

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ PROGRAMI**

**CRISPRa/dCas9 SİSTEMİYLE E-KADERİN VE ICAM1
GEN EKSPRESYONU ARTIRILMIŞ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN FARE MODELLERİNDE YARA İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Sevinç BATIR

**Danışman
Prof. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT**

MANİSA-2025

Sevinç
BATIR

CRISPRa/dCas9 SİSTEMİYLE E-KADERİN VE İÇAMİ GEN EKSPRESYONU
ARTIRILMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN FARE MODELLERİNDE YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

2025

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, tezin yazımında akademik ve etik kurallara aykırı herhangi bir yapay zeka ve program kullanmadığımı beyan ederim.

Sevinç BATIR



ÖZET

Doktora Tezi

Sevinç BATIR
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

Hücre adezyon molekülleri hücrelerin yüzeyinde bulunan bağlayıcı proteinlerdir. Bu proteinler diğer hücrelere veya ekstrasellüler matrikse bağlanarak dokularda meydana gelen yaraların iyileşmesi sırasında hayati bir rol oynarlar. Deri dokusunda meydana gelen yaraların iyileşmesinde ise ekstrasellüler matriks ailesine ait Hücre İçi Adhezyon Molekülü-1 (ICAM-1) ve Epitelyal Kaderin (E-kaderin) esas olarak rol almaktadır. Kök hücreler ve CRISPR/Cas sistemleri ise son yıllarda doku mühendisliği ve rejeneratif tıp kapsamında dermal yara hasarlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, farelerden elde edilen adipoz doku kök hücreleri (ADKH) elde edilmiş ve bu hücrelerin karakterizasyonu ters faz kontrast floresan mikroskop, ve akış sitometrisi analizleri ile incelenmiştir. Elde edilen bu hücrelerdeki ICAM-1 ve/veya E-kaderin genleri lentiviral aracılıklı CRISPRa/dCas9 sistemi aracılığıyla aşırı ifade edilerek, ilgili genlerin aşırı ifadesinin in vitro ortamda ADKH'lerin gen ekspresyonu, canlılığı, adezyonu, proliferasyonu ve migrasyonu üzerine olan etkileri ters faz kontrast floresan mikroskop, RT-qPCR ve akış sitometrisi analizleri ile incelenmiştir. Ayrıca, genetik olarak modifiye edilen ADKH'ler in vivo olarak fareler üzerine açılan tam kat yara defektleri üzerine aktarılarak yara iyileşmesi üzerine olan etkileri morfoljik ve histolojik açıdan incelenmiştir. Sonuç olarak, CRISPRa/dCas9 sistemi aracılığıyla ICAM-1 ve/veya E-kaderin genleri ADKH'lerde başarılı bir şekilde aşırı ifade edilerek, bu genlerin ADKH'lerdeki aşırı ifadesinin yüzey adezyon sürelerinde artışa ve yara deneyinde ise proliferasyon ve migrasyon üzerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. ADKH'lerin yara iyileştirici etkilerindeki in vitro bulgulara ek olarak, in vivo hayvan çalışmaları ile de doğrulanmış olup, ADKH'lerin yara boyutunu önemli ölçüde azalttığı ve yara kenarlarından re-epitelizasyonu hızlandırdığı ve vaskülarizasyonu daha erken aşamalarda başlattığı gösterilmiştir. Tüm bu bulgular bir araya getirildiğinde, ADKH'lerde CRISPRa/dCas9 sistemi aracılığıyla ICAM-1 ve/veya E-kaderin genleri aşırı ifade edilmiş ve elde edilen bu hücrelerin artan adezyon özellikleri sayesinde yara bölgesine daha fazla bir biçimde bağlanarak dermal yara iyileşmesini desteklemiştir.

Anahtar Kelimeler: Yara iyileşmesi, Kök hücre, ICAM-1, E-Kaderin, CRISPRa/dCas9

2025, 195 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

Sevinç BATIR

Manisa Celal Bayar University

Graduate School of Education

Department of Biology

Supervisor: Prof. Feyzan ÖZDAL KURT

Cell adhesion molecules are proteins that bind to the surface of cells. These proteins play a vital role in tissue wound healing by binding to other cells or the extracellular matrix. Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and Epithelial Cadherin (E-cadherin), which belong to the extracellular matrix family, play a key role in wound healing in skin tissue. Stem cells and CRISPR/Cas systems have been increasingly utilized in the treatment of dermal wounds in recent years, within the scope of tissue engineering and regenerative medicine. In this study, adipose tissue stem cells (ADSCs) were obtained from mice, and their characterization was investigated using inverted phase-contrast microscopy, and flow cytometry. The ICAM-1 and/or E-cadherin genes in these cells were overexpressed using the lentiviral-mediated CRISPRa/dCas9 system. The effects of overexpression of these genes on gene expression, viability, adhesion, proliferation, and migration of ADSCs were investigated in vitro using inverted fluorescence phase-contrast microscopy, RT-qPCR, and flow cytometry. Furthermore, genetically modified ADSCs were transplanted into full-thickness wound defects in vivo, and their effects on wound healing were examined both morphologically and histologically. In conclusion, ICAM-1 and/or E-cadherin genes were successfully overexpressed in ADSCs using the CRISPRa/dCas9 system. Overexpression of these genes in ADSCs resulted in increased surface adhesion times, as well as enhanced proliferation and migration in the wound assay. In addition to the in vitro findings on the wound-healing effects of ADSCs, in vivo animal studies have also confirmed that ADSCs significantly reduce wound size, accelerate reepithelialization from wound edges, and initiate vascularization at earlier stages of wound healing. Taken together, these findings suggest that overexpressing ICAM-1 and/or E-cadherin genes in ADSCs via the CRISPRa/dCas9 system significantly enhanced the adhesion properties of these cells, resulting in increased binding to the wound site and significantly support dermal wound healing.

Keywords: Wound healing, stem cell, ICAM-1, E-Cadherin, CRISPRa/dCas9

2025, 190 pages

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında CRISPRa/dCas9 gen düzenleme sistemi aracılığıyla ICAM-1 ve E-kaderin genlerinin aşırı ifade edildiği fare adipoz doku kök hücrelerinin yara iyileşmesi üzerine etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Birinci bölümde kök hücreler, yara iyileşmesi, hücre adezyon molekülleri ve CRISPR/Cas sistemi ile ilgili literatürler taranarak özetlenmiştir.

İkinci bölüm olan materyal ve yöntemlerde kullanılan malzeme ve kitler belirtilmiş yapılan tüm deneysel çalışmalar ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Üçüncü bölüm bulgular ve tartışmada ise ikinci bölümde ayrıntılı olarak belirtilen deneysel çalışmalar ile ilgili elde edilen veriler açıklanarak değerlendirilmiş ve literatürle karşılaştırmalar yapılarak tartışılmıştır.

Doktora tez çalışmam süresince akademik gelişimime değerli katkıları, bilgi, deneyim ve yönlendirmeleri ile yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT'a,

Deneysel çalışmalarımı yürütme fırsatı bulduğum laboratuvarının kapılarını açarak bu süreci mümkün kılan Prof. Dr. Fethi Sırrı ÇAM'a, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya ve in vivo deneylerimde ve çalışmalarımnda bilgi ve tecrübesiyle katkı sağlayan Prof. Dr. Gülsüm GENÇOĞLAN'a

Histolojik deneylerim ve çalışmalarım süresince bilgi ve deneyim paylaşımlarıyla katkıda bulunan Araş. Gör. Dr. M. Yusuf PEKMEZCİ'ye

Tez sürecindeki yoğun ve zorlu dönemlerde manevi desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ayşe DUMAN'a, Ayşegül DURAK'a ve Burcu ORMAN DAĞDEVİREN'e gönülden teşekkür ederim.

Bu uzun ve zorlu süreç boyunca sabrı, sevgisi ve bana olan inancıyla her zaman yanımda olan, en büyük destekçim sevgili eşim M. Burak BATIR'a varlığıyla hayatımızı güzelleştiren biricik kızım Ece'ye ve her koşulda desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Sevinç BATIR

Manisa, 2025

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	Mikrolitre
67NR	Fare Meme Kanseri Hücre Hattı
AAV	Adeno ilişkili virüsler
ADMKH	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
AK	Alizarin Kırmızısı
ALP/ VK	Alkalen Fosfataz /Von Kossa
AV	Adenovirüs
BrdU	5-Bromo-2'-deoksiuridin
Ca⁺²	Kalsiyum
Cas9	CRISPR ilişkili protein 9
Cascade	CRISPR ile ilişkili antiviral savunma kompleksi kaskadı
CD	Hücre yüzey farklılaşma antijenleri
CRISPR	Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri
CRISPRa	CRISPR aktivatör
CRISPRi	CRISPR interferansı
crRNA	CRISPR RNA
CXCR4	C-X-C Motif kemokin reseptörü 4
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler desenler
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dCas9	Ölü CRISPR ilişkili protein 9
Dk	Dakika
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
DSB	Çift iplikli kırığı
ECM	Ekstrasellüler matriks

EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFα	Ökaryotik translasyon uzama faktörü alfa
FBS	Fetal sığır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GFP	Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
Gr	Gram
gRNA	Rehber RNA
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
H&E	Hematoksilen-Eozin
HEK293T	İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı
HepG2	İnsan hepatosellüler karsinoma hücre hattı
HKH	Hematopoietik kök hücre
ICAM	Hücreler arası adezyon molekülü
ICAM-1	Hücrelerarası adezyon molekülü 1
IgCAM	İmmüoglobulin süper ailesi hücre adezyon moleülleri
IGF	İnsülin büyüme faktörü
IgSF	İmmüoglobulin süper ailesi
IL-1	İnterlökin-1
JAM	Bağlantı adezyon moleülleri
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
LB	Luria Bertani
LFA-1	Lenfosit fonksiyon ilişkili antijen
LNP	Lipid bazlı nanopartikül
LTR	Uzun terminal tekrar (long terminal repeat)

LV	Lentivirüs
Mg⁺²	Magnezyum
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
microRNA	Mikro ribonükleik asit
MKH	Mezenkimal kök hücre
MI	Mililitre
MMP	Matriks metalloproteinazları
MOI	Enfeksiyon verimliliği (Multiplicity of infection)
NCAM	Nöral hücre adezyon molekülü
PAM	Protospacer bitişik motif
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PE	Fikoeritrin
PFA	Paraformaldehit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
ROS	Reaktif oksidatif stres
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT-qPCR	Real-Time qPCR
sgNT	Hedefsiz sgRNA
Skov-3	İnsan yumurtalık kanseri hücre hattı
Sn	Saniye
ssDNA	Tek zincirli DNA
TCR	T hücresi reseptör
TEM	Transendotelyal migrasyon

TGF- α	Dönüştürücü büyüme faktörü alfa
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TIMP	Metalloproteinazların doku inhibitörü
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
TracrRNA	Trans-aktive edici crRNA
uPKH	Uyarılmış pluripotent kök hücreler
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülleri
VCAM-1	Vasküler hücre yapışma molekülü 1
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
α-MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
α-SMA	α -düz kas aktin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri	5
Şekil 2. Embriyonik kök hücrelerin blastosist evresindeki iç hücre kitlesinden elde edilmesi ve üç germ yaprağına farklılaşarak çeşitli hücre tiplerinin ve organoid yapıların oluşumu.....	7
Şekil 3. Epidermis ve dermis tabakalarının yapısal organizasyonu.....	12
Şekil 4. Yara iyileşmesi basamakları	14
Şekil 5. Nötrofillerin Yaralanma Bölgesine Yönlendirilmesinde Rol Oynayan Moleküler Sinyaller.....	16
Şekil 6. CRISPR-Cas9 bağışıklığının şematik gösterimi.....	28
Şekil 7. Cas 9 nükleaz domainleri ve kesim bölgeleri (Liao ve ark., 2024).	30
Şekil 8. CRISPR-Cas9 sistemine bağlı çift iplikli DNA kırıklarının NHEJ ve HDR tamir mekanizması aracılığıyla onarılması.	31
Şekil 9. a) CRISPRi: dCas9, baskılayıcı domain KRAB ile birleştirilerek hedef genin transkripsiyonu baskılanır. (b) CRISPRa: dCas9, aktivasyon domaini VP64 ile kaynaştırılarak gen ekspresyonu artırılır. (c) DNA Metilasyonu: dCas9, DNA metiltransferaz DNMT3 enzimi ile birleştirilerek hedef DNA bölgesine metil grubu eklenir ve gen ifadesi susturulur. (d) Histon Modifikasyonu: dCas9, histon asetiltransferaz p300 ile kaynaştırılarak histon proteinlerine asetil grubu eklenir, bu da gen ekspresyonunu artıran epigenetik değişikliklere yol açar	33
Şekil 10. Virüsler aracılığıyla CRISPR-Cas sisteminin taşınması	35
Şekil 11. CRISPR bileşenlerinin mikroenjeksiyon yöntemiyle hücreye aktarılması.	36
Şekil 12. Elektroporasyon yöntemiyle CRISPR bileşenlerinin hücreye aktarılması..	37
Şekil 13. lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro plazmid iskelet yapısı ve bulundurduğu gen kasetleri.	49
Şekil 14. lentiGuide-Hygro-eGFP plazmid iskelet yapısı ve bulundurduğu gen kasetleri	50
Şekil 15. Dizayn edilen sgRNA'ların hedef E-Kaderin promotor bölgesindeki bağlanma yerleri.....	52
Şekil 16. Dizayn edilen sgRNA'ların hedef ICAM1 promotor bölgesindeki bağlanma yerleri.	52
Şekil 17. Koloni PCR aşamalarının gösterimi.	57
Şekil 18. 24 gözlü hücre kültür kabında duplike oran için hazırlanan transfeksiyon karışım maddeleri ve miktarları.	61
Şekil 19. HEK293T hücrelerinin 1272 cm ² yüzey alanına sahip hücre kültür kabına pasajlanması.	64
Şekil 20. HEK293T hücrelerinin 10 cm'lik hücre kültür kaplarına ekilmesi.	65
Şekil 21. Lentiviral karışımların 24 gözlü hücre kültür kaplarına aktarılması.	71
Şekil 22. BALB/c farelerin tüylerinin temizlenmesi.	74
Şekil 23. Farelerde tam kat deri defekti oluşturulması ve silikon simitler ile yara kenarlarının sabitlenmesi.	75
Şekil 24. ADKH'lerinin ters faz kontrast mikroskop görüntüleri.....	80
Şekil 25. ADKH'lerde P0'da gerçekleştirilen Oil Red O boyama sonuçlarının ters faz kontrast mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).....	81

Şekil 26. 3. ve 5. pasajdaki ADKH CD44, CD90, CD34 ve CD45 yüzey markır ekspresyonlarının akış sitometrisi analizi.	82
Şekil 27. A) 3. Pasajda ADKH’lerde CD yüzey markırlarının IF analizi ile değerlendirilmesi. B) 5. Pasajda ADKH’lerde CD yüzey markırlarının IF analizi ile değerlendirilmesi. (10X Büyütme).....	83
Şekil 28. ADKH’lerde osteojenik farklılaştırma sonrası osteoblastik markır olarak osteokalsin ekspresyonunun IF analizi.....	85
Şekil 29. ADKH’lerde osteojenik farklılaştırma sonrası osteoblastik markır olarak osteonektin ekspresyonunun IF analizi. (.....	86
Şekil 30. Osteojenik farklılaştırılan ve kontrol ADKH’lerde 7., 14. ve 21. günlerde gerçekleştirilen ALP/Von Kossa boyama sonuçlarının ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri.	88
Şekil 31. ADKH’lerde osteojenik farklılaştırma sonrası kalsiyum birikiminin AK boyaması ile değerlendirilmesi.	89
Şekil 32. EkaderinsgRNA1, EkaderinsgRNA2, EkaderinsgRNA3, ICAM1sgRNA1, ICAM1sgRNA2 ve sgNT sgRNA duplekslerinin hedef plazmid bölgesine doğru bir şekilde bağlandığını gösteren sanger elektroferogramı.....	90
Şekil 33. 67NR hücrelerinde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile ICAM1 ve E-kaderin geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçları analizi (ortalama $\pm$ SD, n=3).	92
Şekil 34. Transfeksiyon işlemleri sonrası HEK293T hücrelerinde GFP sinyalleri. ..	93
Şekil 35. ADKH’lerde farklı puromisin konsantrasyonlarının 72 saatlik kültür sürecinde hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesine ait ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri.....	94
Şekil 36. Lentiviral reverse transdüksiyon ile aşırı ifade edilen ADKH.	95
Şekil 37. ADKH’lerde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemiyle gerçekleştirilen lentiviral reverse transdüksiyon sonrası ICAM1 ve E-kaderin genlerine ait kontrole göre orantılanmış mRNA ekspresyon düzeylerinin RT-qPCR ile analizi analizi (ortalama $\pm$ SD, n=3). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (*p < 0.0001).	98
Şekil 38. ADKH’lerde farklı lentiviral gen aktarımı grupları.....	101
Şekil 39. ADKH’lerde negatif kontrol grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri.	103
Şekil 40. ADKH’lerde NT pozitif kontrol grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri.	104
Şekil 41. ADKH’lerde ICAM1 aşırı ifade grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri.	105
Şekil 42. ADKH’lerde E-kaderin aşırı ifade grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri.	106
Şekil 43. ADKH’lerde ICAM1+E-kaderin aşırı ifade grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri.....	107
Şekil 44. ADKH gruplarının yara iyileşmesi sürecindeki etkilerini gösteren ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri.....	110
Şekil 45. Fare sırtında oluşturulan yara modeline, genetik olarak modifiye edilmiş ADKH’lerin uygulanması sonrası görünüm.	111
Şekil 46. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH’lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyama görüntüleri ve epiteliyal kapanmanın zamana bağlı değerlendirilmesi.....	116
Şekil 47. 3. gün sonunda yara bölgesindeki BrdU işaretli ADKH’lere ait IF görüntüleri.....	118

