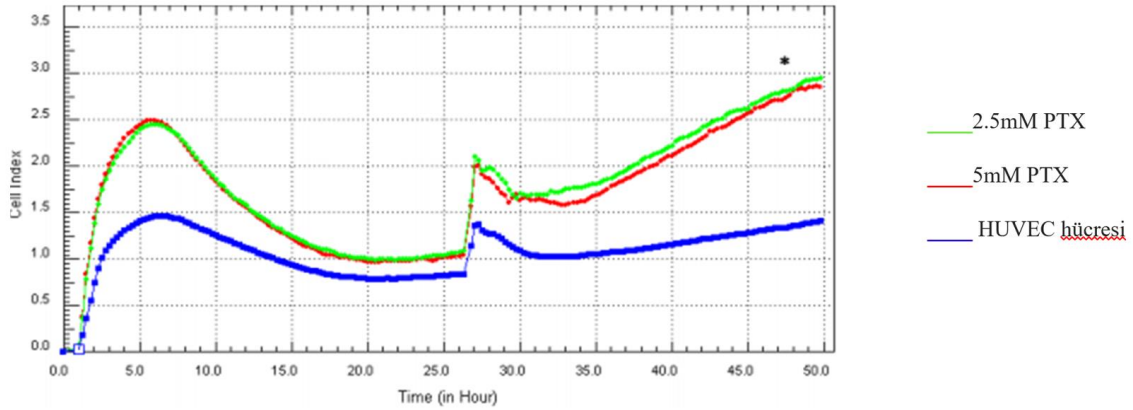
Folik asit tek başına HUVEC hücre hattında hücre çoğalmasını arttırdı. Folik asitin yedi farklı konsantrasyonu ile yapılan çalışmada (2.5-100 $\mu$ M), kültür ortamı ile büyütülen kontrol hücrelerine göre çoğalmayı %90 arttıran folik asit dozu (EC 90 dozu) 100  $\mu$ M olarak; EC 50 dozu 25  $\mu$ M olarak bulundu. Şekil 10'da 48 saat süresince kaydedilen hücre çoğalması, hücre indeksi (CI) olarak zamana göre grafiklenmiştir.



Şekil 10. Folik asit proliferasyon analizi. Folik asit (2.5-100 $\mu$ M) 7 konsantrasyon aralığında 48 saat süresince hücre proliferasyonları gerçek zamanlı ölçülmüştür. Hücre artışının elektriksel empedansında oluşturduğu değişim olan cell index (CI) olarak zamana karşı grafiği yapılmıştır.

\*Tekrarlayan ölçümler arasındaki trend değişim Mauchly'nin sferisite testi kullanılarak analiz edildiğinde 100 µM folat grubu kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.  $p < 0.05$  olarak alınmıştır.

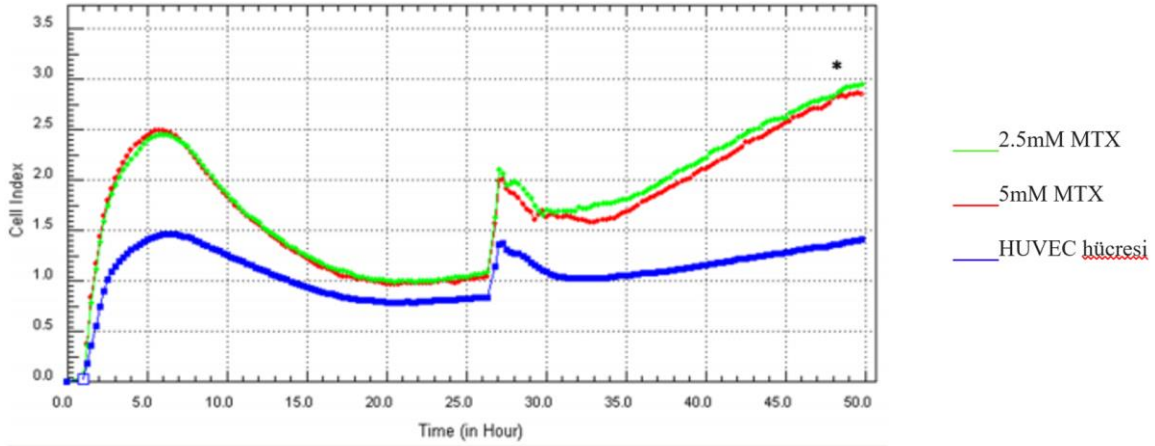
Folik asit inhibitörlerinin HUVEC hücre hattında toksik olmayan dozlarının saptanması amacı ile literatürde yer alan düşük ve yüksek dozları ile proliferasyon çalışması yapıldı (34,35). Her doz aralığında 7 farklı konsantrasyon ile deneyler yapıldı. Her iki inhibitör için HUVEC hücre hattında toksik olmayan en yüksek doz 5 mM olarak saptandı. Şekil 11, Pemetrexede'in HUVEC hücrelerinde toksik olmayan doz belirleme çalışmasını göstermektedir. Şekil 12, Metotraxede'in HUVEC hücrelerinde toksik olmayan doz belirleme çalışmasını göstermektedir.



Şekil 11. Pemetreksat (folik asit metabolizma inhibitörü) etkisi. PTX (0.25-20 µM düşük doz etkisi) ve (125µM-2.5mM yüksek doz etkisi) 7'şer konsantrasyon aralığında 48 saat süresince hücre proliferasyonları gerçek zamanlı ölçüldü. Kombine etki için HUVEC hücrelerinde toksik olmayan dozu seçildi

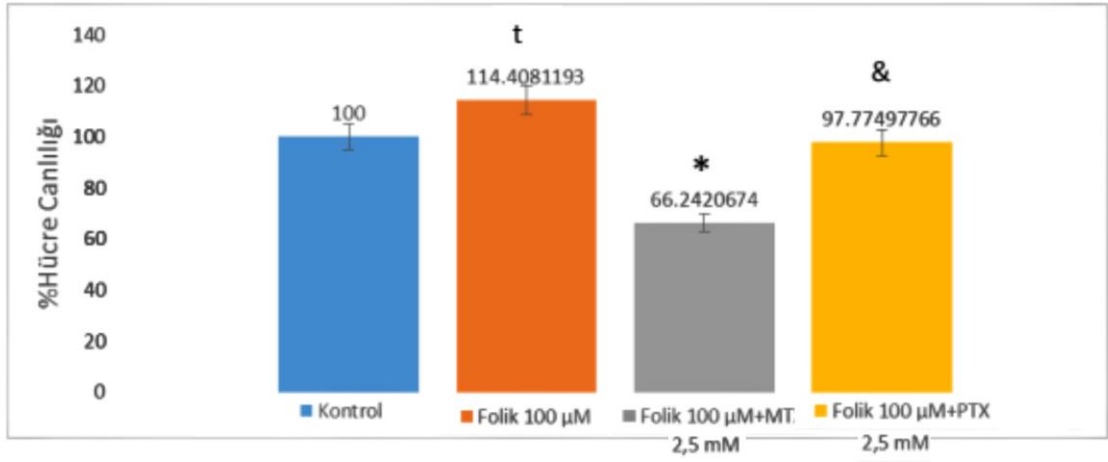
\*Tekrarlayan ölçümler arasındaki trend değişim Mauchly'nin sferisite testi kullanılarak analiz edildiğinde 5 ve 2.5mM PTX grubu kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.  $p < 0.05$  olarak alınmıştır

Folik asit HUVEC hücrelerinde proliferatif etki gösterdi. HUVEC hücre hattında PMX ve MTX ile kombine folik asit uygulamasında bu etki folik asid inhibitörleri ile bloke edildi. Şekil 13 HUVEC hücre hattı proliferasyon analizinde tek başına folik asidin etkisini ve spesifik inhibitörleri ile bu etkinin engellenmesini özetlemektedir.



Şekil 12. Metotreksat (folik asit antagonisti) etkisi. MTX (0.25-20  $\mu$ M düşük doz etkisi) ve (125 $\mu$ M-2.5mM yüksek doz etkisi) 7'şer konsantrasyon aralığında 48 saat süresince hücre proliferasyonları gerçek zamanlı ölçüldü. Kombine etki için Huvec hücrelerinde toksik olmayan dozu seçildi.

\*Tekrarlayan ölçümler arasındaki trend değişim Mauchly'nin sferisite testi kullanılarak analiz edildiğinde 5 ve 2.5 mM MTX grubu kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.  $p < 0.05$  olarak alınmıştır.



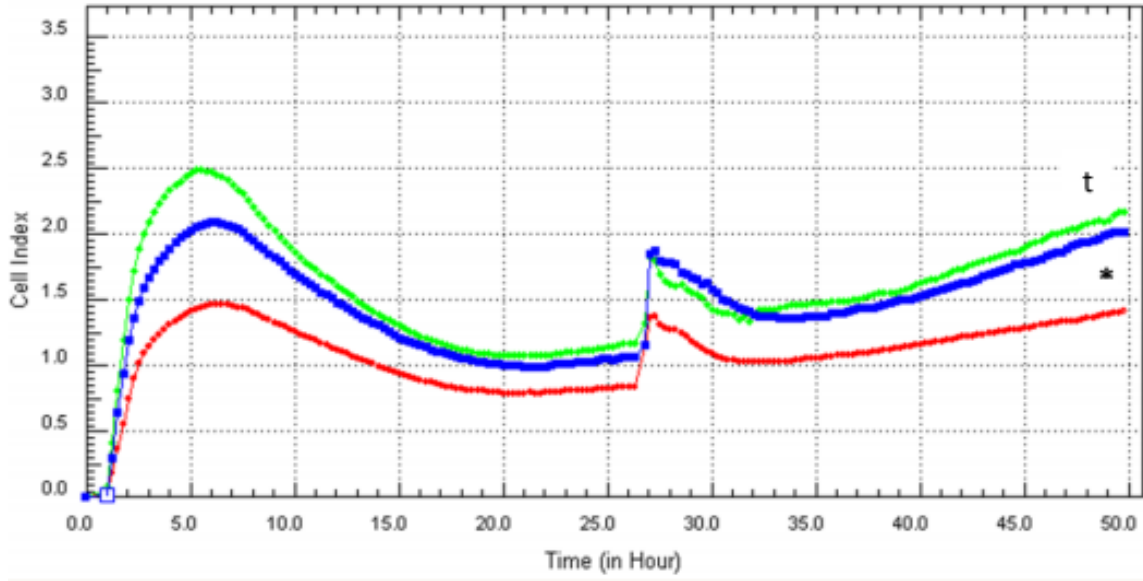
Şekil 13. HUVEC hücreleri üzerine folik asitin etkileri, doz yanıtları 48 saat sonuçları. Tekrarlayan ölçümler arasındaki trend değişim Mauchly'nin sferisite testi kullanılarak analiz edildi Multivariete analizi Pillai'nin trace testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  olarak alınmıştır.

t: kontrole karşı Folik asit grubu;

\*: folik asit grubuna karşı MTX;

&: Folik Asit grubuna karşı PTX olarak alınmıştır.

MDFs ve folik asidin farklılaşma sürecindeki rolü çalışıldı. Folik asit, HUVEC hücrelerinde proliferatif etki göstermiştir. Bu etki mezenkimal kök hücreleri farklılaşma protokolünde tanımlanan ko-kültür ortamına salınan mediatörlerce potansiyalize edilmiş ve proliferasyonu daha fazla arttırmıştır. Şekil 14 zamana bağlı olarak hücre çoğalma etkisini, Şekil 15 MKH ortamına görel olarak folik asit ve kombine etkisini göstermektedir.

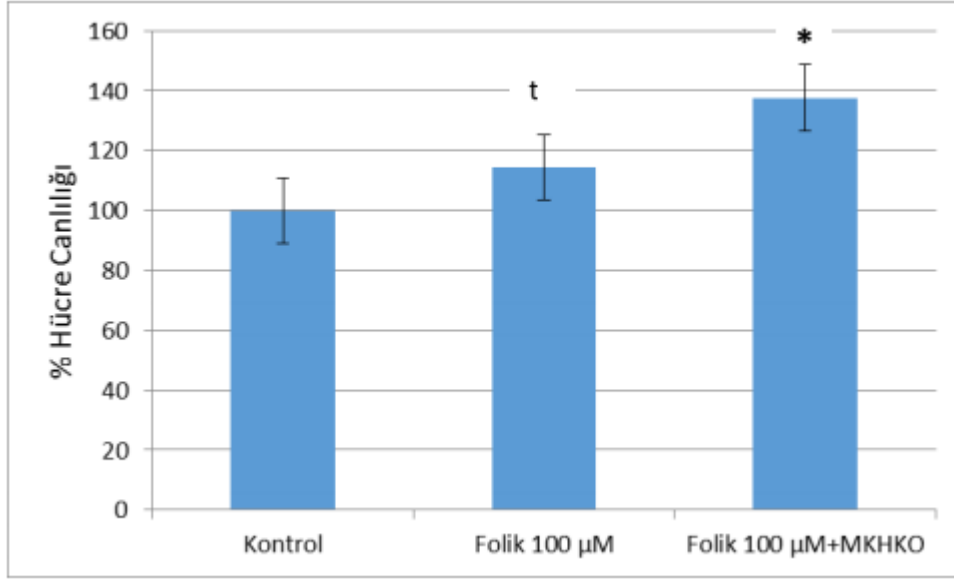


- 100 µM folik asit ko-kültür ortamı alt hazneye ekleyerek elde edilen MKHKO
- 100 µM folik asit
- HUVEC hücresi MKH ko-kültür ortamı

Şekil 14. Folik asit + MKHKO etkisi. Ko-kültür ortamında alt hazneye eklenen folik asit (2.5-100µM) + her konsantrasyonda 50µL mezenkimal kök hücre kültür ortamı (MKHKO); 7 konsantrasyon aralığında 48 saat süresince hücre proliferasyonları gerçek zamanlı ölçüldü. Tekrarlayan ölçümler arasındaki trend değişim Mauchly'nin sferisite testi kullanılarak analiz edildi Multivariate analizi Pillai'nin trace testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  olarak alınmıştır.

t: kontrole karşı folik asit grubu;

\*: kontrole karşı folat + MKHKO grubu olarak alınmıştır.



Şekil 15. HUVEC hücreleri üzerine farklılaşma protokolü ile elde edilen MDF etkisi. Kontrol, tek başına MKH ortamı olarak kullanıldı. 48 saat sonra hücre çoğalması üzerine etkileri %hücre canlılığı olarak değerlendirildi. Tekrarlayan ölçümler arasındaki trend değişim Mauchly'nin sferisite testi kullanılarak analiz edildi Multivariete analizi Pillai'nin trace testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  olarak alınmıştır.

t: kontrole karşı folik asit grubu;

\*: kontrole karşı folat + MKHKO grubu olarak alınmıştır.

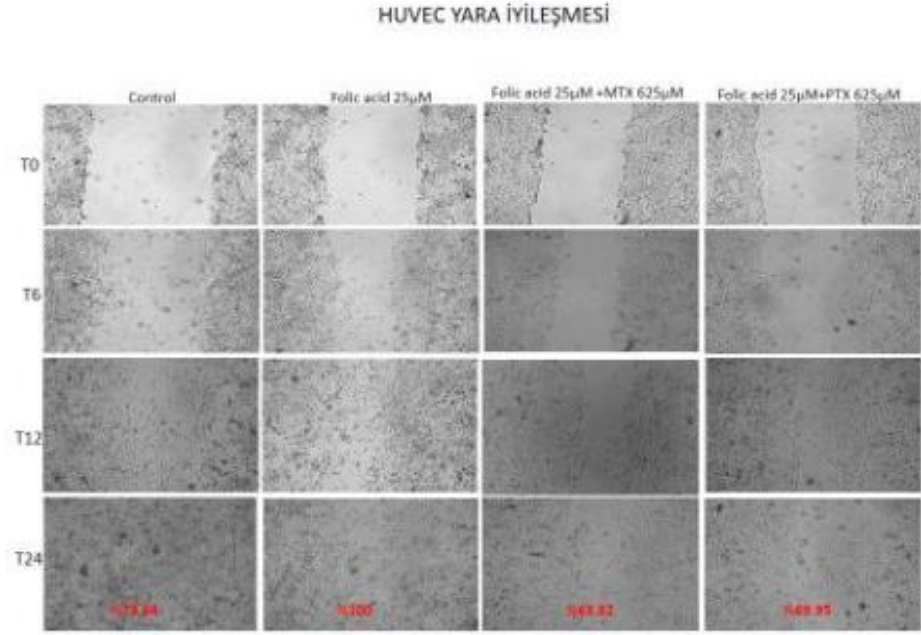
#### 4.2. HUVEC hücre hattı ile oluşturulan yara iyileşmesi deneyleri

Yara iyileşmesinin ikinci komponenti yaranın kapanma hızıdır. Bu parametre hücrelerin hem çoğalmasına hem de migrasyonuna bağlıdır. HUVEC hücre hattı ile oluşturulan *in vitro* endotel yara modelinde araştırma değişkenleri olan mezenkimal kök hücrelerin, folik asidin ve MKH farklılaşmasına etki ederek ortama salgıladığı faktörlerde farklılık yaratan folik asidin etkileri araştırılmıştır.