Şekil 48. 7. günde fare yara bölgelerine implante edilen ADKH'lerin farklı gruplardaki zamana bağlı BrdU-pozitifliklerinin değerlendirilmesi.	119
Şekil 49. 15. günde fare yara bölgelerine implante edilen ADKH'lerin farklı gruplardaki zamana bağlı BRDU-pozitifliklerinin değerlendirilmesi.....	120
Şekil 50. 21. günde fare yara bölgelerine implante edilen ADKH'lerin farklı gruplardaki zamana bağlı BrdU-pozitifliklerinin değerlendirilmesi.....	121
Şekil 51. 3. gün sonunda yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri	124
Şekil 52. 7. gün sonunda yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri	127
Şekil 53. 15. gün sonunda yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri.	130
Şekil 54. 21. gün sonunda yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri.	133
Şekil 55. Gruplara göre zaman içinde IL-10 ekspresyon düzeylerinin normalize edilmemiş değerleri (FITC yoğunluğu $\pm$ SD)	135
Şekil 56. Farklı genetik modifikasyonlara sahip ADKH'lerin yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna etkisi (3., 7., 15. ve 21. günlerde Relatif FITC yoğunluğu $\pm$ SD)... ..	136
Şekil 57. 3. gün sonunda yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri.	139
Şekil 58. 7. gün sonunda yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri.	142
Şekil 59. 15. gün sonunda yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri.	145
Şekil 60. 21. gün sonunda yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri	148
Şekil 61. Gruplara göre zaman içinde TNF- α ekspresyon düzeylerinin normalize edilmemiş değerleri (FITC yoğunluğu $\pm$ SD).	150
Şekil 62. Farklı genetik modifikasyonlara sahip ADKH'lerin yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna etkisi	151
Şekil 63. 3. gün sonunda yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna ait IF görüntüleri (10X Büyütme) ve kantitatif analiz verileri.	153
Şekil 64. 7. gün sonunda yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri.	156
Şekil 65. 15. gün sonunda yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri.	159
Şekil 66. 21. gün sonunda yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri.	162
Şekil 67. Gruplara göre zaman içinde MMP-2 ekspresyon düzeylerinin normalize edilmemiş değerleri (FITC yoğunluğu $\pm$ SD).	164
Şekil 68. Farklı genetik modifikasyonlara sahip ADKH'lerin yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna etkisi	165
Şekil 69. İn vivo olarak fareler üzerinde genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin uygulandığı yara bölgelerinin 3., 7., 15. ve 21. günlerdeki kapanma oranlarının analizi.....	167

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan reaktifler, malzemeler ve ekipmanlar.....	39
Tablo 2. sgRNA'ların nükleotid dizilimleri ve E-kaderin ve ICAM1 promotor bölgesi üzerindeki bağlanma noktaları.* TSS: Transcription Start Site.....	53
Tablo 3. Hedef Gen ve sgRNA ileri ve geri nükleotid dizileri.....	54
Tablo 4. T4 PNK için gereken reaksiyon bileşenleri.	55
Tablo 5. Golden Gate klonlama reaksiyon bileşenleri.	55
Tablo 6. Golden Gate klonlama ısı koşulları.....	56
Tablo 7. Küçük ölçek plazmid PCR reaksiyon bileşenleri.....	58
Tablo 8. PCR döngü koşulları	58
Tablo 9. Sanger sekans PCR reaksiyon bileşenleri.	59
Tablo 10. PCR döngü koşulları.	59
Tablo 11. Duplike oran için hazırlanan transfeksiyon karışım maddeleri ve miktarları.	61
Tablo 12. E-kaderin ve ICAM1 mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla kullanılan primerlerin nükleotid dizileri.....	63
Tablo 13. Lentivirüs üretimi için gerekli olan HEK293T hücre ekimi yapılmış toplamda 24 hücre kültür kabı için dört farklı plazmid setinin kullanımını ve her bir sette yer alan plazmidlerin miktarları. Her bir grup 6 kültür kabından oluşmaktadır.....	66
Tablo 14. EkaderinsgRNA1, ICAM1sgRNA1, sgNT ve dCas9puro lentiviral stok çözeltilerinin her biri için aşağıdaki gibi onluk ardışık dilüsyonlar hazırlandı.....	67
Tablo 15. Lentiviral titre tayini için kullanılan primer dizileri.	68
Tablo 16. ADKH'lerde E-kaderin ve ICAM1 genlerinin aşırı ifade analizi çalışma grupları.	70
Tablo 17. İn vivo çalışma grupları.	75
Tablo 18. IF boyama için kullanılan primer antikorlar.	78
Tablo 19. 67NR hücrelerinde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile ICAM1 geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçlarının gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.	91
Tablo 20. 67NR hücrelerinde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile E-kaderin geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçlarının gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.	91
Tablo 21. ADKH'lerde E-kaderin ve ICAM1 genlerinin aşırı ifade analizi çalışma grupları.....	95
Tablo 22. ADKH'lerde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile ICAM1 geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçlarının gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.	97
Tablo 23. ADKH'lerde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile E-kaderin geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçlarının gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.	97
Tablo 24. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyaması ile zamana bağlı elde edilen 3. güne ait epitelial tabaka kapanma verilerinin gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.	114
Tablo 25. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyaması ile zamana bağlı elde edilen 7. güne ait epitelial tabaka kapanma verilerinin gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.	114

Tablo 26. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyaması ile zamana bağlı elde edilen 15. güne ait epiteliyal tabaka kapanma verilerinin gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.	115
Tablo 27. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyaması ile zamana bağlı elde edilen 21. güne ait epiteliyal tabaka kapanma verilerinin gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.	115



İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	XI
İÇİNDEKİLER	XIII
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	3
1.1. Kök Hücre Tanımı ve Özellikleri.....	3
1.1.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	4
1.1.1.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler	4
1.1.1.1.1. Totipotent Kök Hücreler.....	4
1.1.1.1.2. Pluripotent Kök Hücreler.....	4
1.1.1.1.3. Multipotent Kök Hücreler	5
1.1.1.1.4. Oligopotent Kök Hücreler	5
1.1.1.1.5. Unipotent Kök Hücreler	6
1.1.1.2. Elde Edildikleri Kaynaklarına Göre Kök Hücreler	6
1.1.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler	6
1.1.1.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler.....	7
1.1.1.2.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler.....	8
1.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımını Destekleyen Biyolojik Özellikler	9
1.1.3. Kök Hücrelerin Klinik Kullanımının Avantaj ve Dezavantajları .	10
1.2. Deri Dokusu: Yapısı ve Fonksiyonları	11
1.2.1. Yara ve İyileşme Mekanizmaları	12
1.2.1.1. Hemostazis Fazı	14
1.2.1.2. İnflamatuvar Faz	15
1.2.1.3. Proliferasyon Fazı	17
1.2.1.4. Yeniden Şekillenme Fazı	18
1.2.2. Kök Hücrelerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri.....	19
1.3. Hücre Adezyon Molekülleri	20
1.3.1. Kaderinler	21

1.3.2. İntegrinler.....	23
1.3.3. Selektinler	24
1.3.4. İmmunoglobulin (Ig) Süperailisi	24
1.4. Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri (CRISPRs) ve İlişkili Cas Enzimleri ile Genom Düzenleme Mekanizmaları.....	26
1.4.1. Adaptasyon	28
1.4.2. Ekspresyon.....	29
1.4.3. Müdahale (İnterference).....	29
1.4.4. Ökaryotlarda CRISPR/Cas9 Sistemi ve Programlanabilir Genom Düzenleme	29
1.4.5. Cas9 Aracılı Gen İfadesinin Düzenlenmesi ve Epigenetik Modifikasyonlar.....	31
1.4.6. CRISPR-Cas Sistemlerinde Moleküler ve Fiziksel Taşıyıcılar	33
1.4.7. CRISPR/Cas Sistemlerinin Moleküler Sınırlamaları.....	37
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	39
2.1. Materyal.....	39
2.1.1. Etik Kurul İzni ve Hayvan Materyali Temini	39
2.1.2. Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonlar ve Kitler	39
2.2. Yöntemler	44
2.2.1. Fare Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, İzole Edilen Hücrelerin Kültürü ve Pasajlanması.....	44
2.2.2. Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	45
2.2.2.1. Oil Red O Boyama	45
2.2.2.2. Akış Sitometrisi ile Adipoz Doku Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	45
2.2.2.3. İmmüno Floresan Boyama ile Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	46
2.2.3. Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırılması.....	46
2.2.3.1. İmmüno Floresan Yöntem.....	47
2.2.3.2. Histokimyasal Yöntemler.....	47
2.2.3.2.1. Alkalen Fosfataz /Von Kossa (ALP/ VK) Boyaması	47
2.2.3.2.2. Alizarin Kırmızısı (AK) Boyaması.....	48
2.2.4. Çalışma için Uygun CRISPRa/dCas9 Plazmid Seçimi.....	48

2.2.4.1. lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro ve lentiGuide-Hygro-eGFP Plazmidlerinin Çoğaltımı ve Küçük Ölçek Plazmid İzolasyonu	50
2.2.4.2. ICAM1 ve E-Kaderin Hedef Genlerinin Promotor Bölgelerine Özgü gRNA'ların Dizaynı ve Dizayn Edilen sgRNA'ların lentiGuide-Hygro-eGFP Plazmidine Klonlanması	51
2.2.4.3. sgRNA Plazmidlerinin Transformasyonu, EndoFree Plazmid İzolasyonu ve Sekans Analizi	56
2.2.4.4. Fare Meme Kanseri Hücre Hattında (67NR) E-kaderin ve ICAM1 Gen Promotorlarını Hedefleyen sgRNA Plazmidlerinin dCas9-Puro ile Transfeksiyonu ve Real-Time qPCR (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyon Analizi	60
2.2.4.5. Lentiviral Transfeksiyon İçin İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı (HEK293T) Hücrelerinin Hazırlanması ve İlgili Plazmidlerin Transfeksiyonu.....	63
2.2.4.6. RT-qPCR Tabanlı Lentiviral Titrasyon Analizi ve Enfeksiyon Verimliliği (Multiplicity of infection/MOI) Değerinin Belirlenmesi	67
2.2.4.7. ADKH'lerde Optimal Puromisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	69
2.2.4.8. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin ADKH'lerde Lentiviral Reverse Transdüksiyon Yoluyla Aşırı İfade Edilmesi.....	70
2.2.4.9. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerde E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR Analizi	72
2.2.4.10. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerinin Ekildikleri Kültür Ortamındaki Adezyon ve Canlılık Deneyleri	72
2.2.4.11. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerde Tutunma Sürecinin Morfolojik Analizi.....	73
2.2.4.12. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği Adipoz Doku Kaynaklı Hücrelerin In Vitro Yara İyileşme Modelinde Etkinliğinin İncelenmesi	73
2.2.4.13. Fare Yara Modeli Oluşturulması ve E-kaderin ve ICAM-1 Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerin Oluşturulan Yara Bölgesine İmplantasyonu	73
2.2.4.14. E-kaderin ve ICAM-1 İfade Seviyesi Artırılmış ADKH'lerin Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin Histolojik ve İmmunofloresan Olarak Değerlendirilmesi.....	76
2.2.4.14.1. Dokuların Parafin Bloklara Gömülmesi	76

2.2.4.14.2. Hematoksilen-Eozin Boyama	76
2.2.4.14.3. E-kaderin ve ICAM-1 İfade Seviyesi Artırılmış ADKH'lerin Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin İmmunofloresan Olarak Değerlendirilmesi	77
2.2.4.15. Makroskopik İncelemeler ve Yara Kapanma Hızı Tayini....	78
2.2.4.16. İstatistiksel Analizler	79
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	80
3.1. Bulgular	80
3.1.1. Fare Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, İzole Edilen Hücrelerin Kültürü ve Pasajlanması.....	80
3.1.2. Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	80
3.1.2.1. Oil Red O Boyama	80
3.1.2.2. Akış Sitometrisi ile Adipoz Doku Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	81
3.1.2.3. İmmunofloresan Boyama ile Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	82
3.1.3. Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırılması	84
3.1.3.1. İmmunofloresan Yöntem	84
3.1.3.2. İmmunositokimyasal Yöntemler	87
3.1.3.2.1. Alkalen Fosfataz /Von Kossa (ALP/ VK) Boyaması	87
3.1.3.2.2. Alizarin Kırmızısı Boyaması	88
3.1.4. sgRNA Duplekslerinin Klonlandığı Plazmidlerin Klonlama Bölgelerinin Sanger Sekans Analizi	89
3.1.5. Fare Meme Kanseri Hücre Hattında (67NR) E-kaderin ve ICAM1 Gen Promotorlarını Hedefleyen sgRNA Plazmidlerinin dCas9-Puro ile Transfeksiyonu ve Real-Time qPCR (RT-qPCR) ile Gen İfade Analizi.....	90
3.1.6. Lentiviral Transfeksiyon İçin İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı (HEK293T) Hücrelerinin Hazırlanması ve İlgili Plazmidlerin Transfeksiyonu.	92
3.1.7. ADKH'lerde Optimal Puromisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	93
3.1.8. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin ADKH'lerde Lentiviral Reverse Transdüksiyon Yoluyla Aşırı İfadesi.....	94
3.1.9. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı ifade Edildiği ADKH'lerde E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin İfade Seviyelerinin RT-qPCR Analizi.....	96

3.1.10. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerin Ekildikleri Kültür Ortamındaki Adezyon ve Canlılık Deneyleri.....	98
3.1.11. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerde Tutunma Sürecinin Morfolojik Analizi	102
3.1.12. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği Adipoz Doku Kaynaklı Hücrelerin In Vitro Yara İyileşme Modelinde Etkinliğinin İncelenmesi	108
3.1.13. Fare Yara Modeli Oluşturulması ve E-kaderin ve ICAM-1 İfade Seviyesi Artırılmış ADKH'lerin Oluşturulan Yara Bölgesine İmplantasyonu	111
3.1.15. E-kaderin ve ICAM-1 İfade Seviyesi Artırılmış ADKH'lerin Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin Histolojik ve İmmüno Floresan Olarak Değerlendirilmesi.....	112
3.1.15.1. Hematoksilen-Eozin Boyama ile Elde Edilen Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi.....	112
3.1.15.2. Fare Yara Bölgelerine İmplant Edilen BrdU İşaretli ADKH'lerin Zaman Serisine Dayalı Değerlendirmesi	117
.....	119
3.1.15.3. E-kaderin ve ICAM-1 Aşırı İfadeli ADKH'lerin Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin İmmüno Floresan Olarak Değerlendirilmesi ..	121
3.1.16. Makroskopik İncelemeler ve Yara Kapanma Hızı Tayini	165
3.2. TARTIŞMA.....	169
4. SONUÇ ve ÖNERİLER	178
KAYNAKLAR.....	179

GİRİŞ

Günümüzde modern tıp, biyoteknoloji ve moleküler biyoloji alanlarındaki gelişmeler, hastalıkların daha etkin tedavisi ve doku rejenerasyonu alanında önemli ilerlemelere imkân vermektedir. Yenilikçi tedavi yöntemlerinden biri olan kök hücre temelli yaklaşımlar son yıllarda özellikle yara iyileşmesine yönelik tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır. Kök hücrelerin kendini yenileyebilme ve çok yönlü farklılaşma özellikleriyle hem temel biyolojik süreçlerin anlaşılmasında hem de yenileyici tıp uygulamalarında stratejik bir konuma sahiptir (Poliwoda ve ark., 2022; Caplan ve Dennis, 2006). Kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve sinyal yanıt mekanizmaları, doku hasarının giderilmesi ve yeniden yapılanma süreçlerinde etkili olmalarını sağlar. Özellikle mezenkimal kök hücrelerin (MKH), immünmodülatör etkileri ve parakrin sinyaller aracılığıyla yara iyileşmesinin tüm evrelerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Jo ve ark., 2021; Chen ve ark., 2008). Kök hücreler, embriyonik ve erişkin dokularda farklı kaynaklardan elde edilebilirken, sahip oldukları farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Erceg Ivkošić ve ark., 2023; Goodman, 2021).