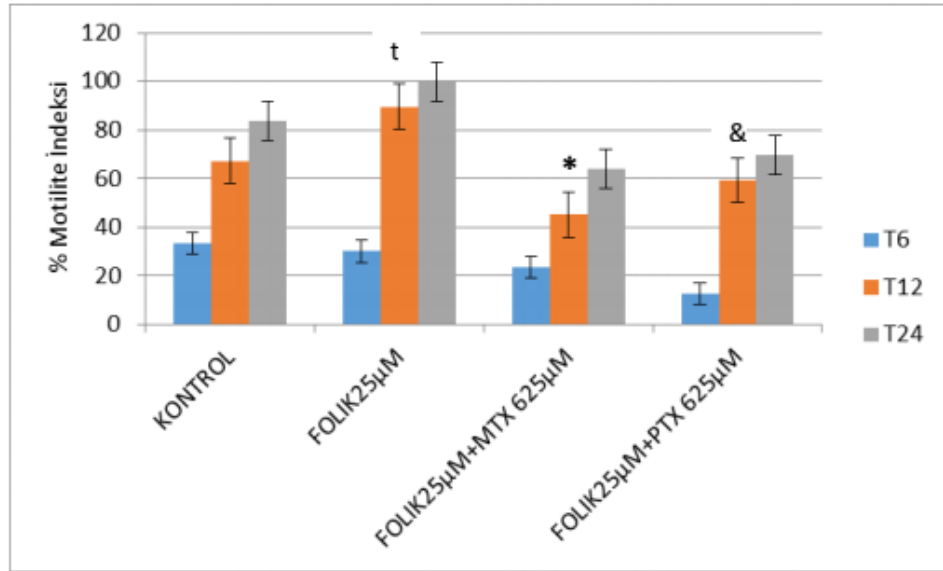
#### 4.2.1. HUVEC Yara İyileşmesi Modeli (Folik asit etkisi)

Yara iyileşme modelinde folik asidin hücre çoğalmasını %50 arttıran dozu kullanıldı. Bu doz folik asit için inhibisyon sağlayan, MTX ve PTX için HUVEC hücre hattında toksik olmayan ancak %90 inhibisyon yapan dozlar seçildi. Şekil 16'da gösterildiği gibi başlangıç, 6., 12., 24. saatlerde yara kapanması ölçüldü. Yara iyileşme hızı % motilite indeksi olarak hesaplandı. Yüksek FBS (%20) eklenmiş pozitif kontrol hücre ortamında yara kapanması 24 saat sonunda % 73.64; folik asit grubunda % 100, folik asit + MTX grubunda % 63.82, folik asit + PTX grubunda % 69.95 olarak bulunmuştur.

A



B



Şekil 16. HUVEC yara iyileşme modelinde folik asit etkisi. Hücre proliferasyonunu %50 arttıran folik asit dozu olan 25µM ve bu dozu inhibe eden HUVEC üzerinde toksik olmayan



inhibitör dozları olan 625µM PTX ve MTX etkileri 24 saat süresince izlendi. A, Yara iyileşmesi gerçek zamanlı görüntüleri; B, yara kapanma hızları %motilite indeksi olarak verilmiştir. Tekrarlayan ölçümler arasındaki trend değişim Mauchly'nin sferisite testi kullanılarak analiz edildi Multivariete analizi Pillai'nin trace testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  olarak alınmıştır.

t: kontrole karşı folik asit grubu;

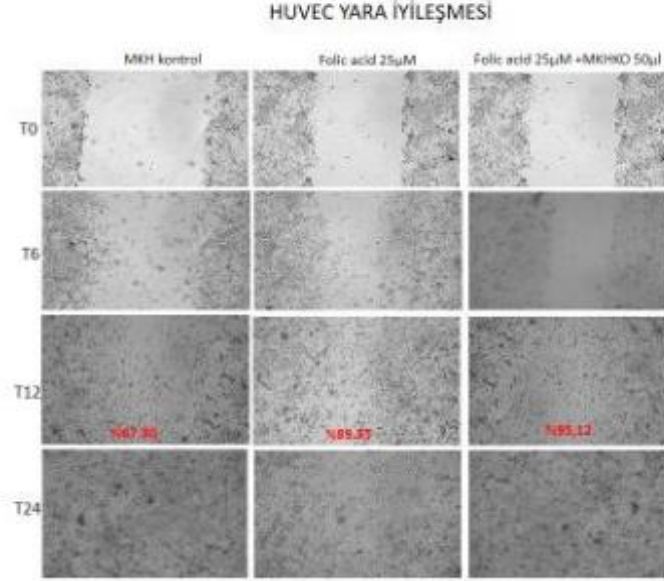
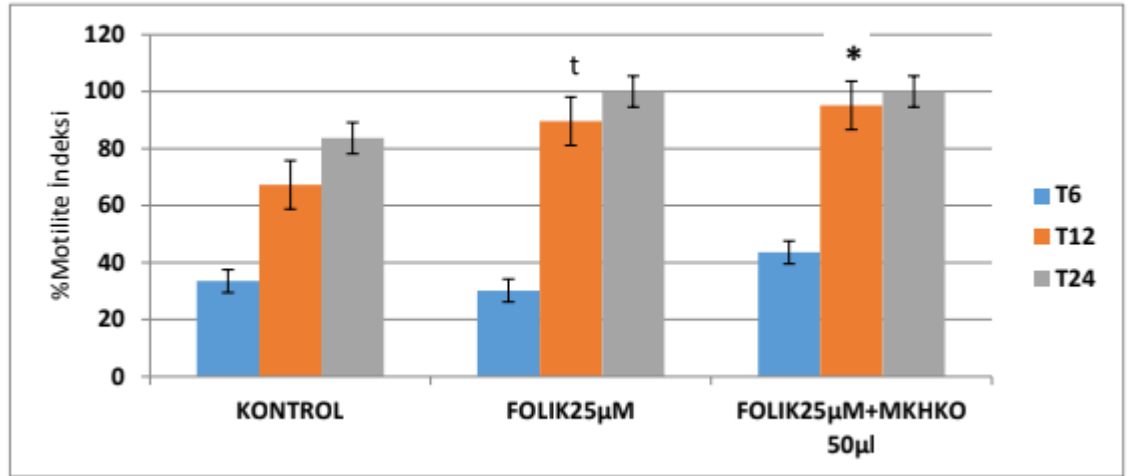
\*: folik asit grubuna karşı MTX;

&: Folik Asit grubuna karşı PTX olarak alınmıştır.

#### **4.2.2. HUVEC Yara İyileşmesi Modeli (mezenkimal kök hücre etkisi)**

Yara iyileşme modelinde, hücre proliferasyonunu %50 arttıran folik asit dozu olan 25µM, ko-kültür modelinde MKH elde edilen MDFs (50 µL) ve ko-kültür modelinde 25µM Folik asit eklenmiş MDFs (50 µL) dozları seçildi. Başlangıç, 6, 12, 24 saatlerde yara kapanması ölçüldü. Yara iyileşme hızı, % motilite indeksi olarak hesaplandı. Şekil 17'de gösterildiği gibi ko-kültür modelinde MKH ile elde edilen MDFs ile yara kapanması 24 saat sonunda % 83,74, Folik asit grubunda %100 ve Folik asit + MKH grubunda %100 olarak hesaplandı. 12 saat sonunda yara kapanması sırası ile % 67.30, %89.56 ve %95.12 olarak bulundu.

Farklılaşma sürecinde MDFs etkisi ile yara iyileşmesini arttırmaktadır. Yüksek FBS (%20) eklenmiş pozitif kontrol grubunda 24 saat sonunda % 73.64 olan kapanma oranı MKH etkisi ile % 83.74'e yükseldi. Ko-kültür ortamına folik asidin eklenmesi ile elde edilen MDFs, yalnız folik asit etkisine karşılık yara kapanma oranını daha da arttırdı.

**A****B**

Şekil 17. HUVEC yara iyileşmesi modelinde mezenkimal kök hücre etkisi. Hücre proliferasyonunu %50 arttıran folik asit dozu olan 25 $\mu$ M, ko-kültür modelinde MKH elde edilen MDFs (50  $\mu$ L) ve ko-kültür modelinde 25 $\mu$ M Folik asit eklenmiş MDFs (50  $\mu$ L) etkileri 24 saat süresince izlendi. A, Yara iyileşmesi gerçek zamanlı görüntüleri; B, yara

kapanma hızları % motilite indeksi olarak verilmiştir. Tekrarlayan ölçümler arasındaki trend değişim Mauchly'nin sferisite testi kullanılarak analiz edildi. Multivariete analizi Pillai'nin trace testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  olarak alınmıştır.

t: kontrole karşı folik asit grubu;

\*: kontrole karşı folat + MKHKO grubu olarak alınmıştır.



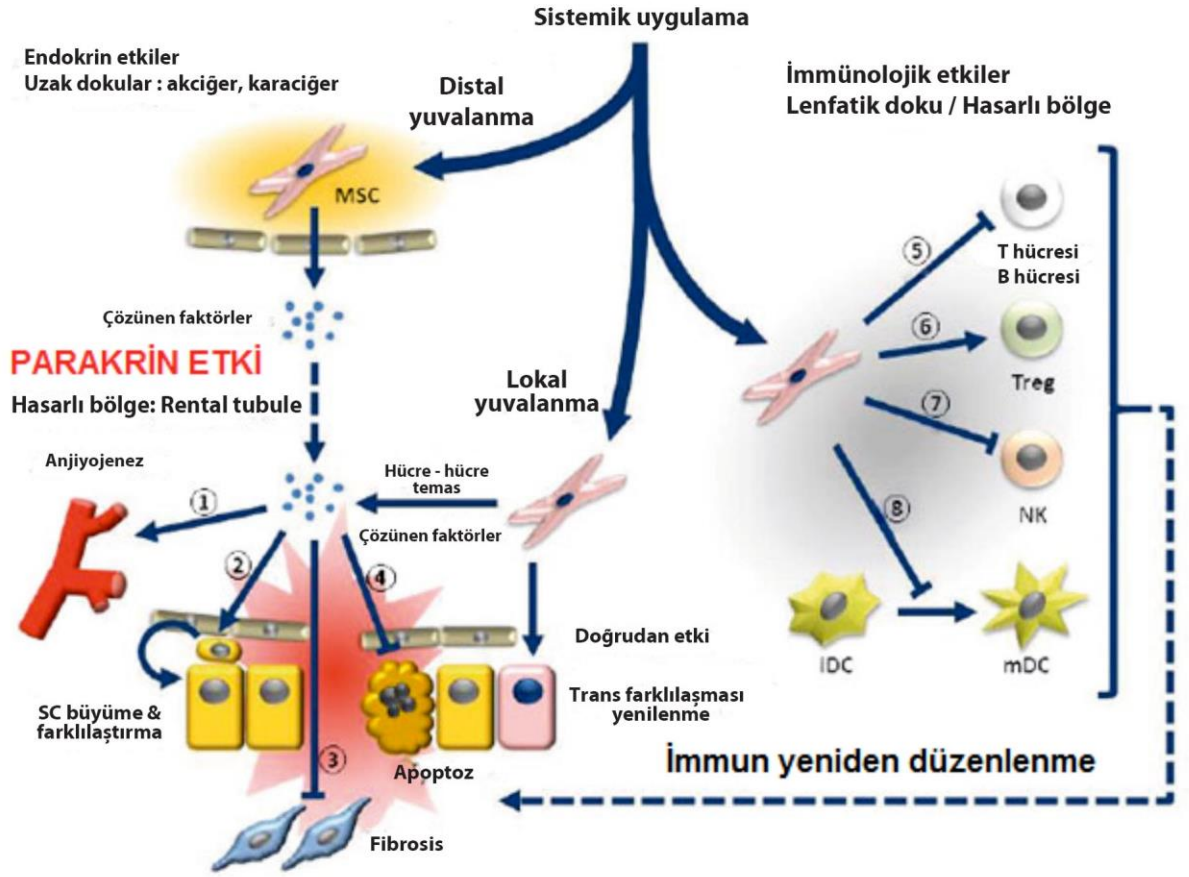
## 5. TARTIŞMA

Yara iyileşmesinin karmaşık süreci, iltihaplanma, proliferasyon, anjiyogenez, epidermal restorasyon, yara kontraksiyonu ve yeniden modelleme dahil, örtüşen fazlarda meydana gelir. Pro-inflamatuar reaksiyonlar yara onarımını başlatırken vazgeçilmez roller oynadığından, uzun süreli inflamasyon cilt yaralanmasında zararlı etkiler gösterir. Yara iyileşmesinde rejenerasyon işlemleri normal olarak hücre dışı matris, hücreler ve parakrin faktörleri arasındaki karmaşık etkileşimler aracılığıyla gerçekleşir. Bir ya da birkaç bozuk mekanizmanın neden olduğu başarısız ya da dağınık iyileşme süreçleri birçok hastalıkta yara iyileşmesinde zorluklara neden olabilir (36).

Negatif basınç terapisi, hiperbarik oksijen tedavisi, antimikrobiyal tedavi, biyomühendislik cilt eşdeğerleri, büyüme faktörleri gibi kronik yaralar için geliştirilen bir dizi tedavi sınırlı başarıya sahiptir. Matris materyaline eklenen veya yara yatağına implante edilen hücre transplantasyonu son zamanlarda ilgi görmüştür. Orijinal olarak organa spesifik hücrelerin yerini aldığı düşünülen kök ve progenitor hücrelerin, konak hücrelerin kemotaksisi yoluyla ve hücre sinyal molekülleri için bir kaynak olarak yara iyileşmesini sağlama potansiyellerini keşfedilmiştir (37).

İyileşmeyen yaralarda, MKH bazlı terapiler, anjiyogenez, enflamasyon, hücre göçü, proliferasyon ve epidermal terminal farklılaşması gibi bir dizi koordineli hücresel süreçleri aktive etme potansiyeline sahiptir. MKH aracılı yara iyileşmesinde rejenerasyon işlemleri normal olarak hücre dışı matris, hücreler ve parakrin faktörleri arasındaki karmaşık etkileşimler aracılığıyla gerçekleşir (38).

Bir iskemik dokunun hücresel rejenerasyonu, örneğin, enfarktüslü bir kalp için bir milyar masif hücre gerekmektedir (39). Deneysel çalışmalar ve klinik çalışmalar, MKH aracılı terapötik etkinin, kardiyomiyositler, vasküler veya renal hücrelerdeki farklılaşma potansiyellerinden ziyade salgılanan büyüme faktörleri ve sitokin miktarlarının katkısına büyük ölçüde bağlı olabileceğini ortaya koymuştur (40).



Şekil 18. Mezenkimal kök hücrelerin sistemik uygulanması. Hücre kaynaklı eylemleri içeren distal (endokrin) veya lokal (parakrin) etkileri tetikleyebilir. 1) Anjiyogenezin teşvik edilmesi: vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), monosit kemoatraktan protein 1 (MCP1), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve interlökin 6 (IL6). 2) Kök hücre büyümesi ve farklılaşması: kök hücre faktörü (SCF), lösemi-inhibitör faktör (LİF), makrofaj kolonistimulasyon faktörü (MCSF), stromal türevli faktör 1 (SDF-1), anjiyopietin 1 ve aktivin A. 3) Fibrozis inhibisyonu: hepatosit büyüme faktörü (HGF), bFGF, adrenomedullin (ADM). 4) Apoptozun inhibisyonu: VEGF, HGF, IGF1, transforme edici büyüme faktörü (TGF), bFGF, granülosit makrofaj kolonistimulasyon faktörü (GMCSF), aktivin A ve trombospondin 1. İmmün aracılı etkiler aşağıdakileri içerir (5 ila 8). 5) T ve B hücrelerinin baskılanması: insan lökosit antijeni G5 (HLA-G5), HGF,

indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), indoleamin2,3dioksijenaz (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), bFGF ve TGFp. 6) TGFp ifadesi ile düzenleyici T hücrelerinin (Treg) farklılaşması ve genişlemesi. 7) IDO, PGE2 ve TGFp'nin salgılanması ile doğal öldürücü (NK) hücrelerin inhibisyonu. 8) PGE2'nin salgılanmasıyla dendritik hücre (DC) olgunlaşmasının engellenmesi (41) [Şekil Carrión ve Figueroa'dan yeniden üretilmiştir].

MKH'ler tarafından salgılanan düzenleyici ve trofik faktörler paneli, çok sayıda büyüme faktörünü, sitokinleri, kemokinleri içerir ve MDFs olarak bilinirler. Bu faktörlerin, fizyolojik değişiklikler (hipoksi veya anoksi), küçük molekül uyarımı, sitokin tedavileri ve strese cevap verdiği gösterilmiştir (Şekil 18) (15). MDF'lerin *in vivo* profili ve hastalığa yanıtının tam olarak bilinmemesine karşın mevcut MKH bazlı tedavilerin büyük ölçüde bir parakrin etkisiyle ilişkili olduğu göstermiştir.