Yara iyileşmesi, immün hücreler, fibroblastlar, keratinositler ve endotelial hücreler gibi çok sayıda hücrenin birlikte çalıştığı, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme olmak üzere dört ardışık fazdan oluşan hücresel ve moleküler etkileşimleri içeren kompleks bir süreçtir (Takeo, Lee ve Ito, 2015; Raziyeve ve ark., 2021).

Hücre adezyon molekülleri hücrelerin hem birbirleriyle hem de çevreleri ile olan etkileşimlerini düzenleyen önemli yapısal ve fonksiyonel öğelerden biridir. Hücre adezyon molekülleri, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matris arasındaki bağlantıları sağlayarak embriyogenez, doku bütünlüğü, hücre polaritesi, sinyal iletimi ve yara onarımı gibi hayati süreçlerde kritik rol oynar (Makrilia ve ark., 2009; Mui, Chen ve Assoian, 2016). Kaderinler, integrinler, selektinler ve immünoglobulin süper ailesi üyeleri gibi adezyon molekülleri yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, özellikle hücre göçü, epitelizasyon, anjiyogenez ve doku yeniden yapılanması yönünde önem taşır (Janiszewska ark., 2020; Hintermann ve Christen, 2019).

Özellikle E-kaderin, epitel bütünlüğünün korunması ve hücre polaritesinin sağlanmasında anahtar rol oynarken; yara sürecinde geçici olarak azalması, epitel

hücrelerinin göç etmesini kolaylaştırır ve bu sayede yeniden epitelizasyonu destekler (Yang ve ark., 2019; Niessen, ve ark., 2011). Aynı şekilde integrinler, fibroblast migrasyonu ve ekstrasellüler matriks (ECM) yeniden organizasyonu gibi olaylarda kritik görevler üstlenir (Makrilia ve ark., 2009; Yang ve ark., 2019). ICAM-1 ve VCAM-1 gibi immünoglobulin süper ailesi üyeleri ise immün hücrelerin yara bölgesine yönlendirilmesinde ve inflamatuvar dengenin düzenlenmesinde rol alarak iyileşmenin immünolojik boyutunu şekillendirir (Hintermann ve Christen, 2019; Bui, ve ark., 2020).

Kök hücreler yara iyileşmesi sürecine sadece farklılaşma potansiyelleri ile değil aynı zamanda yara mikroçevresinde adezyon molekülleri aracılığıyla kurdukları etkileşimlerle katkı sağlamaktadır (Hur Y., 2024). Hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarının düzenlenmesi, kök hücrelerin tutunma, göç ve hedef dokuya entegrasyon süreçlerinde belirleyici olmaktadır (Li, ve ark., 2012; Arslan ve ark., 2021).

Son yıllarda düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPRs) ve ilişkili Cas enzimleri sistemlerinin keşfiyle birlikte, bu moleküler düzeydeki süreçlere yönelik hedeflenmiş müdahaleler mümkün hale gelmiştir (Xue ve ark., 2021). CRISPR tabanlı gen düzenleme teknolojileri, kök hücrelerin genetik modifikasyonunda, adezyon moleküllerinin ifadesinin düzenlenmesinde ve yara iyileşmesiyle ilişkili sinyal yollarının modülasyonunda etkin bir araç olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2017). dCas9 aracılığıyla kök hücrelerde gerçekleştirilen hedef genlerin transkripsiyonel olarak aktive edilmesi ya da baskılanması aracılığıyla, hücre temelli tedavilerin etkinliği artırılmaktadır (Zhang ve ark.,2017).

Bu tez çalışmasında, kök hücrelerin biyolojik özellikleri, hücre adezyon moleküllerinin yara iyileşmesindeki işlevleri ve CRISPR/Cas sistemlerinin genetik müdahale potansiyelinin bütüncül bir yaklaşımla incelenmesi amaçlanmıştır. Literatürdeki bilgiler doğrultusunda, kök hücre temelli tedavilerin ve moleküler düzeyde gen düzenleme stratejilerinin yara iyileşmesi süreçlerine etkisi çok boyutlu olarak değerlendirilmiştir.

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kök Hücre Tanımı ve Özellikleri

Kök hücreler, organizmaların gelişiminde ve doku yenilenmesinde kritik rol oynayan, kendini yenileme kapasitesine sahip ve farklı hücre tiplerine dönüşme potansiyeli taşıyan özelleşmemiş hücre popülasyonlarıdır. Bu hücreler, uygun çevresel ve moleküler koşullar altında belirli hücre soylarına farklılaşarak homeostazın sürdürülmesine, doku onarımına ve rejeneratif süreçlerin düzenlenmesine katkıda bulunur (Poliwoda ve Ark. 2022).

Kök hücreler, vücuttaki diğer hücrelerden bazı temel özellikleriyle ayrılır. Bir hücrenin kök hücre olarak tanımlanabilmesi için beş temel kriteri karşılaması gerekir: (1) Uzun süre boyunca bölünebilme (proliferasyon) ve kendini yenileyebilme (self-renewal) kapasitesine sahip olmak, (2) özelleşmemiş (farklılaşmamış) bir yapıda bulunmak, (3) farklı hücre tiplerine dönüşerek özelleşmiş hücrelere kaynak oluşturabilmek (plastisite, diferansiyasyon), (4) hasar görmüş bir alıcıya nakledildiğinde, orijinal dokunun işlevini sürdürebilecek şekilde çoğalabilmek, (5) canlı organizma içinde doku hasarı olmasa bile farklılaşmamış hücre popülasyonuna katkıda bulunabilmek. (Avcı, 2022). Belirtilen bu özellikler daha çok embriyonik kök hücreleri tanımlasa da erişkin kök hücrelerde aldıkları hücresel sinyaller doğrultusunda osteoblastlar, kondrositler, miyositler, tendon-ligament hücreleri, adipoz hücreleri gibi çeşitli mezenkimal fenotipli hücrelerden birine farklılaşabilirler. Bunlara ek olarak MKH hem parakrin ve otokrin aktivitelere sahip çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri salgılar. (Caplan ve Dennis, 2006).

Kök hücrelerde kendini yenileme (self-renewal), kök hücrelerin bölünerek yeni hücreler üretmesi ve bu sayede kök hücre havuzunun organizmanın yaşamı boyunca devamlılığını sağlaması sürecidir (He, Nakada, ve Morrison, 2009). Kök hücre popülasyonunun sürekliliğini sağlamak amacıyla bu hücrelerde simetrik ve asimetrik bölünme olarak iki farklı bölünme tipi gözlemlenir. Simetrik bölünme sonucunda kök hücre, ya iki özdeş kök hücreye ya da iki farklılaşmış hücreye dönüşebilirken; asimetrik bölünme ile bir kök hücre, biri orijinal kök hücreye özdeş, diğeri ise farklılaşma sürecine giren iki yavru hücre meydana getirir. Simetrik hücre bölünmesiyle kendini yenileme genellikle embriyonik gelişimin erken dönemlerinde, organizmanın vücut boyutunun artması amacıyla geçici kök hücrelerde görülürken;

asimetrik bölünme yoluyla kendini yenileme ise, daha sonraki gelişim evrelerinde ve erişkin organizmalarda homeostazın sağlanması amacıyla kalıcı kök hücrelerde gerçekleşir (Goodman, S. R. (2021).

Kök hücreleri farklılaşmış hücrelerden ayıran ve benzersiz fizyolojik rollerine izin veren özelliklerinden biri olan birden fazla hücre tipine farklılaşma kapasitesine potansi adı verilir. (Poliwoda ve Ark. 2022).

Kök hücrelerin farklılaşma özellikleri aldıkları sinyaller doğrultusunda değişiklik gösterir. Kök hücreler bu farklılaşma potansiyellerine göre ve elde edildikleri kaynaklara göre sınıflandırılırlar.

1.1.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

1.1.1.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler

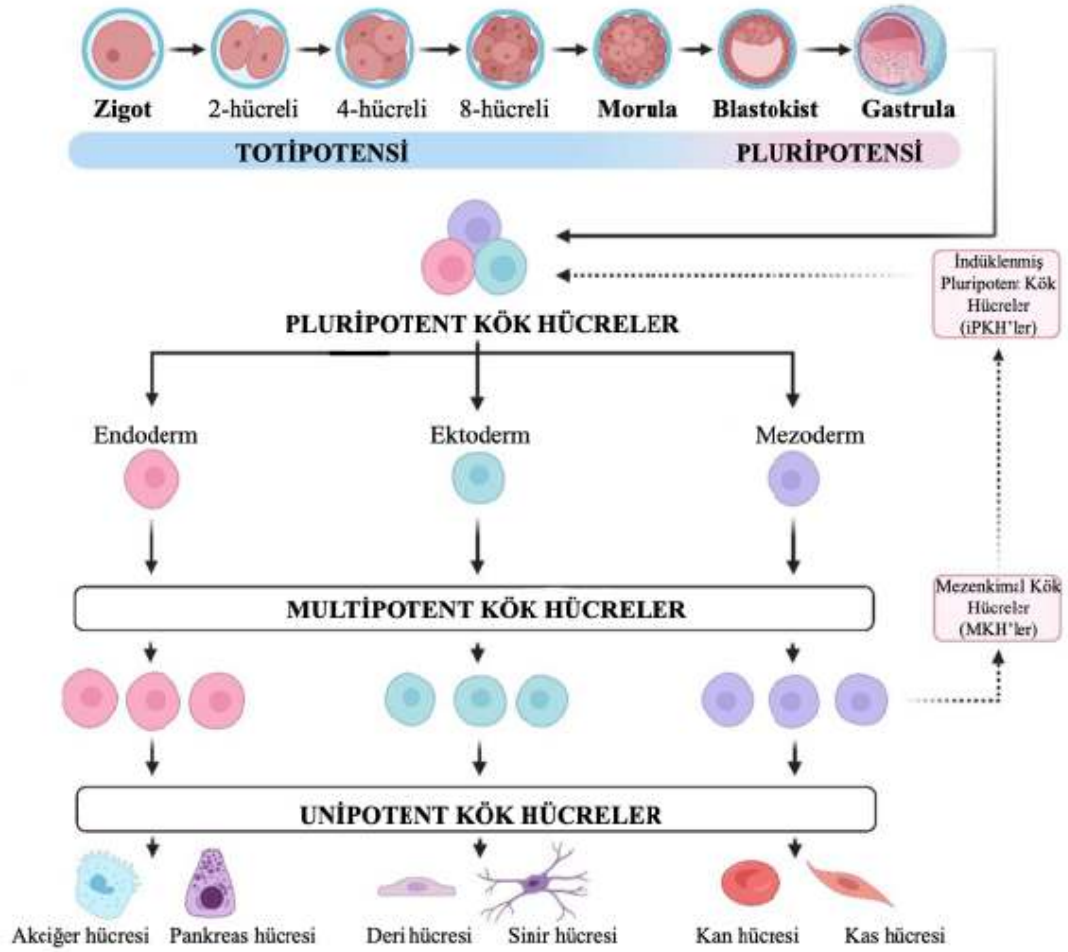
Kök hücrelerin temel özelliklerinden biri olan farklılaşma yeteneği elde edildikleri kaynağa ve zamana bağlı olarak farklılık göstermektedir. Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler beş gruba ayrılarak incelenebilir (Şekil 1) (Erceg Ivkošić ve ark. 2023).

1.1.1.1.1. Totipotent Kök Hücreler

En yüksek farklılaşma kapasitesine sahip totipotent hücreler, canlı organizmayı meydana getirebilecek tüm embriyonik dokulara ve fetal gelişimin devamlılığı için gerekli ekstra embriyonik yapılar olan plasenta, amniyon kesesi gibi yapıları oluşturabilecek hücrelere farklılaşabilen kök hücrelerdir. Bu hücreler sperm ve yumurtanın birleşmesi ile üretilirler. Fertilizasyonun gerçekleşmesi ile meydana gelen zigot ilk totipotent hücredir. (Atasever, ve ark., 2024; Goodman, S. R. 2021).

1.1.1.1.2. Pluripotent Kök Hücreler

Döllenmiş yumurtada gelişimsel evrelerin ilerlemesi ile zigot oluşumunun 4. gününde totipotent hücreler farklılaşma yeteneklerinin bir kısmını kaybederek pluripotent kök hücrelere dönüşmektedirler. Tüm doku ve organların geliştiği 3 germ tabakasına (ektoderm, endoderm ve mezoderm) farklılaşabilen kök hücrelerdir. İndüklenmiş kök hücreler ve embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücre özelliğindedirler (Erceg Ivkošić ve ark. 2023).



Şekil 1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri (Erceg Ivkošić ve ark. 2023'ten değiştirilerek alınmıştır.)

1.1.1.1.3. Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler birkaç hücre soyuna farklılaşabilir ve bulundukları dokuya özgü özelleşmiş hücre tiplerini oluşturabilirler. Multipotent kök hücrelere örnek olan MKH'ler hücreler bağ ve destek dokusuna ait kemik, kıkırdak, kas hücrelerine farklılaşabilir. Hematopoietik kök hücreler ise kan hücrelerine farklılaşabilir, kemik iliği, adipoz doku, göbek kordon kanı ve periferik doku dahil olmak üzere çeşitli dokulardan elde edilebilirler. Bu hücreler adipoz dokusu, kemik, kıkırdak ve kas gibi mezoderm kaynaklı dokulara farklılaşabilirler. (Goodman, S. R. (2021).

1.1.1.1.4. Oligopotent Kök Hücreler

Farklılaşma kapasiteleri oldukça kısıtlı olan oligopotent kök hücreler kendi kendini yenileyebilir ve progenitör hücrelerin belirli birkaç türüne farklılaşabilirler.

Miyeloid kök hücreler bu duruma verilebilecek en iyi örneklerden biridir. Miyeloid kök hücreler sadece beyaz kan hücrelerini oluşturabilecek şekilde özelleşmişlerdir ve kırmızı kan hücrelerine farklılaşamazlar (Johnson ve ark., 2023).

1.1.1.1.5. Unipotent Kök Hücreler

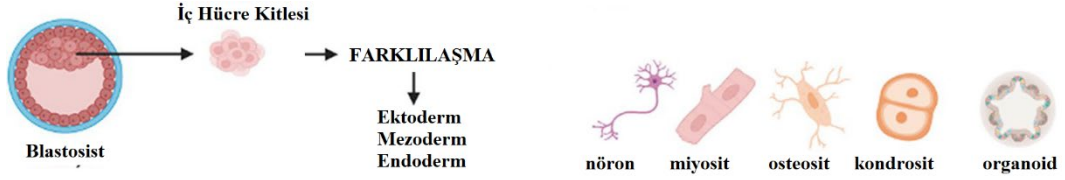
En sınırlı farklılaşma kapasitesine sahip unipotent kök hücreler, yalnızca tek bir hücre tipine farklılaşabilir. Sadece keratinositlere farklılaşabilen epidermal bazal hücreler, iskelet kası hücrelerine farklılaşabilen kas kök hücreleri unipotent hücreye örnektir (Johnson ve ark., 2023).

1.1.1.2. Elde Edildikleri Kaynaklarına Göre Kök Hücreler

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine ek olarak elde edildikleri kaynaklara göre sınıflandırılırlar.

1.1.1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler döllenmeden sonra henüz uterusu tutunmamış embriyonun erken gelişim aşamalarından biri olan blastosistin iç hücre kütesinden elde edilen kendini yenileyebilen ve sınırsız çoğalabilen hücrelerdir. Pluripotent özellik gösterirler ve üç germ tabakasına (ektoderm, mezoderm, endoderm) farklılaşabilirler. Bu hücreler, sınırsız çoğalma kapasitesine sahip olup, çeşitli doku ve organların rejenerasyonunda potansiyel taşırlar. Embriyonik kök hücrelerin, tüm fetal dokulara, erişkin kök hücrelere ve bunların progenitörlerine farklılaşabilmeleri doku veya organ modelleri oluşturmak için kullanılabilmelerine olanak sağlamaktadır (Şekil 2). Ancak, etik tartışmalar ve tümör oluşumu riski gibi dezavantajları bulunmaktadır (Shah ve ark.,2022; Ateş, 2016).



Şekil 2. Embriyonik kök hücrelerin blastosist evresindeki iç hücre kitlesinden elde edilmesi ve üç germ yaprağına farklılaşarak çeşitli hücre tiplerinin ve organoid yapıların oluşumu. (Shah, S., ve ark. 2024'den değiştirilerek alınmıştır.)

1.1.1.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Embriyonik olmayan kök hücreler yetişkin kök hücreleri, hematopoietik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler olarak sınıflandırılabilir.