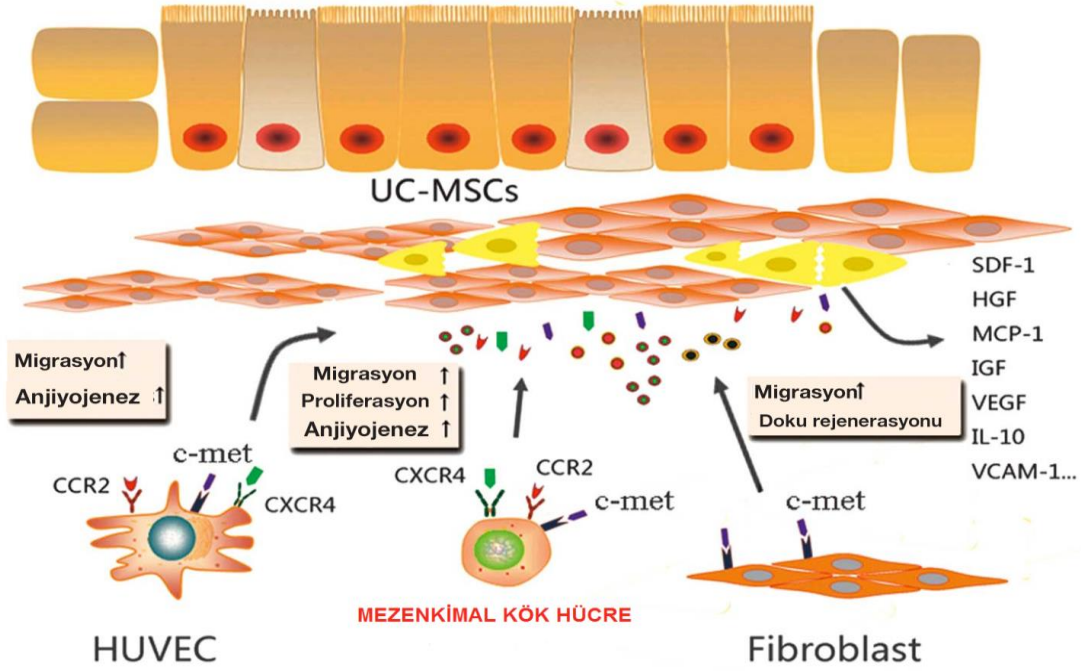
Oluşturduğumuz ko-kültür modeli ile MKH kaynaklı salgısal faktörlerin yara iyileşmesinin hücre migrasyonu komponentinde artırıcı etkisinin parakrin etki ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin pek çok fonksiyonları ile yara iyileşmesine katkı sağladıkları bilinmektedir. Bu çalışma ile endotel hasarının onarımında parakrin fonksiyonlarının da etkili olduğu kanıtlanmıştır. Nguyen ve ark. yaptıkları çalışmada MDFs enjeksiyonunun, miyokardiyal enfarktüsün domuz modelinde doğrudan kardiyak rejenerasyondan ziyade parakrin etkileri ile koruma sağladığını gösterdiler (42). MDF'ler tarafından sunulan potansiyel terapötik mekanizma dizisi, antiapoptotik (43), anti-enflamatuar (44), antifibroz (45), anjiyojenik (46) ve rejeneratif etkileri kapsar (47).

MDF'lerin *in vivo* etkileri, Lee ve arkadaşları tarafından miyokart hasarı modelinde gösterilmiştir. Bu çalışmada akciğerlerde bulunan MKH'ler tarafından salınan antiinflamatuvar protein (TSG-6) ile miyokard hasarı küçültülmüştür (48). MDF'lerin ayrıca renal hasarın onarımı için MKH'lerin yanıtı olarak iyileşmeye katkı sağladıkları gösterilmiştir (49). Böbrek hastalıklarının iyileştirilmesinde MKH'lerin neden olduğu

mekanizmalara ilişkin 5/6 nefrektomiye (NPX) maruz kalan sıçanlarda böbrek hasarı ve rejenerasyonunun çeşitli fonksiyonel ve moleküler belirteçlerinin değerlendirildiği çalışmada (Villanueva ve ark. 2011)  $0.5 \times 10^6$  MKH'lerin salgısının tek bir intravenöz infüzyonu, makrofaj infiltrasyonu ve interstisyel  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -düz kas aktin) dahil olmak üzere serum kreatinin ve enflamatuar belirteçlerin önemli ölçüde azaltılması ile ilişkili bulunmuştur. Tedavi edilen hayvanlarda, epitelojenik moleküller [Pax-2, bFGF (temel fibroblast büyüme faktörü) ve BMP-7 (kemik morfojenetik protein-7)] ve anjiyogenezde bağlanan Tie-2 ve VEGF transkripsiyon faktörlerinin artan ekspresyonunda anlamlı bir artış bulunmuştur (50). Klinik çalışma sonuçları *in vitro* çalışmalarla da uyumlu bulunmuştur. Benzer mekanizmanın vasküler koruyucu olarak MKH'lerin fonksiyonunu da açıklayacağı düşünülmektedir (49).

Çalışmamızda MDFs, yara iyileşmesinin hücre migrasyonu komponentinde arttırıcı etki göstermişlerdir. Yara iyileşmesinde rol oynayan MKH kaynaklı salgısal faktörlerin temel yara iyileşmesi süreçlerinde etkili olduğu literatürde oldukça yeni olarak tartışılmaktadır. Yara kapanmasını hızlandırarak, reepitelizasyonun arttırılması, anjiyogenezin arttırılması, granülasyon dokusu oluşumunun uyarılması, inflamasyonun modüle edilmesi ve ECM remodelinginin düzenlenmesi ile ilişkili kutanöz yara iyileşmesi ve cilt rejenerasyonu üzerine MKH'lerin uygulanmasının, faydalı bir etki gösterdiği belirtilmiştir. (Şekil 18) (14). Önemli olan, bu yararlı etkiye parakrin sinyallemenin aracılık ettiği görülmektedir (51,52).

Bizim çalışmamızda MKH kaynaklı salgısal faktörler, yara iyileşmesinin hücre migrasyonu komponentinde (Şekil 16 ve Şekil 17) arttırıcı etki göstermişlerdir. Oluşturduğumuz ko-kültür modelinde bu etkinin parakrin etki ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin pek çok fonksiyonları ile yara iyileşmesine katkı sağladıkları bilinmektedir. Bu çalışma ile endotel hasarının onarımında parakrin fonksiyonlarının da etkili olduğu kanıtlanmıştır. MDFs içeriği bu bağlamda önemli olacaktır.



Şekil 19. Doku onarımında MKH'lerin parakrin mekanizmalarının bir modeli. Umbilikal kord kaynaklı MKH'ler ( UC-MSC) ile oluşturulan modelde hasarlı dokuda MKH kaynaklı salgılanan faktörler SDF-1 / CXCR4 ve MCP-1 / CCR2 ile parakrin aktivite gösterir. Güçlü parakrin kemoatraktan ve anjiyojenik faktörler, farklı hücre tipleri üzerinde hareket ederek mikroçevreyi etkileyerek doku onarımı ve anjiyogeneze yol açar. UC-MSC'ler, umbilikal kord mezenkimal kök hücreler; SDF-1, stromal hücre kaynaklı faktör 1; CXCR4, C-X-C kemokin reseptörü 4; c-met, MCP-1, monosit kemotaktik protein 1; HGF, hepatosit büyüme faktörü; CCR2, C-C kemokin reseptörü 2; HUVEC'ler, insan umbilikal arter-ven endotel hücreleri; IGF, insülin benzeri büyüme faktörü; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü; IL, interlökin; VCAM, vasküler hücre adezyon proteini (53).

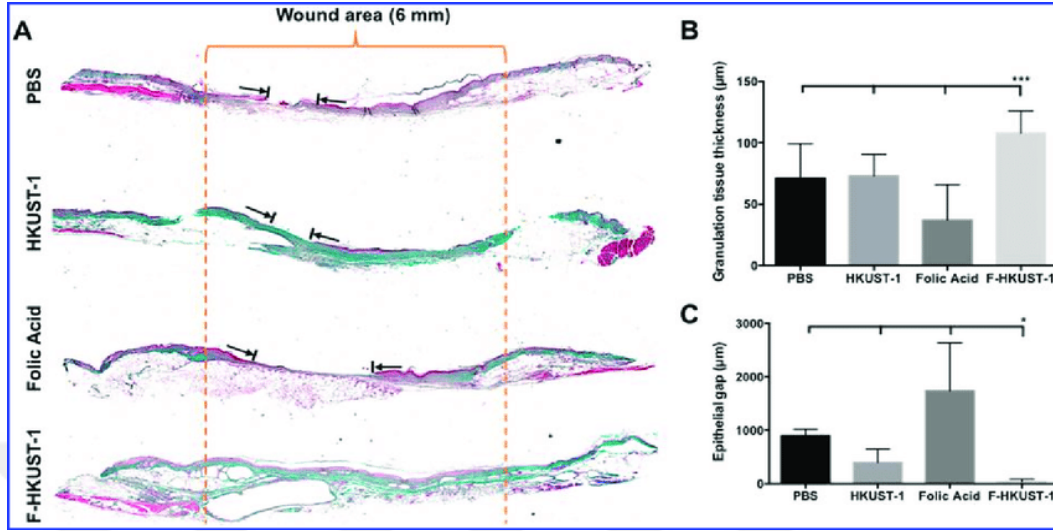
Bu nedenle, SDF-1, MCP-1 ve HGF'nin UC-CM'de anahtar düzenleyiciler olabileceği ve yaralanmış bir alana enjekte edilen UC-MSC'lerin salgıladığı büyüme faktörleri ve kemokinlerin dolaşımdaki dokuya göç ederek infiltre olan ve rejenerasyonu başlatan progenitör / kök hücrelerini çekeceği varsayılmıştır (Şekil 2). Şekil 19'da tanımlandığı gibi



SDF-1, MCP-1 ve HGF'nin, UC-MSK'leri tarafından salgılanmasını ve spesifik hücre reseptörleri ile onarıcı hücreleri davet ederek, doku onarımını gerçekleştirebildiğini gösterilmiştir. Özellikle, UC-MSK'ler ve HUVEC'ler, UC-MSK'lerin salgıladığı kemotaktik faktörlere yanıt olarak *in vitro* ve *in vivo* olarak göç ettikleri kanıtlanmıştır (53).

Folik asit, *in vivo* folik asit redüktazına yanıt olarak aktif tetrahidro folik aside indirgenebilir. Tetrahidro folik asit, bir karbon ünitesinin ana taşıyıcısı olup, pürin ve pirimidin sentezinde ve amino asitlerin karşılıklı transformasyonunda rol oynar. *In vivo* folik asit eksikliği bir karbon ünitesinin iletimini bozabilir ve hücre çoğalması, doku büyümesi ve gelişimi için gerekli olan nükleik asit sentezini ve amino asit metabolizmasını etkileyebilir. Bu nedenle, folik asit kök hücrelerin gelişimi, proliferasyon ve farklılaşmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (54).

Ohrvik ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 14 günlük folik asit tedavisinin otolog yetişkin kök hücre proliferasyonunu ve *in vivo* olarak farklılaşmasını indükleyerek yara iyileşmesini arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca tek başına kök hücre enjeksiyonu ve folat uygulamasına karşın kombine uygulamanın daha etkili olduğu [Şekil 19] belirlenmiştir (55,56). Bizim çalışmamızın sonuçları bu araştırmaları doğrular niteliktedir. Şekil 17'de açıkça görüleceği gibi folik asitin MKH ile kombine etkisi parakrin olarak yara iyileşmesini arttırmaktadır.



Şekil 20. *In vivo* yara iyileşmesinde folik asit etkisi. 30 gün sonunda epitelyal doku iyileşmesi (A) Masson trikrom boyalı doku dijital görüntüleri (keratin ve kas lifleri için kırmızı, kolajen için yeşil, sitoplazma için açık kırmızı ve hücre çekirdekleri için koyu kahverengi). Oklar epitel boşluğunun kenarına işaret eder; sarı noktalı çizgi yaranın kenar boşluğunu gösterir. (B) Granülasyon doku kalınlığının ölçümü. (C) Epitel boşluğunun nicel değerlendirmesi [Kaynakça 41'den alıntılanmıştır] (57).

Literatür ışığında bu tez çalışması ile folik asidin hücre proliferasyonu üzerine artırıcı etkisi MKH kültür ortamına salınan salgısal faktörlerce potansiyalize ettiği, folik asidin yara iyileşme hızını arttırdığı ve MKH salgısal faktörleri bu artışı ilk 12 saatlik döneminde potansiyelize ettiği gösterilmiştir. Bu bizim çalışmamızdan çıkan bulgudur ancak literatürde bununla ilgili çalışma görülmemiştir.

Bu çalışma ile MKH doku yenilenmesi ve iyileşme süreçlerinde yalnızca destek hücre fonksiyonları ile değil, differansiyasyonun salgısal fonksiyonlar üzerindeki etkisiyle de katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu katkının folik asidin ko-kültür modelinde MKH tarafından salınan faktörlerin etkisini potansiyalize ettiği anlaşılmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mezenkimal kök hücreler başta bağ doku olmak üzere çeşitli dokulara farklılaşabilme özelliğine sahip erişkin kök hücreleridir. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin, doku hasarlanması durumunda hasar yerine göç edip, hasarı onarması söz konusudur. Doku yenilenmesi ve onarılması konusunda önemi olan diğer bir faktör ise nükleik asitlerin sentezindeki anahtar rolüne ek olarak farklılaşma üzerine de olumlu etkisi olan folik asittir. Folik asit, DNA replikasyonu ve onarımı, metilasyon, nükleotidlerin, vitaminlerin ve bazı amino asitlerin sentezi gibi pek çok metabolik işlevde görev almaktadır. Bu çalışma kapsamında, folik asitin damar dokusunun yenilenmesi üzerine MKH differansiyasyonu ilişkili değişen salgısal fonksiyonlarının iyileştirici rolü araştırılmıştır. Folik asitin damar endotel hücrelerinin proliferatif özelliklerini pozitif yönde arttırdığı ve bu etkinin damar endotel hasarının onarımında etkin olduğu gözlenmiştir. Ancak hangi salgısal faktörlerin etkili olduğu ileri araştırmalar ile belirlenmelidir. Folik asitin damar endotel hücrelerinin proliferasyonuna ve yara iyilişmesine olan etkisinin, folik asit antagonist ve inhibitörlerinin varlığında azaldığının gösterilmesi de folik asidin endotel hasarının iyileşmesinde etkin olduğunu göstermektedir. Çalışmada yine folik asitle birlikte MKH kaynaklı olup büyüme faktörleri, stokin ve kemokinler tarafından zengin olan MDF'lerin *in vitro* olarak folik asitin etkisini arttırdığı gözlenmiştir. Bu sonuç, MDF'lerin damar ve miyokard hasarı gibi kalp damar hastalıkları ile ilişkili durumlarda onarım ve tedavi süreçlerinde kullanımı için *in vivo* çalışmaların yapılması yararlı olacaktır. Çalışmamız sonucunda HUVEC hücre hatları ile oluşturulan damar endotel hasarının, MKH'lerin salgıladığı sitokin ve kemotaktik faktörlerle iyileştiği; folik asidin bu etkiyi potansiyelize ettiği gösterilmiştir.

Öneriler;

1. Yara iyileşmesi üzerine etkisinin FDA (Food and Drug Administration) standartlarında çalışmak (toksikite dozları, damar hasarı modellerinde çalışmak, etkinlik çalışmaları, hayvanlardaki toksik doz çalışmaları...)
2. *In vivo* (Faz 0) çalışmaları yapmak
3. Başka yara modellerinde (karaciğer hasarı onarımı, kemik hasarı onarımı gibi) *in vitro* çalışma yaparak sadece damar endotelinde mi etkili oldu yoksa tüm doku hasarlarında mı etkili araştırmak

## 7. KAYNAKLAR

1. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*. 2015;35(2):e00191.
2. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3:301–313.
3. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res*. 2009;88:792–806.
4. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007;211: 27.
5. Jiao F, Wang J, Dong ZL, Wu MJ, Zhao TB, Li DD, Wang X. Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cell Reprogram*. 2012;14:324–333).
6. Li X, Yu X, Lin Q, Deng C, Shan Z, Yang M, Lin S. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:295–303).
7. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: Biology, patho-physiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation research*. 2011;109(8):923-940.
8. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;97(3):237–241.)
9. Hoch AZ, Papanek P, Szabo A, Widlansky ME, Gutterman DD. Folic Acid Supplementation Improves Vascular Function in Professional Dancers With