Yetişkin kök hücreler, bir doku veya organların arasında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Birkaç hücre soyuna (multipotent) ya da tek bir hücre tipiyle sınırlı (unipotent) farklılaşma yeteneğine sahip olan farklılaşmamış hücre gruplarıdır. Yetişkin kök hücrelerinin birincil rolü, dokuları onarmak ve kendi kendini yenilemektir. Multipotent yetişkin kök hücreler arasında hematopoietik, nöronal, intestinal, kardiyak ve MKH'ler bulunurken, unipotent kök hücreler arasında satellit kök hücreleri ve epidermal kök hücreler bulunur (Shah, ve ark., 2024).

Hematopoietik kök hücreler (HKH), kendini yenileme potansiyeline ve tüm hematopoietik soyların farklılaşmış hücrelerini oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir. HKH'ler, esas olarak kemik iliğinde, özellikle pelvis, femur ve sternumda bulunur. Ayrıca göbek kordonu kanında ve az sayıda periferik kanda bulunurlar. HKH'ler hem miyeloid progenitör hem de lenfoid progenitör hücrelerini oluşturabilir (El Barky, Ali, & Mohamed, 2017). Eritrositler, monositler ve makrofajlar, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller, megakaryositler/trombositler ve dendritik hücrelerin hepsi miyeloid progenitör hücrelerinden üretilirler. T ve B lenfositleri, doğal katil hücreleri, lenfoid progenitör hücreler tarafından üretilir (Lathif ve Keerthi, 2023).

Kordon kanından alınan kök hücrelerin benzersiz özelliklerinden biri, çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşma potansiyelidir. Kordon kanında hematopoietik, mezenkimal ve embriyonik benzeri kök hücreler olmak üzere üç farklı kök hücre türü bulunabilir. Bu hücre tiplerinin hepsi kendilerini yenileyebilmekle kalmaz, aynı zamanda karmaşık sayıda sinyal yolu aracılığıyla birçok farklı olgun hücre tipine farklılaşabilirler (Lathif ve Keerthi, 2023).

MKH'ler mezodermal (adipositler, osteositler ve kondrositler), ektodermal (nörositler) ve endodermal soya ait hücrelere (hepatositler) farklılaşma yeteneğine sahip hematopoietik olmayan multipotent kök hücreler olarak tanımlanabilir (Mishra ve ark., 2020). İnsan kemik iliği araştırmalarıyla ilgili çalışmalardan sonra endometriyum, diş pulpası dokuları, iskelet kasları, plasenta, adipoz dokusu, göbek kordonu kanı ve Wharton jeli gibi başka MKH kaynaklarında keşfedilmiştir. Kaynağından izole edilen MKH'lerin karakterize edilebilmesi için üç önemli özelliğe sahip olmaları gerekmektedir. Birincisi, uygun şartlar altında MKH'ler plastik bir kültür kabına yapışmalı ve çoğalmalıdır. İkincisi, MKH'ler hücre yüzey farklılaşma antijenleri (CD) olarak CD73, CD90 ve CD105'e sahip olmalıdır. Ayrıca, hematopoietik kök hücre antijenleri olan CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79α ve HLA-DR antijenleri MKH'ler üzerinde bulunmamalıdır. Üçüncüsü, MKH'ler in vitro osteoblastlara, adipoz hücrelerine ve kondrositlere farklılaşabilmelidir. MKH'ler salgılamış oldukları sitokinler ve kemokinler gibi mediatörler ile immün sistemin regülasyonunda, diğer hücrelerin farklılaşmasında ve hücrelerin çeşitli bölgelere yönelimde (homing) önemli işlevlere sahiptir (Jo ve ark., 2021).

1.1.1.2.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler, embriyonik gelişimin erken evrelerinde yer alan ve tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Etik tartışmalar ve sınırlı kaynaklar nedeniyle embriyonik kök hücrelerin kullanımına alternatif olarak geliştirilen uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH), kök hücre biyolojisinde önemli bir buluş olmuştur (Takahashi ve Yamanaka, 2006). İlk kez Yamanaka ve arkadaşları (Takahashi ve Yamanaka, 2006) tarafından, retroviral gen transfer yöntemi kullanılarak Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc genlerinin fare deri fibroblast hücrelerine aktarılması yoluyla bu hücrelerin pluripotent kök hücrelere yeniden programlanması sağlanmış ve böylece uPKH'leri elde edilmiştir (Avcılar, ve ark., 2018).

uPKH'ler, somatik hücrelerin genetik olarak yeniden programlanması yoluyla elde edilmiştir. Fare modellerinde özellikle karaciğer, pankreas hücreleri ve nöral progenitör hücrelerden insanlarda ise dermal fibroblastlar, periferik kan hücreleri, keratinositler, nöral kök hücreler ve kordon kanı hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinden başarıyla pluripotent kök hücrelere dönüşüm sağlanmıştır. Yeniden programlama, özelleşmiş bir somatik hücrenin çekirdeğinde kalıcı genetik ve epigenetik değişiklikler oluşturarak, bu hücrenin pluripotent kapasite kazanmasını ve mitotik bölünmeler

yoluyla bu kapasitesini sürdürebilmesini mümkün kılan temel bir biyoteknolojik yaklaşımdır. Bu çekirdek düzeyindeki yeniden yapılandırma, hücrenin gelişimsel kaderinin tersine çevrilmesini sağlayarak, pluripotent kök hücre özelliklerinin yeniden kazanılmasına olanak tanır ve dolayısıyla uPKH oluşturulmasında merkezi bir rol oynar (Shi, ve ark., 2017; Takahashi ve Yamanaka, 2016).

1.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımını Destekleyen Biyolojik Özellikler

Son yıllarda kök hücreler, tedavi edilemeyen birçok hastalığın tedavisinde umut verici biyolojik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Ayavoo, ve ark., 2021).

MKH'lerin terapötik potansiyeli, çeşitli hücre soylarına farklılaşma, hücrenin hayatta kalması ve çoğalması için kritik faktörleri salgılama, bağışıklık tepkisini düzenleme ve tam olarak yaralanma bölgesine göç etme yetenekleri hücrenel ve genetik terapi için potansiyel bir kök hücre kaynağı olarak klinik çalışmalarda kullanılmasını sağlamıştır (Squillaro ve ark., 2016; Jo ve ark., 2021). MKH'lerin kemik, kırık, adipoz, kaslar, tendonlar dahil olmak üzere çeşitli mezenkimal dokulara hem in vitro hem de in vivo olarak farklılaşabilirler. Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda MKH'lerin epitel benzeri hücrelere farklılaşabileceğine dair kanıtlar doku mühendisliği için ve hücrenel terapiler için umut vericidir. Ayrıca bu hücrelerin keratinositler ve deri hücre tiplerinin oluşumunu desteklediğini ve böylece yara onarım süreçlerine katkıda bulunduğunu gösterilmiştir. Elde edilen veriler ışığında bu hücrelerin hedeflenen dokudaki hücrelere farklılaşma ve hasarlı dokudaki yerleşik hücrelerin yerini alma potansiyelleri göz önüne alındığında MKH'lerin doku ve organ onarımına fayda sağlayabileceğini desteklemektedir. Hem in vitro hemde in vivo çalışmalar sonucunda elde edilen veriler MKH'lerin farklılaşma potansiyellerinin, hastalıkları tedavi etmedeki başarısını açıklayamayacağını aslında bu potansiyeli meydana getiren toplam mekanizmanın bir parçası olduğunu göstermiştir (Squillaro, Peluso, & Galderisi, 2016). MKH'lerin parakrin etkilerini bulundukları hasarlı dokulardaki hücrelere dönüşmek yerine dokuyu çevreleyen hücreleri uyarak doku rejenerasyonu için gerekli çeşitli büyüme faktörlerini artırarak gerçekleştirdiği gözlenmiştir (Chen, Tredget, Wu, & Wu, 2008). Birçok in vitro ve in vivo çalışma MKH'lerin doğal olarak immünsüpresif olduğunu, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücrelerin çoğalması üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu göstermektedir. MKH'lerin immünsüpresif etkilerinin bağışıklık sistemi

hastalıklarının tedavisinde organ nakillerinde organ reddinin engellenmesinde ve doku hasarının tedavisinde kullanılabileceği de ileri sürülmektedir (Han ve ark., 2012).

1.1.3. Kök Hücrelerin Klinik Kullanımının Avantaj ve Dezavantajları

MKH'lerin potansiyelleri ve kolay elde edilebilmesi, birçok hastalığın tedavisinde çeşitli klinik uygulamalara olanak tanır. Birçok avantaj ve faydasına ek olarak, MKH'lerin kullanımı hakkında hala sorular vardır. MKH'lerin etki mekanizmaları nelerdir? Hedeflerine nasıl ulaşırlar? MKH'lerin klinik kullanımı güvenli midir? Bunlar, MKH'ler terapötik araçlar olarak düşünüldüğünde ortaya çıkan temel sorulardır. MKH'lerin çeşitliliği, farklı klinik uygulamaları ve henüz kapsamlı olarak araştırılmamış birçok özellikleri, bu hücreler hakkında tartışmalı görüşlere neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar MKH'lerin in vitro özellikleri hakkında birçok bilgiyi ortaya koymasına rağmen, MKH'lerin in vivo davranışları hakkında kısıtlı bilgiler mevcuttur. MKH'lerin kendini yenileme, çoğalma farklılaşma kapasiteleri, çok sayıda kaynaktan elde edilebilir olmaları tedaviye erişimi kolaylaştırmaktadır. Makrofajlar, dentritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve T/B lenfositler üzerinde immünesüpresif etkiler göstererek anti-inflamatuar etki gösterirler. MKH'lerin terapötik etkisi, hedef dokuya göç etme, yapışma ve yerleşme yetenekleri sayesinde mümkün olan, yaralı bölgeye ulaşma yeteneklerine bağlıdır (Musiał-Wysocka ve ark., 2019).

MKH'lerin hedef dokuda terapötik etkinliğini in vitro kültür koşulları, pasaj sayısı, hücrelerin elde edildiği donör yaşı, konak alıcılığı gibi faktörler etkilemektedir. Primer olarak izole edilmiş hücrelerin, in vitro kültürlenmiş hücrelere kıyasla hedef dokuya göç etme ve daha fazla yerleşme verimliliğine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum hücrelerin in vitro kültür koşullarında geçirdiği yaşlanma/farklılaşma sürecinin bir sonucu olabilir. Ayrıca kültür koşullarının da yerleşme kapasitesi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Çünkü bu süreçte yer alan yüzey belirteçlerinin ifadesini değiştirebilirler. Örneğin, bir kemokin reseptörü olan C-X-C motif kemokin reseptörü 4 (CXCR4), MKH'lerin göçünde rol oynar. İn vitro kültür sırasında kemik iliği kökenli MKH'lerin CXCR4 ekspresyonunun kaybolduğu gösterilmiştir (Rombouts ve Ploemacher, 2003).

Kolay elde edilebilmesine rağmen yeterli sayıda hücre elde edilebilmesi için uzun süren in vitro kültür şartları ve daha yüksek pasajlardaki hücrelerde telomeraz

aktivitesinde de azalma meydana gelir. Buna ek olarak uzun süreli kültürlerde MKH'ler farklılaşma potansiyellerini kaybederek morfolojik, genetik instabilite ve kromozomal anormallikler de göstermeye başlarlar (Musiał-Wysocka ve ark., 2019).

MKH'lerin tümör oluşumunu desteklediğine dair görüşler doğrultusunda yapılan çalışmalarda tümör inflamatuvar mikroçevresindeki MKH'lerin immünsüpresif işlevi ortaya çıkarabileceğini bu nedenle kanser tedavisinde uygulanmasının tümör hücrelerinin immün kontrolden kaçmasına yardımcı olarak olumsuz bir etkiye sahip olabileceğine dair veriler elde edilmiştir (Han ve ark., 2012).

Bazı çalışmalar ise MKH'lerin anti-tümör etkilerinin de olduğunu göstermiştir. İn vitro kültür ortamında MKH'lerin salgıladığı faktörleri içeren besi ortamı kullanılarak kültüre edilen meme kanseri hücrelerinin, standart besi ortamında kültüre edilen meme kanseri hücrelerine oranla daha az göç ettikleri belirlenmiştir (Clarke, ve ark., 2015). Bir başka çalışmada kemik iliği MKH'lerinin birlikte kültüre edildiği insan hepatosellüler karsinoma hücre hattı (HepG2) ve insan yumurtalık kanseri hücre hattı (Skov-3)'nda hücrelerin çoğalmasında azalma meydana geldiği görülmüştür (Bruno, ve ark., 2014).

Bu veriler doğrultusunda MKH'lerin tümör oluşumundaki potansiyeli henüz tam olarak belirlenememiştir. Kök hücrelerin tümörler üzerindeki etkisi kullanılan tümör modeline, kültür yöntemine, hücrelerin heterojenliğine, salgılanan moleküllere ve tam olarak anlaşılmamış birçok faktöre bağlı olarak gelişir.

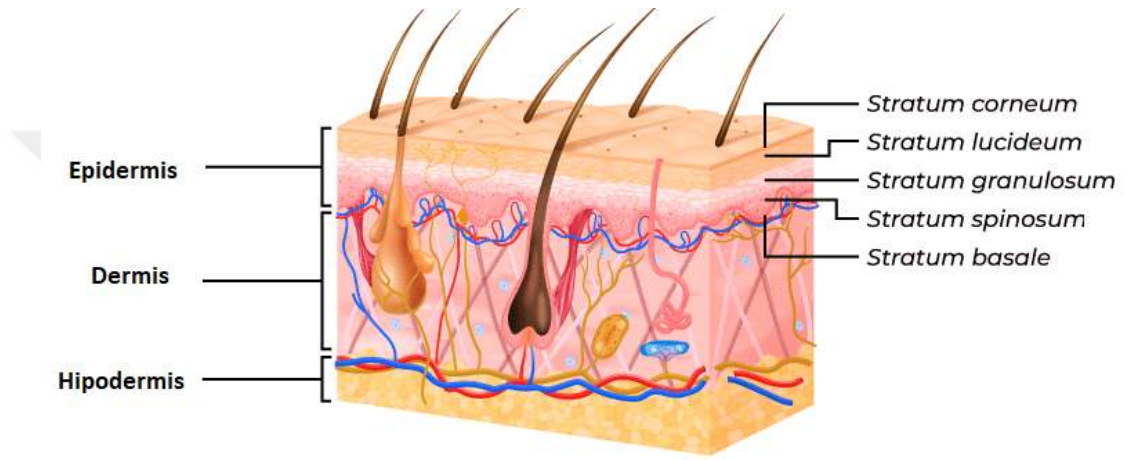
1.2. Deri Dokusu: Yapısı ve Fonksiyonları

Deri, insan vücudunu dış ortam ile bariyer oluşturarak yabancı patojenlere karşı koruyan, vücut ısısının kontrolünü sağlayan, sinir ağı sayesinde çevreyi algılamayı sağlayan bir organdır. Kapladığı geniş yüzey alanı göz önüne alındığında deri oldukça hassas ve yaralanmaya karşı korumasızdır. Deri epidermis, dermis ve hipodermis olarak üç katmandan meydana gelmektedir (Sullivan ve Myers, 2022).

En dışta yer alan epidermis, deriyi hasar ve patojenlerden korurken aynı zamanda su kaybını önler ve kimyasal emilimini sınırlar. Epidermis ektodermden köken alarak gelişir ve keratinleşmiş çok katlı epitel hücrelerinden meydana gelmiştir, Keratinositler epidermiste bulunan primer hücrelerdir. Ayrıca melanin pigmenti üretiminden sorumlu melanositler, duyuşal fonksiyon sağlayan merkel hücreleri,

deriye bağışıklık fonksiyonu kazandıran langerhans hücreleri de bulunmaktadır (Sullivan ve Myers, 2022).

Epidermis kendi içerisinde birbirinden farklı görevleri bulunan beş katmandan meydana gelmiştir. Bu katmanlar en alttan yüzeye doğru bazal hücre tabakası (stratum bazale), skuamöz hücre tabakası (stratum spinosum), granüler hücre tabakası (stratum granulosum), lüsidum tabakası (stratum lucidum) ve kornifiye hücre tabakası (stratum corneum)'dur (Şekil 3.) (Roger ve ark., 2019).



Şekil 3. Epidermis ve dermis tabakalarının yapısal organizasyonu (Souci ve Denesvre, 2021'den değiştirilerek alınmıştır).