- Endothelial Dysfunction. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation.* 2011;3(11):1005-1012.
10. Chen Z, Lin S. Folic acid in combination with adult neural stem cells for the treatment of spinal cord injury in rats. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(7):10471-10480.
  11. Summer EH. Mesenchymal Stem Cells:A Multimodality Option for Wound Healing. *Advances In Wound Care* 2012;Volume 1, Number 4.
  12. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs):controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 2009;17:939–46.
  13. Ding D, Shyu W, Lin S. Mesenchymal stem cells. *Cell Transpl.* 2011;20:5–14.
  14. Dylan EL, Nagi A, Devendra K, Agrawal L. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Research & Therapy* 2016;7:37.
  15. Kamota T, Li Ts, Morikage N, Murakami M, Ohshima M, Kubo M, Kobayashi T, Mikamo A, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Ischemic pre-conditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/ reperfusion injury in the late phase. *J Am Coll Cardiol* 2009;12;53(19):1814- 1822.
  16. Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ* 2004;328, 211-214.
  17. Hwank SY, Kang YJ, Sung B, Kim M, Kim DH, Lee Y, Yoo M, Kim CM, Chung HY, Kim ND. Folic acid promotes the myogenic differentiation of C2C12 murine myoblasts through the Akt signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine* 2015;36, 1073-1080.
  18. Price RJ, Lillycrop KA, Burdge GC. Folic acid induces cell type-specific changes in the transcriptome of breast cancer cell lines: a proof-of-concept study. *Journal of Nutritional Science* 2016; 5, 1-8.
  19. Wei T, Jia W, Qian Z, Zhao L, Zhao L, Yu Y, Li L, Wang C, Zhang W, Liu Q, Yang D, Wang G, Wang Z, Wang K, Duan T, Kang J. Folic acid supports pluripotency and

- reprogramming by regulating LIF-STAT3 and MAPK-ERK signaling. *Stem Cells and Development* 2017;26, 49-59.
20. Choi SW, Mason JB. Folate status: Effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *The Journal of Nutrition* 2001; 132, 2413–24185.
  21. De-Regil LM, Fernández-Gaxiola AC, Dowswell T, Peña-Rosas JP. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010;10 CD007950.
  22. Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural Tube Defects, Folic Acid and Methylation. *Int J Environ Res Public Health* 2013;9, 4352–4389
  23. Melo FR, Bressan RB, Costa-Silva B, Trentin AG. Effects of Folic Acid and Homocysteine on the Morphogenesis of Mouse Cephalic Neural Crest Cells In Vitro. *Cell Mol Neurobiol* 2017;37, 371-376.
  24. Kuo CT, Chang C, Lee WS. Folic acid inhibits COLO-205 colon cancer cell proliferation through activating the FR $\alpha$ /c-SRC/ERK1/2/NF $\kappa$ B/TP53 pathway: in vitro and in vivo studies. *Scientific Reports* 2015;5, Article number: 11187.
  25. Wilson J. Folic Acid supplementation stimulates notch signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 47: 174-180.
  26. Chen Z, Lin S. Folic acid in combination with adult neural stem cells for the treatment of spinal cord injury in rats. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(7):10471-10480.
  27. Ng SC, George QD, Lewis CC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development*. 2013;140: 2535-2547.3w4s
  28. Philip JH, Mara LB, David AC, Ronald ML, Amy SP, Eglar R, Dan T, Francesco Z. Methotrexate: new uses for an old drug. *The Journal of Pediatrics* 2013;11-30.
  29. Rollins KD, Lindley C. Pemetrexed: a multitargeted antifolate. *Clin Ther*. 2005;27(9):1343-82.

30. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE, Wagner R, Lee GO, Antosiewicz-Bourget J, Teng JM, Thomson JA, Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 2011;8:424-429.
31. Perkins GL, Hall DJ, Tuan RS. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*. 2006;24:1487–1495.
32. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: Biology, patho-physiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation research*. 2011;109(8):923-940.
33. Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler H, Charnahelli H, Klagsbrun M. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem*. 1997;12;272(50):31582-8.
34. Tian, Henghe, and Bruce N. Cronstein. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2007;168-73.
35. Maitreyee H, Robert M.W, Jr. Brian P.B, Yong-Cheng W, Doo Y.L.H, Cheng Yi L, Atiqur R, Jogarao V.S.G, Ning L, Rajeshwari S, David E.M, Richard L, Patricia G, John R.J and Richard P. Pemetrexed in Malignant Pleural Mesothelioma. *Clinical Cancer Research* 2005;11:982-992.
36. Portou MJ, Baker D, Abraham D, Tsui J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. *Vascul Pharmacol* 2015; 71:31–6.
37. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015;4:560–82.
38. Hocking AM. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2012;1:166–71

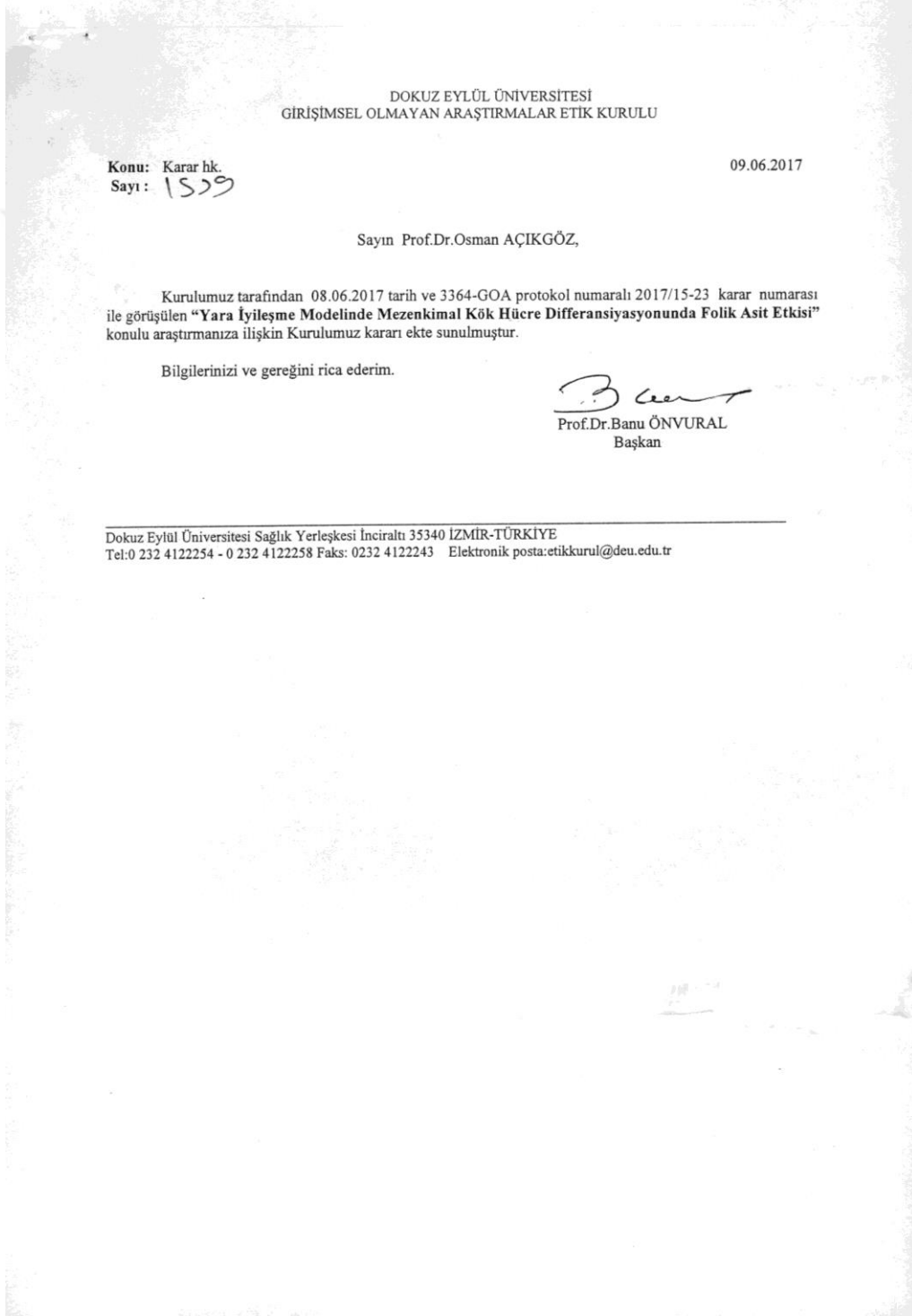
39. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol.* 2005;23(7):845-856.
40. Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley Lg. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2486-249.
41. Fernando EF, Flavio C, Sandra V, Maroun K. Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res* 2012;45:269-277.
42. Nguyen Bk, Maltais S, Perrault Lp, Tanguay Jf, Tardif Jc, Stevens Lm, Borie M, Harel F, Mansour S, Noiseux N. Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;3(5):547-558.
43. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296(6):H1888-97.
44. Bartosh Tj, Ylöstalo Jh, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee Rh, Choi H, Prockop Dj. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;3;107(31):13724-13729.
45. Mirotsov M, Jayawardena Tm, Schmeckpeper J, Gneccchi M, Dzau Vj. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50(2):280-289.
46. Kinnaird T, Stabile E, Burnett Ms, Epstein Se. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res* 2004;20;95(4):354-363.
47. Anne MH. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2012; 1(4): 166–171.