Dermis, epidermisi destekleyen, esnek yapıya sahip bir bağ dokusu tabakasıdır. Fibroblastlar dermisde bulunan primer hücrelerdir. Dermis iki tabakadan meydana gelmiştir. En dışta papiller dermis onun altındaki tabakada retiküler dermis tabakası bulunur. Papiller tabaka ve epideriminin bazal tabakası arasında bazal lamina yer almaktadır. Papiller dermis gevşek bir bağ dokusunda oluşmaktadır. Retiküler dermis ise daha düzensiz bağ dokusan meydana gelmiştir. Deri katmanlarının en altında yer alan hipodermis ise MKH'ler, kan hücreleri ve adipoz hücrelerinden oluşan yalıtım görevi gören bir katmandır (Cialdai, Risaliti ve Monici, 2022).

1.2.1. Yara ve İyileşme Mekanizmaları

Canlı dokuda çeşitli nedenlerle meydana gelen travmalar sonucunda derinin normal anatomik yapısının ve fonksiyonel olarak bütünlüğünün bozulması yara olarak adlandırılmaktadır. Oluşan yaralanmalar iyileşme süresine bağlı olarak akut ve kronik yara olarak sınıflandırılır. Akut yaralar belirli bir süreç sonucunda hasarlı dokunun

anatomik ve işlevsel bütünlüğünü yeniden kazandığı yaralardır. Bası yaralanmaları, diyabetik yaralar iskemik yaralar gibi yaralar ise iyileşme sürecinin kesintiye uğradığı dokunun anatomik ve işlevsel bütünlüğünün geri kazanılmadığı kronik yaralardır (Baktır, 2019).

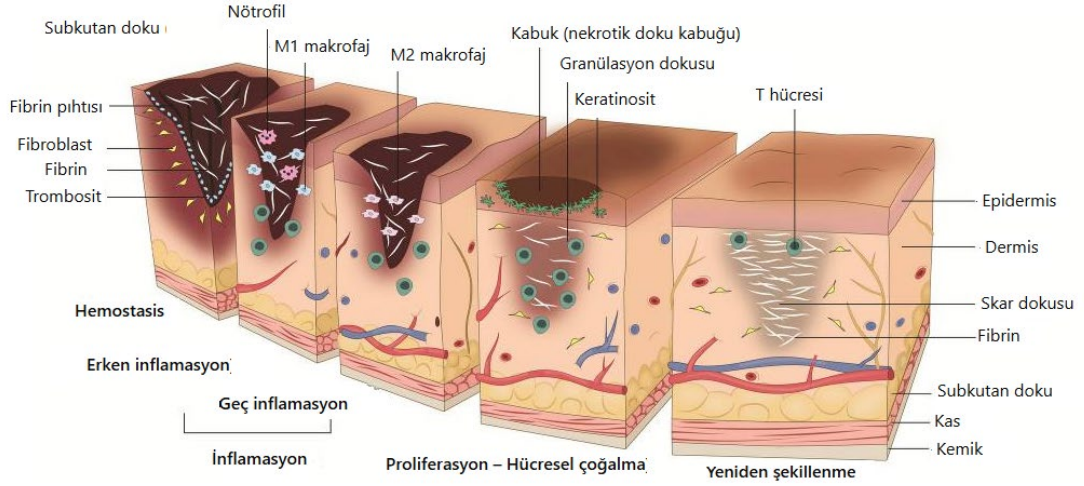
Yara iyileşmesi sırasında bağışıklık tepkisinde meydana gelen düzensizlikler kronik yaraların ortaya çıkmasına yol açar. Kronik yaralarda yara dokusunda fazla miktarda pro-inflamatuar makrofajlar bulunurken, anti-inflamatuar fenotiplere sahip makrofajların miktarı düşüktür. Ayrıca bulunan makrofajların ölü nötrofilleri temizleme kapasiteside sınırlıdır. Bu durum tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökin -1 β gibi inflammatuar düzenleyicilerin fazlaca bulunmasına ve inflammatuar bir ortamın oluşmasına yol açar. Tüm bunlara ek olarak kronik yaralardaki makrofajlar, ekstrasellüler matriksi parçalayan ve iyileşmenin proliferatif aşamasının başlamasını engelleyen matriks metalloproteinazları (MMP) salgılar (Raziyeva ve ark., 2021).

Vücut için dış ortamdan koruyucu bir kalkan olarak cilt sürekli olarak potansiyel yaralanmalara maruz kalır ve bu nedenle yara iyileşmesi tüm üst organizmaların hayatta kalması için hayati bir süreçtir (Takeo ve ark., 2015).

Yara iyileşmesi yaralanmanın ardından doku hasarına yanıt olarak meydana gelen karmaşık biyokimyasal ve hücrel olaylar dizisidir (Talbot ve ark., 2022).

Yara iyileşmesinin temel prensibi yeterli doku oksijenlenmesinin sağlanması, doku hasarını en aza indirmek, dokunun düzgün nemlenmesini ve beslenmesini sağlamaktır (Peña ve Martin, 2024).

Yara iyileşmesi, homeostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme olmak üzere dört ardışık fazdan oluşan kompleks ve dinamik bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, hücrel proliferasyon, doku yeniden yapılanması ve anjiyogenez gibi çoklu biyolojik olayları içerir (Şekil 4.) (Bonnici ve ark., 2024).



Şekil 4. Yara iyileşmesi basamakları (Knoedler ve ark., 2023'ten değiştirilerek alınmıştır).

1.2.1.1. Hemostazis Fazı

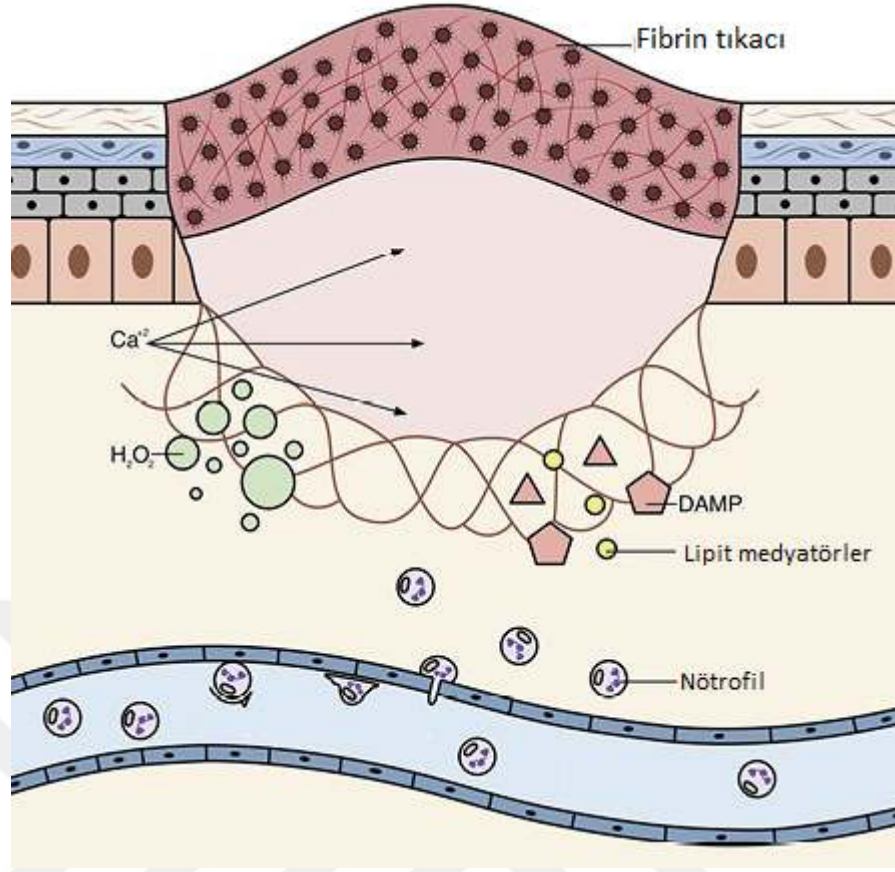
Yaralanmanın ardından iyileşmenin ilk aşaması olarak kanamayı durduran vasküler kasılma, trombositlerin kümelenmesi, fibrin oluşumu ile karakterize olan süreçtir. Yaralanmadan sonra damarlar, yırtılmış mikro damarlardan kaynaklanan kanamayı azaltmak için hızla daralır. Bu, damar düz kasının refleksif kasılmasıyla sağlanır ve hasarlı endotelden salgılanan endotelin gibi vazokonstriktörler tarafından tetiklenir. Ek olarak, yaralı hücrelerden salgılanan dolaşımdaki katekolaminler, epinefrin, norepinefrin ve prostaglandinler vazokonstriksiyonu düzenler. Trombositler, özellikle damar duvarlarındaki düz kaslar olmak üzere mezenkimal hücreleri aktive ederek kasılmaya neden olan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) üretir. Vasküler kasılmanın ardından primer ve sekonder hemostaz eş zamanlı ve birbiri ile ilişkili olarak devam eder. Primer hemostaz subendotelyal matriks içerisindeki kolajenin açığa çıkması ile meydana gelen trombosit kümelenmesini içerir. Sekonder hemostaz, çözünür halde bulunan fibrinojenin trombin tarafından aktive edilerek fibrin ağını meydana getirecek olan çözünmeyen ipliklere dönüştürüldüğü pıhtılaşma kaskadının aktivasyonunu ifade eder. Trombositlerin kümelenmesi sonucunda oluşan trombosit tıkaçı ve fibrin ağı kanamayı durduran, büyüme faktörlerini serbest bırakan ve yaranın iyileşmesi sağlayacak hücreler için geçici bir iskele gibi görev alan trombüs oluşturmak üzere birleşerek birlikte etki eder (Rodrigues ve ark., 2019).

Epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- α ve TGF- β , insülin büyüme faktörü (IGF), interlökin-1 (IL-1) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri ve sitokinler salınır. Bu faktörler, yara iyileşmesinin sonraki aşamalarında ve özellikle bağışıklık hücrelerinin kemotaktik alımında diğer süreçlere aracılık etmede ve aktive etmede önemli bir rol oynar. Trombosit aktivasyonundan sonraki ilk saat içinde, trombosit faktörlerinin salınımı en yoğun şekilde görülür. Ancak aktive olmuş trombositler bu faktörleri yedi güne kadar serbest bırakmaya devam eder ve böylece yara iyileşmesi ve ilgili hücreler üzerinde sürekli bir etki oluşturlar (Bonnici ve ark., 2024).

1.2.1.2. İnflamatuar Faz

İnflamatuar faz, yara bölgesindeki cansız dokuların, yabancı maddelerin, bakterilerin sindirimi için gerekli hücrelerin çoğalmasını ve bölgeye toplanmasını teşvik eder. Meydana gelen bu fagositik aktivite, yaralı bölgedeki bakteriyel dengesizlik iyileşmenin devamını sekteye uğratacağı için kritik öneme sahiptir (Sorg ve Sorg, 2023).

İnflamatuar fazın başlaması için bir “başlangıç sinyali” gereklidir. Yara kalsiyum (Ca^{+2}) dalgaları, reaktif oksijen türleri gradyanları, purinerjik moleküller içeren transkripsiyondan bağımsız yolları aktive eder. Travmadan sonraki ilk dakikalarda yara kenarlarındaki Ca^{+2} konsantrasyonu artarak yaranın merkezine doğru ilerler. Yaralı hücrelerden salgılanan, hasarla ilişkili moleküler desenler (DAMP), hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid medyatörleri ve kemokinlere yanıt olarak nötrofiller yaraya çekilir. DAMP molekülleri arasında DNA, peptitler, ECM bileşenleri, ATP ve ürik asit bulunur (Şekil 5) (Sorg ve Sorg, 2023).



Şekil 5. Nötrofillerin Yaralanma Bölgesine Yönlendirilmesinde Rol Oynayan Moleküler Sinyaller (Sorg ve Sorg, 2023'ten değiştirilerek alınmıştır)

Nötrofiller yara bölgesindeki patojenlerle savaşır ayrıca fagositoz gerçekleştirir. Yaralanmadan sonraki gün, nötrofiller yaradaki tüm hücrelerin %50'sini oluşturur. İlk iki ile beş gün boyunca nötrofiller tarafından kontrol edilirken, makrofajlar yaklaşık üçüncü günden itibaren sürece dahil olurlar. M1 makrofajlarının toplanması mikrobiyal savunma, anjiyogenez ve doku rejenerasyonu için gereklidir. Yara iyileşmesinin erken aşamasında, TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23 ve IL-1 β gibi birden fazla inflamatuvar faktörün ifadesi M1 makrofajların etkisi ile artar. Nötrofiller yüzey reseptörleri ve integrinler yardımıyla antijenleri tanır ve onları saran fagositik bir kap oluşturur. Bu antijenler nötrofil granülleri içerisindeki proteazlar tarafından parçalanır (Rodrigues ve ark., 2019).

Yaralı bölgedeki tüm bakteriler temizlendikten sonra nötrofil aktivitesinde değişiklikler meydana gelir. İyileşmenin sonraki aşamaları için nötrofiller ekstrüzyon, apoptozis ve ardından makrofajlar tarafından yutularak yok edilirler. Makrofajlar aracılığıyla temizlenmeyen nötrofiller ise “nötrofil ters göçü” adı verilen bir süreç ile

damar sistemine geri dönerek yara bölgesini terk eder. Nötrofillerin tüm bu süreçler ile zamanında yara bölgesini terk etmesi yara iyileşmesi için kritik öneme sahiptir. Nötrofillerin temizlenmesi bölgedeki iltihabın çözülmesini sağlar. Nötrofillerin yaralı bölgede kalması diyabetik ayak ülserleri, bası ülserleri ve venöz bacak ülserleri gibi uzun süreli ve iltihaplı durumlara ve kronik yaraların ortaya çıkmasına neden olur (Wang ve ark., 2023)

Makrofajlar kalan hücresel kalıntılarıda fagosite ederek geç inflamatuvar aşamayı başlatır. Makrofajlar ayrıca keratinositleri, fibroblastları ve endotel hücrelerini aktive etmek için önemli sinyal molekülleri üretirler. Başlangıçta, M1 makrofajı, yüksek reaktif oksidatif stres (ROS) içeriğine sahip ve çoğu patojeni hızla öldürebilen hücre içi fagozomlardaki patojenleri tanıyan ve yutan proinflamatuvar bir hücre tipidir. Proinflamatuvar makrofajlar ayrıca göçlerine yardımcı olmak için ECM'yi ve trombüsü sindirmelerine olanak tanıyan MMP'leri sentezler (Rodrigues ve ark., 2019). İnflamatuvar yanıt azaldıkça, M1 makrofajı antiinflamatuvar M2 formuna dönüşür ve özellikle yeni damar oluşumuna ve yeniden şekillenmesine katkıda bulunur. Sayıları yaralanmadan sonraki üçüncü gün civarında zirveye ulaşır ve onuncu günde temel seviyelere düşer (Sorg ve Sorg, 2023).

1.2.1.3. Proliferasyon Fazı

Doku bütünlüğünün yeniden sağlandığı proliferasyon fazı yeniden epitelizasyon, neovaskülarizasyon ve granülasyon dokusunun oluşumunun dahil olduğu süreci ifade eder. Yaranın oluşmasından itibaren 1-3 gün sonra başlar ve 15-21 gün boyunca devam eder. Bu fazda diğer iyileşme süreçleriyle eş zamanlı olarak yeni bağ dokusu ve granülasyon dokusu oluşur. Granülasyon dokusu, yeni ekstrasellüler matriks sentezleyen ve yaranın büzülmesine yardımcı olan aktif fibroblastlar tarafından oluşturulur. Yeni sentezlenen ekstrasellüler matriks, yeni kan damarları ve diğer hücre ve bileşenler için iskele görevi görür. Granülasyon dokusu sonunda yara yeniden şekillenmesi sırasında normal bağ dokusu ile değiştirilir (Rodrigues ve ark., 2019).

Yeni kan damarlarının oluşumu yara iyileşmesi için kritik öneme sahiptir. Yara bölgesine besin iletilmesi, oksijen homeostazının sürdürülmesi, hücre çoğalması ve doku rejenerasyonunun gerçekleşmesi için gereklidir. Hasarlı bölgede uçtaki endotel hücreleri, gelen vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve diğer büyüme faktörü

sinyallerine yanıt olarak yeni kılcal damarlar oluşturmak için filizlenirler. Pro- anjiyojenik makrofajlar, endotel hücre büyümesi için büyüme faktörleri salgılar ve yeni oluşan kılcal damarları birleştirir. Aktive edilmiş endotel hücreleri, lökositlerle hücre-hücre etkileşimlerine yardımcı olan hücrelerarası yapışma molekülü (ICAM)-1, vasküler hücre yapışma molekülü (VCAM)-1, E-selectin ve P-selectin gibi yüzey belirteçlerinin ekspresyonunu artırarak yeni damar oluşumuna katılır (Rodrigues ve ark., 2019). Yeni damar oluşumunda süreç devam ettikçe yara kenarlarındaki vasküler halka yaranın merkezine doğru daralır ve yaranın iç kısmını besleyen ve yaralanmamış deriyle bağlantı kuran radyal şekilli damarlar bırakır. Yeni damarlanma sürecinde bozuklukların meydana gelmesi yara iyileşme bozukluklarına, venöz yetmezliğe veya diyabetik ayak ülserlerinde olduğu gibi kronik ülserlere yol açabilir (Sorg ve Sorg, 2023).

1.2.1.4. Yeniden Şekillenme Fazı

Bu süreç, cilt bütünlüğünün sağlanmasında ve dış etkenlere karşı bariyer fonksiyonunun yeniden kazanılmasında merkezi rol oynamaktadır. Yeniden epitelizasyon, yaralanmadan yaklaşık 16-24 saat sonra, proliferasyon fazı sırasında başlar ve yara iyileşme sürecinin ikinci ve üçüncü fazında da devam eder. Yara iyileşmesinin son aşaması olan yeniden şekillenme fazı, olgunlaşmamış tip III kolajenin daha dayanıklı olan tip I kolajen ile yer değiştirmesiyle ve keratinositlerin yara kenarından göç ederek çoğalması ile karakterizedir (Rousselle ve ark., 2019). Bu kolajen dönüşümü, MMP'ler ve onların doğal inhibitörleri olan doku inhibitörleri (TIMP'ler) tarafından, makrofajların temel düzenleyici rol üstlendiği hassas bir denge içerisinde yürütülür (Knoedler ve ark., 2023).

Keratinositler, yara kenarından göç ederken bir dizi sinyal molekülü, büyüme faktörü ve matriks bileşeni ile etkileşim halindedir. MMP, ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesini sağlayarak keratinositlerin göçünü kolaylaştırır. Özellikle MMP-1 ve MMP-9, bu süreçte kritik öneme sahiptir. Ayrıca EGF, keratinosit büyümesi ve göçünü teşvik eder (Pastar ve ark., 2014).

Ayrıca keratinosit büyüme faktörü (KGF), yeniden epitelizasyonu artırarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Bártolo ve ark., 2022; Michopoulou ve Rousselle, 2015).

Yara bölgesinde daha önce bulunan makrofajlar, fibroblastlar ve endotelyal hücreler apoptoz yoluyla ortadan kalkar ve kapiller damar oluşumu durarak hücreSEL ve vasküler yoğunlukta azalma meydana gelir. Son olarak, TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü-beta) tarafından yönlendirilen α -düz kas aktini (α -SMA) eksprese eden miyofibroblastlar, yara kenarlarını sıkıca birbirine çeker. Yüzey giderek küçülerek soluk, açık renkli bir skar oluşur, bu skarda kolajen lifleri artık karmaşık şekilde iç içe değil, paralel olarak dizilmiştir (Knoedler ve ark., 2023).

1.2.2. Kök Hücrelerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

Kök hücrelerin, onları diğer hücrelerden ayıran özellikleri, hücre bölünmesiyle kendilerini yenileyebilmeleri ve belirli deneysel, fizyolojik parametreler altında, farklı amaçlarla doku veya organa özgü hücreler olarak çoğalmak üzere tetiklenebilmeleri bu hücrelere karşı büyük bir ilgi yaratmış ve bu da çeşitli hastalıklar için hücre bazlı tedaviler konusunda ilgi çekici perspektifler sunan çok sayıda çalışmanın önünü açmıştır.

Yara iyileşmesi, inflamatuvar hücreler, deri fibroblastları, keratinositler ve endotelyal hücreler arasındaki koordineli etkileşimleri içeren karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu sürecin başarılı bir şekilde ilerleyebilmesi için kontrollü inflamasyon, anjiyogenez ve doku yeniden yapılanmasını sağlayan sitokinler ile büyüme faktörlerinin dengeli bir şekilde etkileşimi gereklidir. Bu bağlamda, kök hücre tedavileri, yara iyileşmesini destekleyici etkileri sayesinde umut vadeden bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Endotelyal progenitör hücreler, kemik iliği, adipoz doku, dermal kaynaklar ve uPKH'ler gibi farklı kaynaklardan elde edilen hücrelerin terapötik potansiyelleri birçok çalışmada araştırma konusu olmuştur. Özellikle adipoz doku mezenkimal kök hücreler (ADMKH), kolay elde edilebilir olmaları, kültür ortamında çoğalabilme kapasiteleri ve pro-anjiyojenik faktörleri nedeniyle bir seçenek olarak öne çıkmıştır. ADMKH'lerin periferik arter hastalığı, diyabetik yaralar, hipertansif ülserler, bullous diabeticorum, venöz ülserler gibi çeşitli durumlarda etkinliği gösterilmiştir (Knoedler ve ark., 2023).

Uygulama yöntemleri arasında topikal kullanım, biyomalzemelerle birlikte uygulama, trombosit açısından zengin plazma kombinasyonu gibi farklı stratejiler yer almaktadır. Bu yaklaşımların, lokal yara bakım protokolleriyle entegre edilmesi sonucunda ağrının azalması, iyileşme süresinin kısalması ve kozmetik sonuçların

iyileşmesi gibi olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Kök hücre nakli, yalnızca farklı deri hücre tiplerine farklılaşma potansiyeliyle değil; aynı zamanda sitokin ve büyüme faktörleri salgılayarak anjiyogenezi artırma özelliğiyle de terapötik değer taşımaktadır. Özellikle kronik alt ekstremitte yaralarında ve Mohs mikrocerrahisi sonrası sekonder iyileşmeye bırakılan defektlerde etkili bir tedavi seçeneği sunmaktadır. Ayrıca, kök hücre uygulamaları sağlık bakım maliyetlerinin azaltılması ve hasta yaşam kalitesinin artırılması açısından da önemli bir potansiyel taşımaktadır (Squillaro ve ark., 2016).

MKH'ler yara iyileşmesinin tüm aşamalarında aktif rol oynamakta olup, iyileşme tamamlandıktan sonra dahi yara bölgesinde varlıklarını sürdürdükleri gösterilmiştir (Pratheesh ve ark., 2017). Bu hücreler, immünmodülatör ve immüno-regülatör özellikleri sayesinde inflamatuvar süreci ve fibrozu düzenler, skar oluşumunu azaltırlar, anjiyogenezi ve granülasyon dokusu oluşumunu teşvik eder, antimikrobiyal etki gösterir, reaktif oksijen türlerini nötralize eder ve dermal fibroblast fonksiyonlarını destekler. MKH'lerin bu etkileri, çeşitli sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerini salgılaması yoluyla gerçekleşmektedir (Mester ve ark., 2017).

Sonuç olarak, MKH'lerin yara onarımına katkı sağlayan etki mekanizmaları büyük ölçüde ortaya konmuştur. Bu hücreler, dokuya özgü hücrelere farklılaşma ve transdiferansiyasyon kapasitesine sahip olmalarının yanı sıra birçok parakrin faktör salgılayarak bağışıklık yanıtını ve doku mikroçevresini düzenleme yeteneği göstermektedirler (Knoedler ve ark., 2023).

1.3. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücre adezyon molekülleri (CAM), hücre-hücre ve hücre-ECM bağlantısını sağlayan protein molekülleridir. CAM'ler hücre aktivasyonu, göçü, büyümesi, farklılaşması, doku ve hücre yapısının korunması, doku tamiri, yara iyileşmesi gibi süreçlerde rol alan ve hücre yüzeyi reseptörleri olarak görev yapan hücre yüzey proteinleridir. Bozulan hücre-hücre veya hücre-ECM etkileşimi kontrolsüz hücre çoğalmasına, fizyolojik doku organizasyonunun bozulmasına neden olur. Ayrıca hücre adezyon moleküllerinde meydana gelen değişiklikler tümör metastazına neden olmaktadır (Mui ve ark., 2016).

CAM'ler, yapısal olarak üç temel bölgeden oluşur: sitoplazmik alan, transmembran alan ve ekstrasellüler alan. Sitoplazmik alan, hücre iskeletiyle özellikle mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentler gibi yapılar aracılığıyla doğrudan

veya dolaylı etkileşime girerek hücre içi sinyal iletiminde görev alır. Transmembran alan ise, adezyon molekülünün hücre zarı boyunca sabitlenmesini sağlar ve hücre içi ile dışı bölümler arasında yapısal bir köprü görevi görür (Makrilia, Kollias, Manolopoulos ve Syrigos, 2009). Ekstrasellüler alan, diğer hücre adezyon molekülleri ya da ECM bileşenleri ile etkileşerek hücreler arası adezyonun gerçekleşmesini sağlar (Bulut, 2024).

Protein dizilerine ve yapılarına göre hücre adezyon molekülleri kaderinler, integrinler, selektinler ve immünoglobulin (Ig) süperailisi olarak dört ana gruba ayrılırlar (Janiszewska ve ark., 2020).

1.3.1. Kaderinler

Kaderinler, hücreler arası bağlantıların oluşumunda temel rol oynayan, hücrelerin dokusal bütünlük içinde kalmasını sağlayan ve hücreler arası etkileşimleri düzenleyerek doku bütünlüğünü sürdüren, kalsiyuma bağımlı homotipik etkileşimler aracılığıyla hücreler arası adezyonu gerçekleştiren transmembran glikoproteinlerdir (Makrilia ve ark., 2009; Janiszewska ve ark., 2020). Kaderin süper ailesi, çok çeşitli proteinleri kapsar ve birçok izoformu, dokuya özgü ifade paternleri gösterir. (Janiszewska ve ark., 2020).

Kaderin süper ailesi, klasik kaderinler ile desmozomal kaderinler ve yakın zamanda tanımlanan protokaderinler gibi klasik olmayan kaderinlerden oluşur. Klasik kaderinler, kalsiyum bağımlı hücre-hücre yapışmasının temel düzenleyicileridir. Bu grubun en iyi tanımlanmış üyeleri; E-kaderin (epitelyal), N-kaderin (nöral) ve P-kaderin (plasental) olup klasik kaderin alt ailesine aittir. Her ne kadar bu kaderinler karakteristik olarak belirli dokularda ifade edilse de, gelişimsel süreçler sırasında farklı dokularda geçici olarak ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir (Makrilia ve ark., 2009; Kozlova ve Sytnyk, 2024)

Desmozomlar, epitel hücrelerinde bulunan ancak endotel hücrelerinde bulunmayan, mekanik ve kayma stresine karşı güçlü direnç gösteren submembranöz plaklardır (Hintermann ve Christen, 2019).

Kaderinlerin hücre dışı domainleri, sitoplazmik kuyruklarıyla birleşerek adherens bağlantıları olarak adlandırılan önemli sinyal merkezlerinin oluşumunu sağlar. Bu bağlantılar aracılığıyla kaderinler, komşu hücrelerdeki kaderin

molekülleriyle homotipik etkileşim kurarak fermuar benzeri bir yapı meydana getirir. Adherens bağlantıları aynı zamanda bitişik hücrelerin aktin sitoiskeletleri arasında doğrudan bağlantı kurarak hücresel bütünlüğün korunmasına katkıda bulunur. Kaderin ifadesi, yalnızca doku organizasyonunun sürdürülmesinde değil, aynı zamanda gastrulasyon, nöral gelişim ve organogenez gibi embriyogenezin temel aşamalarında da kritik rol oynamaktadır. Olgun dokularda ise kaderinler; hücre polaritesinin sağlanması, doku bütünlüğünün korunması ve homeostazın sürdürülmesinden sorumludur. Ancak, karsinogenez sürecinde kaderinlerin genellikle inaktive edilmesi ya da fonksiyonlarının bloke edilmesi; invazyon, metastaz ve tümör progresyonuna zemin hazırlamaktadır (Kaszak ve ark., 2020).

E-kaderinin hücre dışı bölgesi, Ca^{+2} iyonları tarafından stabilize edilen ve ardışık olarak dizilmiş beş adet kaderin tipinde tekrar eden hücre dışı kaderin alanından oluşur. Bu alanlar, komşu hücreler arasında trans etkileşimler kurarak hücre-hücre yapışmasını sağlar. E-kaderinin sitoplazmik kısmı, p120-katenin ve β -katenin ile bağlanarak kaderin-katenin kompleksinin oluşumuna katkı sunar. β -katenin, bu kompleksi aktin filamentlerine bağlayan α -katenin ile etkileşime girer. α -katenin, bu bağlantıyı dolaylı yoldan sağlar ve böylece kaderin kompleksi ile hücre iskeleti arasında yapısal bir köprü görevi görür. Buna ek olarak hücrelerin mekanik stabilitesini ve sinyal iletim yollarını düzenler. E-kaderinler, özellikle epitel hücrelerinin migrasyon ve proliferasyon davranışlarını modüle ederek bu sürece katkı sağlar (Li ve ark., 2012).

Yara alanında, epitel hücrelerinin geçici olarak epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) benzeri bir fenotipe geçmeleri, hücre hareketliliğini artırarak epitel örtünün yeniden oluşmasına olanak tanır. Bu süreçte E-kaderin ekspresyonunda geçici bir azalma gözlemlenir; bu azalma, hücre-hücre bağlantılarının gevşemesine ve hücre migrasyonunun kolaylaşmasına neden olur (Yang ve ark., 2019). Ancak iyileşme ilerledikçe, E-kaderin ifadesi yeniden artar ve epitel bütünlüğü yeniden tesis edilir (Niessen ve ark., 2011). E-kaderinlerin sitoplazmik bölgesinin kateninlerle (p120, β -katenin, α -katenin) etkileşimi, hücrelerin yara bölgesindeki gerilimlere yanıt verme yeteneğini artırır ve doku homeostazının yeniden sağlanmasında önemli rol oynar (Arslan ve ark., 2021).

Sonuç olarak, E-kaderinler yalnızca hücresel adezyonu sağlamakla kalmaz; aynı zamanda yara iyileşmesinin her aşamasında, hücresel davranışların düzenlenmesinde anahtar rol oynayan dinamik moleküller olarak görev yapar. Bu nedenle, E-kaderinlerin ekspresyon düzeyleri ve fonksiyonları, yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla geliştirilecek terapötik stratejilerde potansiyel hedefler arasında yer almaktadır.

1.3.2. İntegrinler

İntegrinler, hücre yüzeyinde yer alan ve α ile β alt birimlerinden oluşan heterodimerik glikoprotein reseptörlerdir. Bu reseptörler, ECM ve hücre-hücre etkileşimlerinde önemli roller üstlenir. Günümüzde, 18 α ve 8 β alt birimden oluşabilen ve hücre tipine özgü olarak ifade edilen 24 farklı fonksiyonel integrin heterodimeri tanımlanmıştır; bu durum, integrin ailesine hem yapısal hem de işlevsel çeşitlilik sağlar (Makrilia ve ark., 2009).

Her bir integrin molekülü, ECM ligandlarına bağlanan geniş bir hücre dışı alan, hücre zarını geçen tek bir transmembran alan ve hücre iskeleti ile sinyal proteinleriyle etkileşim kuran kısa bir sitoplazmik kuyruk olmak üzere üç temel bölgeden oluşur. Hücre dışı alan; fibronektin, fibrinojen, vitronektin, laminin ve kolajen gibi ECM proteinlerine bağlanarak bu proteinler için reseptör görevi görür. İntegrinler, sadece adezyon molekülleri değil, aynı zamanda çok sayıda hücresel süreci yöneten sinyal iletim merkezleri olarak da işlev görür. Gen ekspresyonu, hücre döngüsü ilerlemesi, hayatta kalma, proliferasyon, migrasyon ve farklılaşmayı düzenleyerek temel hücresel işlevleri kontrol eder (Makrilia ve ark., 2009).

İntegrinler, yara iyileşme sürecinde ECM organizasyonu, hücre apoptozunun düzenlenmesi, TGF- β aracılı sinyal iletimi ve sitoskelet yapının yeniden yapılandırılmasına aracılık eder. Özellikle β 1-integrinler, yeniden epitelizeasyon süreci için kritik öneme sahiptir; β 1-integrin yokluğunda fare modellerinde hücre göçünün azaldığı gözlenmiştir (Makrilia ve ark., 2009).

Ayrıca, β 3-integrinlerin miR-378a adlı mikro ribonükleik asit (microRNA) baskılanması aracılığıyla hücre farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, ECM'in yetersiz bileşimi ve mekanik özelliklerindeki bozulmalar, kronik yaraların patogenezinde başlıca katkı sağlayan faktörler arasında yer almaktadır. α 6 β 4

ve $\alpha 5\beta 1$ integrin alt tipleri, epidermal hücrelerin ön kenarında kümelenerek hücre polaritesinin oluşumuna ve sitoskelet organizasyonun düzenlenmesine katkıda bulunur; bu mekanizmalar, etkili hücre göçü ve fibronektin organizasyonu için kritik öneme sahiptir (Yang ve ark., 2019).