48. Lee Rh, Pulin Aa, Seo Mj, Kota Dj, Ylostalo J, Larson B, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop Dj. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009;5:54-63.
49. Tögel Fe, Westenfelder C. Mesenchymal stem cells: a new therapeutic tool for AKI. *Nat Rev Nephrol* 2010;6:179-183.
50. Villanueva S, Ewertz E, Carrión F, Tapia A, Vergara V, Céspedes C, Sáez P, Luz P, Irrázabal C, Carreño Je, Figueroa F, Vio C. Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. *Clinical Science* 2011;121(11):489-499.
51. Lee SH, Jin SY, Song JS, Seo KK, Cho KH. Paracrine effects of adiposederived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Ann Dermatol.* 2012;24:136–43.
52. Dong-Jie L, Chuan-An S, Tian-Jun S, Lin Z, Hu-Ping D, Jia-Ke C. Mesenchymal stem cells promote incision wound repair in a mouse model. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* June 2017;16 (6): 1317-1323
53. Chongyang S, Puchang L, Tianyu M, Meixing Y, Qiao L, Ting F, Jinrong L, Tingting Z, Xiaohuan L, Hong L. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Molecular Medicine Reports* 2015;12: 20-30.
54. Chen Z, Lin S. Folic acid in combination with adult neural stem cells for the treatment of spinal cord injury in rats. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(7):10471-10480.
55. Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients* 2011; 3: 475-490.
56. Heseke H. Folic acid and other potential measures in the prevention of neural tube defects. *Ann Nutr Metab* 2011; 59: 41-45.
57. Jisheng XY, Zhu SH. Copper Metal-Organic Framework Nanoparticles Stabilized with Folic Acid Improve Wound Healing in Diabetes. *ACS* 2018; Nano 12(2)

## 8. EKLER

### 8.1. Etik Kurul Onayı



**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

<b>ETİK KOMİSYONUN ADI</b>	<b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ</b> <b>GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>
<b>AÇIK ADRES</b>	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
<b>TELEFON</b>	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
<b>FAKS</b>	0 232 412 22 43
<b>E-POSTA</b>	etikkurul@deu.edu.tr

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	DOSYA NO:	3364-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yara İyileşme Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Differansiyasyonunda Folik Asit Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ Fizyoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/15-23	Tarih:08.06.2017
	Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ'ün sorumlusu olduğu "Yara İyileşme Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Differansiyasyonunda Folik Asit Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
<b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sevinc ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	


## 8.2. Laboratuvar İzni

22.05.2017

Sayın İlgili,

Dr. Ahu Pakdemirli'nin doktora tezi olarak sunacağı "Yara İyileşme Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Differansiyasyonunda Folik asit etkisi" başlıklı ve Prof. Dr. Osman Açıkgöz danışmanlığında sürdüreceği araştırma için sorumlusu olduğum laboratuvar ve olanakları kullanacaktır.

Bilgilerinize sunarım.

  
Onkoloji Enstitüsü Moleküler Onkoloji Laboratuvarı Sorumlusu  
Prof. Dr. Yasemin Baskin

## 8.3.Özgeçmiş



### AHU PAKDEMİRLİ

#### Kişisel Bilgiler

##### İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	51088235372
Doğum Tarihi	14/01/1978
İletişim Adresi	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, 171k Ve Acil Yardım
Telefon	(232) 412 47 40 (537) 551 34 34
E-posta	ahu.pakdemirli@deu.edu.tr ahu@pakdemirli.com
Web Adresi	

##### Eğitim Bilgileri

01 Eylül 1996 - 01 Aralık 2002 (6 yıl 4 ay)  
Lisans, Anadal/Normal Öğrenim, MARMARA ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE  
TIP FAKÜLTESİ, TIP PR. (İNGİLİZCE)  
Diploma Numarası: 2002-99/131

##### Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Aralık 2014 - Şu Anda (3 yıl 9 ay) (Tam Zamanlı)  
ÖĞRETİM GÖREVLİSİ, ÖĞRETİM GÖREVLİSİ (DR.), DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU TIBBİ HİZMETLER VE TEKNİKLER  
BÖLÜMÜ İLK VE ACIL YARDIM PR.

01 Şubat 2013 - 01 Aralık 2014 (1 yıl 11 ay) (Tam Zamanlı)  
UZMAN (DR.), DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK  
YÜKSEKOKULU TIBBİ HİZMETLER VE TEKNİKLER BÖLÜMÜ İLK VE ACIL YARDIM  
PR.

##### Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

FRANSIZCA (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

#### Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

##### Ekonomik Faaliyet Alanı Bilgileri

EĞİTİM -- Eğitim -- Ortaöğretim -- Teknik ve mesleki orta öğretim -- Mesleki amaçlı eğitim veren diğer kursların faaliyetleri

İNSAN SAĞLIĞI VE SOSYAL HİZMET FAALİYETLERİ -- İnsan sağlığı hizmetleri -- İnsan sağlığı ile ilgili diğer hizmetler -- İnsan sağlığı ile ilgili diğer hizmetler -- Ambulansla hasta taşıma faaliyeti (hastane dışı)

##### Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Fizyoloji -- Diğer

Sağlık Bilimleri -- Diş Hekimliği -- Temel Bilimler -- Fizyoloji

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Tıp Eğitimi

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Biyokimya

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Cerrahi Tıp Bilimleri -- Acil Tıp

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Deontoloji ve Tıp Tarihi

#### Anahtar Kelimeler

Fizyoloji

Egzersiz Fizyolojisi

Biyokimya

Tıbbi Etik

#### Ar-Ge Yetkinlik

##### Makaleler

A. PAKDEMİRLİ, Y. BAŞBINAR, S. NART, L. GERT, D. KURU & H. ELLİDOKUZ, Desem, Dokuz Eylül University Lifelong Learning Center: Community-based, Multilayer Training Support On Lifelong, SHS Web of Conferens, 2016, 2261-2424, 26, 26, 01007.

##### Bildiriler

B. BAYRAM & A. PAKDEMİRLİ, Sağlık Hizmetlerinde Simulasyon; Bibliyometrik Bir Analiz, Poster Sunumu, Utek 2016: 1x. Ulusal Tıp Eğitimi Kongresi Dokuz Eylül Üniversitesi, 21 Mart 2016, 23 Mart 2016.

M. GÜLDAŞ & A. PAKDEMİRLİ, Paramedik Eğitiminde Sağlık İletişiminin Yeri: Betimsel Bir Ön Çalışma, Sözlü Sunum, Sis 2015 Sağlık Eğitimi Sempozyumu, 05 Kasım 2015, 06 Kasım 2015.

A. PAKDEMİRLİ, Y. BAŞBINAR, S. NART, L. GERS, D. KURU & H. ELLİDOKUZ, Desem, Dokuz Eylül University Lifelong Learning Center: Community-based Multilayer Training Support On Lifelong Learning, Poster Sunumu, Erpa 2015, International Congresses On Education, Athens, 05 Haziran 2015, 07 Haziran 2015.

A. PAKDEMİRLİ & B. KOCA, The Importance Of Vocational Ethics In Paramedic Education, Vocational Ethics Course For Paramedics, Poster Sunumu, Erpa 2015, International Congresses On Education, Athens, 04 Haziran 2015, 07 Haziran 2015.

S. NART, A. PAKDEMİRLİ, M. TEZEL, D. KURU, Y. BAŞBINAR & H. ELLİDOKUZ, Equal Opportunities For Everyone By E-learning At Dsem, Basic Educationcertificate Program For Medical And Health Law, Poster Sunumu, 47th Eucen Conferances, 03 Haziran 2015, 06 Haziran 2015.

##### Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Tükürük Sitokin Profiline ve Genetik Özelliklerinin Dış Çürümelerine Yatkınlıktaki Rolü, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ BAP Koordinasyon Birimi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2014, 01 Mayıs 2015.

KURUMSAL (BAP V.B.), PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, İi. Rekreasyon Terapisi Kampı, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: Balçova Belediyesi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Temmuz 2014, 01 Temmuz 2014.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Özel Öğrencilere Yönelik Rekreasyon Terapisi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: Balçova Belediyesi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Haziran 2013,

01 Haziran 2013.

**Şirketler**

SHE Sağlık HizmetleriEğitim ve Ürünleri Ticaret AŞ (Kayıtlı olmayan kuruluş), 08 Ağustos 2018.

**TÜBİTAK Burs ve Destekleri**

**Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı**

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0