1.3.3. Selektinler

Selektinler, ligandlara bağlanabilme yeteneklerini sağlayan belirli yapısal motiflere sahip, transmembran özellik gösteren hücre adezyon molekülleri ailesinin bir diğer üyesidir. Bu proteinler, amino-terminal lektin alanı, epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri bir alan, 2 ile 9 arasında değişen sayıda tamamlayıcı düzenleyici protein tekrarı, tek bir transmembran bölgesi ve kısa bir sitoplazmik kuyruk içerir. Selektinler endotel hücreleri, lökositler ve trombositler arasında hücre-hücre etkileşimini düzenleyen üç ana üyeden oluşur: E-selektin (endotel kaynaklı), L-selektin (lökosit kaynaklı) ve P-selektin (trombosit ve endotel kaynaklı). Özellikle, E-selektin, yalnızca endotel hücrelerinde ifade edilir ve tümör nekroz TNF- α ile IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin uyarısı sonucu indüklenir. Bu durum, enflamasyon veya doku hasarı bölgelerinde lökositlerin damar duvarına bağlanmasını ve adezyonunu kolaylaştırır. P-selektin, hem trombositler hem de endotel hücreleri tarafından eksprese edilirken; L-selektin, esas olarak lökositlerde bulunur. Tüm selektinler, kalsiyum bağımlı olarak gerçekleşen kan hücresi–endotel hücre etkileşimlerinde görev alır ve inflamatuvar yanıtın erken evrelerinde lökositlerin damar duvarına ilk tutunmasını, yani yakalanma ve yuvarlanma süreçlerini düzenler (Hintermann ve Christen, 2019).

1.3.4. İmmüoglobulin (Ig) Süperailisi

İmmüoglobulin süper ailesi (IgSF) proteinleri, bilinen en büyük ve yapısal olarak en çeşitli protein süper ailelerinden birini oluşturur. Bu protein ailesinin antijen tanıma, büyüme faktörü bağlanması, sinyal iletimi ve hücre adezyonu gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rolleri vardır. Ig süper ailesi hücre adezyon molekülleri (IgCAM), hücre dışı kısımlarında en az bir immüoglobulin benzeri alan içerir ve hücre-hücre adezyonunu sağlamak amacıyla trans konfigürasyonda homofilik veya heterofilik etkileşimler kurar. Bu etkileşimler çoğunlukla en N-terminalde yer alan Ig-benzeri alanlar aracılığıyla gerçekleşir (Finegan ve Bergstralh, 2020).

İmmünoglobulin süper ailesine ait iyi tanımlanmış üyeler arasında; majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I ve II molekülleri, T hücresi reseptör (TCR) kompleksinin protein bileşenleri, hücreler arası adezyon molekülleri (ICAM'ler), vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAM'ler), Platelet/Endotel Hücre Adezyon Molekülü 1 (PECAM-1), nöral hücre adezyon molekülü (NCAM), bağlantı adezyon molekülleri (JAM'ler), nektinler ve nektin-benzeri proteinler yer almaktadır. Doku hasarı ve inflamasyon sırasında, MHC molekülleri ve TCR'ler temel olarak T hücresi aktivasyonunda rol alırken, diğer IgCAM üyeleri başlıca hücre göçü, farklılaşması ve anjiyogenez gibi süreçlerde önemli olan hücre-hücre etkileşimlerini düzenlemektedir. (Hintermann ve Christen, 2019).

ICAM ailesine ait moleküller esas olarak endotel ve epitel hücrelerde bulunur. Fibroblastlar, keratinositler ve lökositler tarafından da eksprese edilirler. ICAM ekspresyonu; interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinler ile reaktif oksijen türlerinin etkisiyle çeşitli inflamatuvar, otoimmün ve alerjik hastalıklarda belirgin şekilde artış göstermektedir (Hintermann ve Christen, 2019).

ICAM-1, ligandlarının hücre dışı alana bağlanmasının ardından sitoplazmik alanı aracılığıyla aktin iskeleti ile etkileşime geçerek dıştan içe sinyal iletimini sağlayan bir biyosensör görevi görür. Bu özellikleri sayesinde ICAM-1, birçok patolojik sürecin hem başlangıcında hem de ilerlemesinde rol oynayan temel bir faktör olarak öne çıkmaktadır (Hintermann ve Christen, 2019).

ICAM-1, lökositlerin dolaşımdan inflamasyon bölgelerine yönlendirilmesinde kritik rol oynayan bir hücre yüzeyi glikoproteini ve adezyon reseptörüdür. ICAM-1'in işlevi en iyi, lökositlerin damar endoteli üzerinden geçiş yaptığı transendotelial migrasyon (TEM) sürecinde tanımlanmıştır. Bu süreçte ICAM-1, lökositlerin endotel yüzeyinde yuvarlanmasını, damar duvarı ile olan adeziv etkileşimlerini düzenlemekte ve lökositlerin endotel bariyerini geçerek inflamasyon bölgesine yönlendirilmesini sağlamaktadır. Ayrıca ICAM-1, ligandlarının hücre dışı alana bağlanmasının ardından sitoplazmik alanı aracılığıyla aktin iskeleti ile etkileşime geçerek dıştan içe sinyal iletimini sağlayan bir biyosensör görevi görür. Bu özellikleri sayesinde ICAM-1, birçok patolojik sürecin hem başlangıcında hem de ilerlemesinde rol oynayan temel bir faktör olarak öne çıkmaktadır (Hintermann ve Christen, 2019).

Yakın dönemde yapılan çalışmalar ise, ICAM-1'in epitel doku hasarı ve iyileşme sürecinde, inflamatuvar yanıtlarda hem doğuştan hem de adaptif bağışıklık sisteminde, çeşitli roller üstlendiğini ortaya koymuştur. Deride ICAM-1 ifadesinin kaybı, keratinosit göçü, granülasyon doku oluşumu ve genel yara iyileşmesi süreçlerinin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir (Bui ve ark., 2020).

VCAM'ler, başta endotel hücreleri olmak üzere epitel hücrelerinde de bulunan adezyon proteinleridir. Bu moleküller, özellikle $\alpha 4\beta 1$ gibi $\beta 1$ -integrin ailesine ait integrinler için başlıca bağlanma reseptörleri olarak işlev görmektedir. ICAM proteinlerine benzer şekilde VCAM'ler, lökositlerin damar endoteline sıkı şekilde yapışmasını kolaylaştırır ve hem transselüler hem de paraselüler yollar üzerinden lökosit geçişini destekler. Bu yönleriyle VCAM'ler, inflamatuvar yanıtta ve bağışıklık hücrelerinin dokuya göçünde kilit bir rol üstlenmektedir. (Hintermann ve Christen, 2019).

PECAM-1 immünoglobulin süper ailesine ait bir transmembran glikoprotein olup, endotel hücreleri, trombositler, monositler, nötrofiller ve bazı lenfosit alt gruplarında yüksek düzeyde ifade edilir. PECAM-1, endotel hücreler arasındaki bağlantılarda yoğun olarak bulunur ve lökositlerin transendotelial migrasyonunda kritik rol oynar. (Nourshargh ve ark., 2006).

NCAM immünoglobulin süper ailesine ait bir glikoprotein olup, nöronlar, glial hücreler, iskelet kası hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinde ifade edilir. NCAM, fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) ile etkileşerek sinyal iletimini başlatır ve bu etkileşim, nörit uzaması ve sinaptik plastisite gibi süreçlerde önemli rol oynar (Povlsen ve ark., 2008).

1.4. Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri (CRISPRs) ve İlişkili Cas Enzimleri ile Genom Düzenleme Mekanizmaları

Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri (CRISPRs), ilk olarak bakteri ve arkeler dahil olmak üzere prokaryotik organizmaların genomunda tanımlanmıştır. CRISPR ile ilişkili proteinlerin (Cas proteinleri) keşfi ve rekombinant DNA teknolojisinin uygulanması sayesinde, CRISPR/Cas sisteminin prokaryotlarda virüslere karşı edinilmiş bir bağışıklık mekanizması olduğu anlaşılmıştır. Bu yeni

keşfedilen sistem, kısa süre içinde genomdaki spesifik genlerin düzenlenmesi için güçlü bir biyomoleküler araç haline getirilmiştir (Zhang, 2021).

Bakteriler ve arkeler gibi prokaryotik organizmalarda bulunan CRISPR/Cas sistemi, virüsler, fajlar veya diğer yabancı genetik materyallerin neden olduğu enfeksiyonları önlemeye yönelik bir adaptif bağışıklık mekanizmasıdır. Bu sistem ilk olarak Ishino ve arkadaşları (Ishino, Shinagawa, Makino, Amemura ve Nakata, 1987) tarafından *Escherichia coli* genomunda keşfedilmiş olup, kısa palindromik tekrar dizileri ve bu dizilere komşu olan aralayıcı bölgelerden oluşan tekrarlayan bir yapı şeklinde tanımlanmıştır. Her bir aralayıcı bölge geçmişte karşılaşılan yabancı genetik materyale ait kısa DNA dizilerini temsil eder. Bu yapı prokaryotların önceki enfeksiyonlara karşı genetik bir hafıza oluşturmaya olanak tanır (Huang, Zhou, Li, Lu ve Liang, 2022).

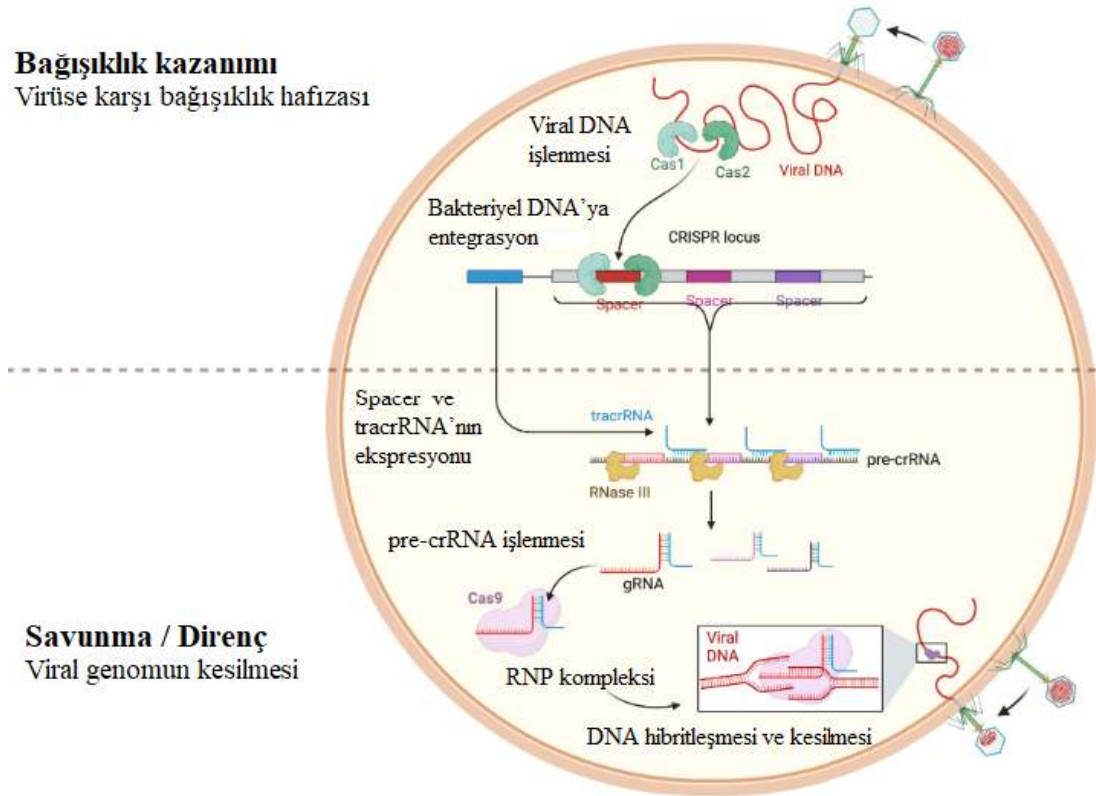
CRISPR sistemleri, moleküler yapıları, işlevleri, hedef nükleik asit türü (DNA veya RNA), efektör protein yapılarına göre iki ana sınıfa ve bu sınıflar Cas proteinlerinin yapısal ve işlevsel farklılıklarına dayanarak altı ana alt tipe (I–VI) ayrılmıştır. Her bir alt tip, özgün Cas protein kümeleri ve mekanizmaları ile karakterize edilmekte olup, özellikle hedef tanıma, nükleik asit kesimi ve bağışıklık yanıtının oluşum süreçlerinde birbirinden ayrılmaktadır (Makarova ve ark., 2015).

Sınıf 1 CRISPR/Cas sistemler Tip I, II ve IV olmak üzere üç tiptir. Tip I sistemleri, interferens aşamasında çok bileşenli CRISPR ile ilişkili antiviral savunma kompleksi kaskadı (CRISPR-associated complex for antiviral defense cascade) kompleksini kullanır ve hedef DNA'nın kesilmesi Cas3 nükleazı aracılığıyla gerçekleştirilir. Tip II sistemleri ise daha sade bir yapıya sahiptir; burada CRISPR RNA (crRNA), trans-aktive edici crRNA (tracrRNA) ve Cas9'un oluşturduğu üçlü kompleks, hedef DNA'yı tanıyarak çift sarmal kırığı oluşturur ve böylece yabancı genetik materyalin etkisiz hale getirilmesini sağlar. Tip IV sistemleri hakkında bilgi sınırlı olmakla birlikte, genellikle plazmidlerle ilişkili oldukları ve kendilerine özgü Cas proteinleri taşıdıkları bilinmektedir (Makarova ve ark., 2015).

Sınıf 2 CRISPR/Cas sistemleri yalnızca bakterilerde bulunur ve Tip III, Tip V ve Tip VI'dan oluşmaktadır. Tip III Cas10 kompleksi aracılığıyla hem DNA hem de RNA hedefleyebilme kapasitesine sahiptir (Hale ve ark., 2009).

Tip V sistemleri, Cas12 ailesi tarafından temsil edilir ve bu sistemler, farklı Protospacer Bitişik Motif (PAM) dizileri ve yapı motifleri aracılığıyla hedef DNA'yı tanıyarak kesme işlemini gerçekleştirir. Tip VI sistemleri ise yalnızca RNA'yı hedef alabilen Cas13 proteinleri ile tanımlanır ve RNA'ya özgü müdahale mekanizmaları ile işlev görür (Abudayyeh ve ark., 2016).

CRISPR/Cas sisteminde kritik bir rol üstlenen Cas proteinlerinin temel işlevi, yabancı DNA'nın tanınmasıdır. Farklı Cas proteinleri sistemin üç temel aşaması olan adaptasyon, ekspresyon ve müdahale evrelerinde özgün görevler üstlenmektedir. Bakteri bir virüs ya da faj tarafından ilk kez enfekte edildiğinde, Cas proteinleri bu yabancı DNA'yı tanıyarak, CRISPR dizisine entegre edilmek üzere kısa DNA segmentlerine ayırır (Şekil 6) (Makarova ve ark., 2015).



Şekil 6. CRISPR-Cas9 bağışıklığının şematik gösterimi. (Guo ve ark., 2022'den değiştirilerek alınmıştır.)

1.4.1. Adaptasyon

Adaptasyon aşaması, bakteriyel genomun yabancı genetik materyale karşı hafıza oluşturduğu ilk savunma basamağıdır. Bu süreçte Cas1-Cas2 kompleksi gibi

özelleşmiş Cas proteinleri, yabancı DNA'nın tanımlanmasında ve bu DNA'dan yaklaşık 30-40 baz çifti uzunluğunda olan proto-aralık adı verilen kısa bir dizinin ayrıştırılmasında kritik rol oynar. Bu hedef seçimi sırasında PAM dizileri tanınır ve bu motiflerin varlığı hedef DNA'nın doğru ayrılmasında belirleyicidir. Tanımlanan protospacer, CRISPR lokusunun 5' ucundaki tekrarlayan DNA dizileri arasına entegre edilerek bir aralık haline getirilir. Böylece hücre, gelecekte aynı patojene karşı tanıma ve müdahale yeteneği kazanır (Wright ve ark., 2016).

1.4.2. Ekspresyon

Adaptasyon sonrasında farklı aralıklar, tek bir uzun transkript şeklinde transkribe edilerek öncü CRISPR RNA (pre-crRNA) formunu oluşturur. Bu öncül crRNA, daha sonra transaktif edici CRISPR RNA (tracrRNA) aracılığı ile işlenerek olgun CRISPR RNA (crRNA) molekülleri haline gelir. Her crRNA, bir aralık dizisini ve ona komşu kısa tekrar dizilerini içerir. Pre-crRNA'nın işlenmesi, CRISPR-Cas sisteminin türüne bağlı olarak farklı protein kompleksleri tarafından gerçekleştirilir. Bu süreç sonunda, CRISPR dizisinden transkripsiyonla elde edilen CRISPR RNA (crRNA) ve tracrRNA, daha önce tanınan yabancı DNA'ya özgü dizileri içeren bir rehber görevi görür. crRNA, tracrRNA ve Cas proteinlerinden oluşan kompleksler, benzer bir enfeksiyon durumunda tekrar devreye girer. crRNA, baz eşleşmesi aracılığıyla yabancı DNA'yı spesifik olarak tanır ve hedefler; bu da Cas proteininin hedef DNA'yı parçalayarak konağı korumasına olanak tanır (Makarova ve ark., 2015).

1.4.3. Müdahale (İnterference)

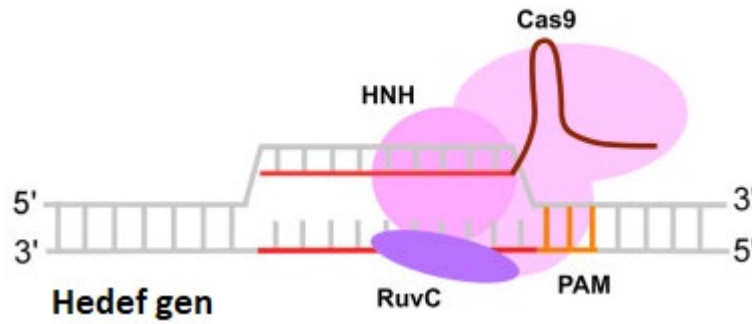
Müdahale aşaması, CRISPR-Cas sisteminin aktif savunma fonksiyonunu gerçekleştirdiği son basamaktır. Bu aşamada crRNA, yabancı DNA veya RNA dizilerinde bulunan proto-aralayıcı bölgeleriyle baz eşleşmesi yaparak hedefi tanır. Tanıma işlemi, crRNA'yı taşıyan Cas protein kompleksi tarafından gerçekleştirilir ve hedef dizinin tanınmasının ardından Cas nükleaz aktivitesi aracılığıyla bu genetik materyal kesilerek etkisiz hale getirilir (Makarova ve ark., 2015).

1.4.4. Ökaryotlarda CRISPR/Cas9 Sistemi ve Programlanabilir Genom Düzenleme

Keşfedildiği ilk dönemlerde istilacı virüse karşı bakteriler tarafından geliştirilmiş bir savunma mekanizması olduğu düşünülen CRISPR, ilerleyen süreçte yapılan çalışmalar ile birlikte bir organizmada bulunan belirli bir genetik bilgiyi

değiştirmenin yeni ve en yaygın yolu haline gelmiştir. Genel olarak, CRISPR aracılı genom düzenleme sistemi iki ana bileşenden oluşmaktadır: rehber RNA (gRNA) ve Cas9 proteini. En yaygın kullanılan Cas proteinlerinden biri olan *Streptococcus pyogenes* kökenli Cas9 (SpCas9), rehber RNA tarafından hedeflenen DNA dizisine yönlendirilir. Cas9-gRNA kompleksi, öncelikle hedef DNA dizisinde yer alan PAM dizisini tanımalıdır. Memeli hücrelerinde bu PAM dizisi 5'-NGG-3' şeklindedir. Bu kısa DNA dizisi, crRNA tarafından kodlanmamaktadır. Cas proteininin hedef DNA'ya bağlanmasını ve çift sarmallı DNA kesimini başlatmasını sağlayan kritik bir tanıma ögesidir (Li ve ark., 2023).

Cas9 proteini, iki farklı nükleaz domaini aracılığıyla DNA üzerinde kesim yapabilir. Bu iki katalitik alan, hedef DNA dizisinde özgül kesim işlemlerini farklı iplikler üzerinde yürütür. HNH domaini gRNA ile tamamlayıcılık gösteren hedef DNA ipliğini keserken; RuvC domaini ise tamamlayıcı olmayan, yani PAM dizisini içeren karşıt ipliği keser (Şekil 7). Bu eşzamanlı kesim işlemleri sonucunda, hedeflenen PAM dizisinin yaklaşık üç baz çifti yukarısında, uçları düzgün bir çift iplikli kırık (double-strand break; DSB) meydana gelir (Behr ve ark., 2021).

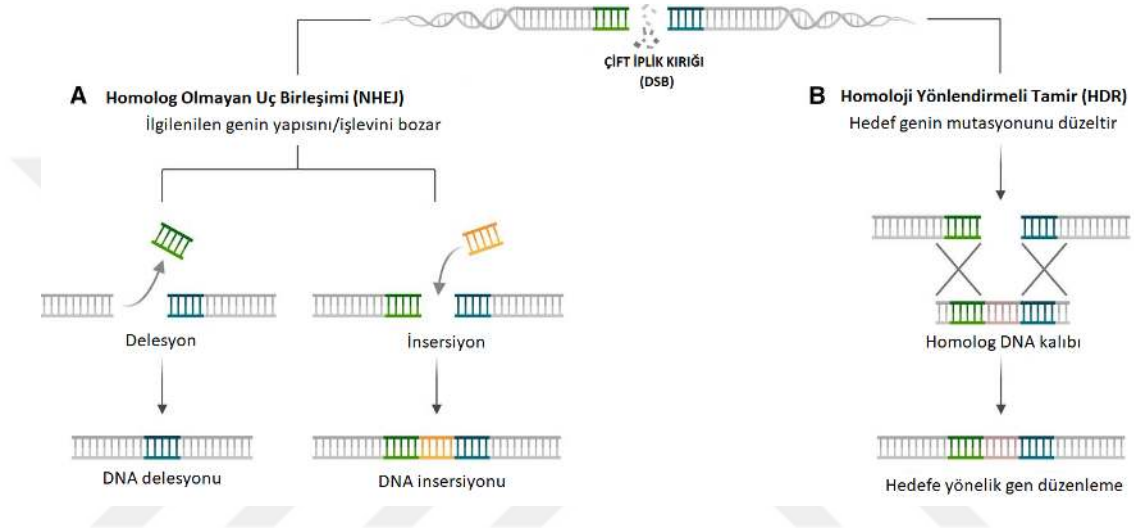


Şekil 7. Cas 9 nükleaz domainleri ve kesim bölgeleri (Liao ve ark., 2024).

Oluşan bu DSB, hücrenin DNA hasar yanıt mekanizmalarını tetikleyerek ya homoloji yönlendirmeli tamir (HDR) ya da hata eğilimli rastgele nükleotidlerin eklendiği bir tamir mekanizması olan Homolog olmayan uç birleşimi (NHEJ) yollarıyla tamir edilir (Wang ve ark., 2022).

NHEJ çift iplik kırıklarının onarımında kırık iki DNA ucunun herhangi bir homologluk gerektirmeksizin doğrudan ligasyonunu içeren başlıca hücresel mekanizmadır. Bu yolak, DNA uçlarının hizalanması sırasında genellikle kısa

nükleotid insersiyonuna veya delesyona neden olabileceğinden dolayı hata eğilimlidir. Ortaya çıkan bu insersiyon-delesyon mutasyonları, özellikle protein kodlayan bölgelerde çerçeve kaymalarına veya erken dur kodonu oluşumuna yol açarak genin işlev kaybına neden olabilir. HDR mekanizması ise, DNA'daki hedef bölgeyle homolog olan DNA kalıbının varlığını gerektirir. Bu kalıp, DSB'nin ardından hedef bölgeye belirli genetik materyalin hassas bir şekilde eklenmesine olanak tanır (Şekil 8). HDR temelli uygulamalar, genetik modifikasyonların yüksek doğrulukla gerçekleştirilmesini sağladığı için tercih edilmektedir (Behr ve ark., 2021).

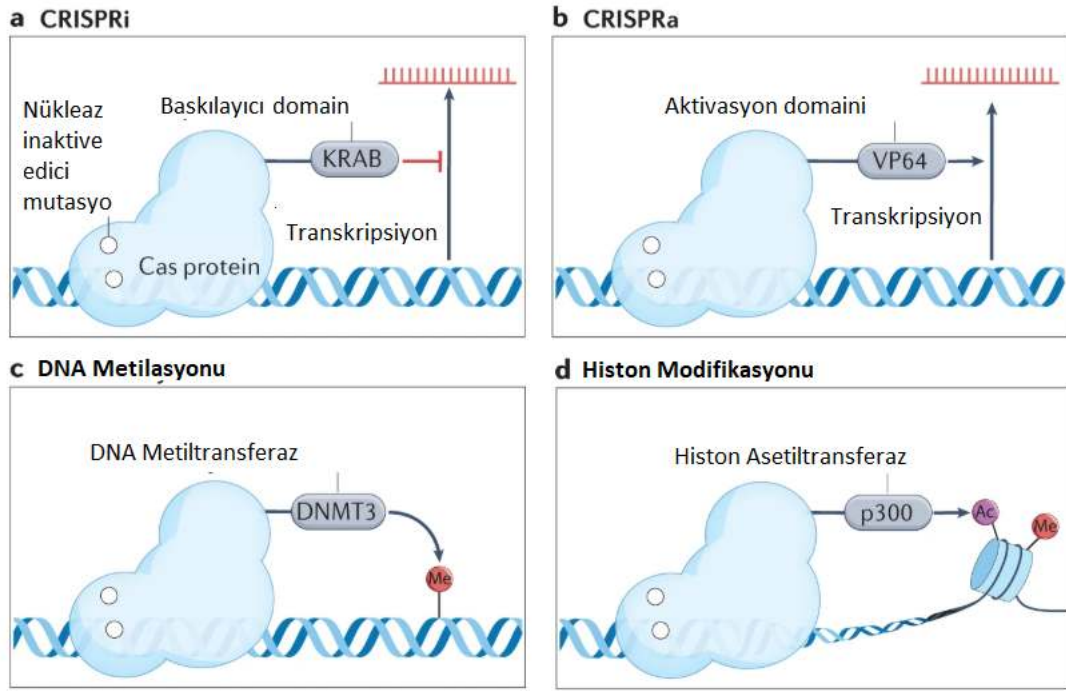


Şekil 8. CRISPR-Cas9 sistemine bağlı çift iplikli DNA kırıklarının NHEJ ve HDR tamir mekanizması aracılığıyla onarılması.

1.4.5. Cas9 Aracılı Gen İfadesinin Düzenlenmesi ve Epigenetik Modifikasyonlar

CRISPR/Cas9 sisteminin çift sarmallı DNA'yı kesme yeteneği, iki nükleaz yapısal alanının işlevine bağlıdır. Bu nükleaz alanlarının mutasyona uğraması sonucunda, DNA kesme aktivitesini kaybeden ve ölü Cas 9 (dead Cas9/dCas9) olarak adlandırılan mutantlar ortaya çıkar. dCas9, rehber RNA eşliğinde DNA üzerindeki spesifik bölgelere bağlanmaya devam eder; ancak DNA kesme yeteneği olmadığından gen transkripsiyonunu daha kontrollü ve geri döndürülebilir bir şekilde düzenler. Bu özellik, CRISPR aktivasyonu (CRISPRa) ve CRISPR interferansı (CRISPRi) yöntemlerinin temelini oluşturur. Özellikle genomda kalıcı değişiklikler yapılmaması, hedef dışı etkilerden kaynaklanabilecek potansiyel risklerin önemli ölçüde azaltılmasını sağlar (Li ve ark., 2023).

CRISPRi yönteminde dCas9'un doğrudan bir kodlama dizisine hedeflenmesi, memeli hücrelerinde transkripsiyonu etkili biçimde engellemek için genellikle yeterli değildir. Bu nedenle, dCas9, belirli bir genomik lokusun yakınına taşındığında, yerel gen baskılanmasını başlatmak amacıyla Krüppel ilişkili kutu (KRAB) gibi baskılayıcı yapısal alanlarla birleşirler. Bu dCas9-KRAB proteini, sadece hedeflendiği genomik bölgede gen ifadesini susturmak üzere kesin bir hedefleme mekanizmasıyla hareket eder. Öte yandan, CRISPRa yönteminde, nükleaz aktivitesi olmayan Cas proteinleri transkripsiyonel aktivatörlerle birleştirilerek belirli genlerin ekspresyon seviyelerinin artması sağlanır. Gen regülasyonu özellikle memeli hücrelerinde karmaşık ve çok katmanlıdır; gen ekspresyonu birbirleriyle etkileşim halinde olan çeşitli düzenleyici unsurlar tarafından kontrol edilmekte ve epigenetik modifikasyonlar bu süreçte kritik rol oynamaktadır. CRISPR/dCas9, aktive edici veya baskılayıcı yapısal alanların yanı sıra epigenetik modifikasyon enzimleriyle, örneğin DNA metiltransferaz DNMT3A, DNMT3L ve histon asetiltransferaz P300 gibi faktörlerle birlikte kullanılabilir. Ayrıca, histon modifikasyonlarını düzenleyen enzimler (H3K27 asetilasyonu/metilasyonu, H3K4 metilasyonu, H3K9 metilasyonu ve H3K79 metilasyonu) tek başına veya kombinasyon halinde dCas9'a eklenerek hedef bölgedeki epigenetik işaretler düzenlenebilir (Şekil 9). Bu CRISPR destekli epigenetik modifikasyonlar, transkriptomun yeniden programlanmasını mümkün kılarak klasik CRISPRi veya CRISPRa yöntemlerine kıyasla uzun süreli ve spesifik gen susturma veya aktivasyonunu sağlamaktadır (Chavez, Chen, Finn, & Qi, 2023).



Şekil 9. a) CRISPRi: dCas9, baskılayıcı domain KRAB ile birleştirilerek hedef genin transkripsiyonu baskılanır. **(b) CRISPRa:** dCas9, aktivasyon domaini VP64 ile kaynaştırılarak gen ekspresyonu artırılır. **(c) DNA Metilasyonu:** dCas9, DNA metiltransferaz DNMT3 enzimi ile birleştirilerek hedef DNA bölgesine metil grubu eklenir ve gen ifadesi susturulur. **(d) Histon Modifikasyonu:** dCas9, histon asetiltransferaz p300 ile kaynaştırılarak histon proteinlerine asetil grubu eklenir, bu da gen ekspresyonunu artıran epigenetik değişikliklere yol açar (Chavez ve ark., 2023'den değiştirilerek alınmıştır).

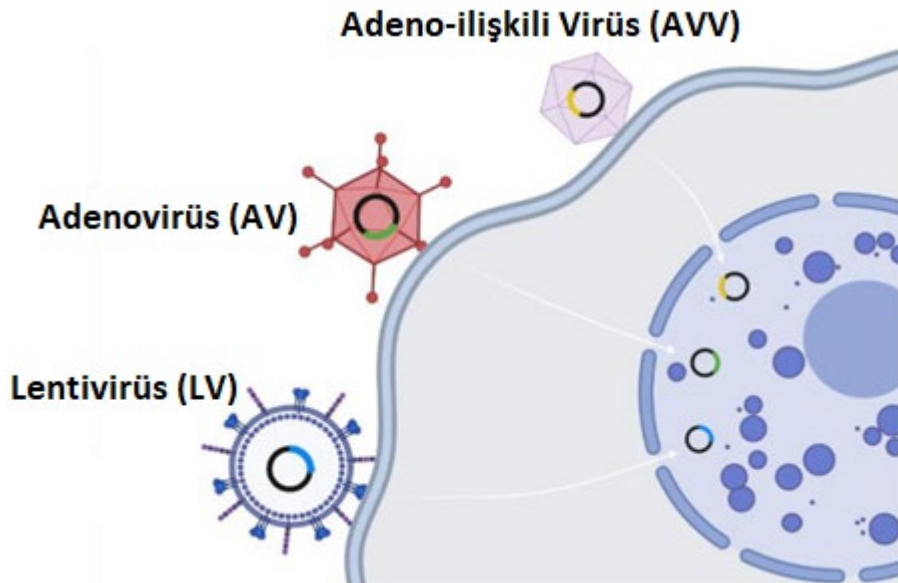
Ancak, gen ifadesini düzenleyen mekanizmaların karmaşıklığı nedeniyle, belirli bir genom bölgesine yönelik tasarlanan gRNA'nın çoklu genlerin ekspresyonunda değişikliklere yol açabileceği ve bu nedenle potansiyel risklerin ileri düzeyde araştırılması gerekmektedir. Ayrıca, DNA dizisinin doğrudan değiştirilmemesi, bu teknolojilerin verimliliğini sınırlayan bir unsurdur. Hedefe özgü ve kalıcı olmayan gen düzenleme gereksinimleri için CRISPR/dCas9 aracılı yaklaşımlar kontrollü ve spesifik müdahaleleri mümkün kılarak genom mühendisliğinde yeni nesil uygulamalara olanak sağlamaktadır (Chavez ve ark., 2023)

1.4.6. CRISPR-Cas Sistemlerinde Moleküler ve Fiziksel Taşıyıcılar

CRISPR-Cas aracılı gen düzenleme teknolojilerinin terapötik ve araştırma amaçlı uygulamalarında başarının temel belirleyicilerinden biri, sistemin hedef hücre

veya dokuya etkin, güvenli ve kontrollü bir şekilde iletilmesini sağlayan taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir. Hem moleküler hem de fiziksel taşıyıcı sistemler, CRISPR bileşenlerinin stabilitesini koruyarak hücre içine alımını kolaylaştırmak, hedef özgüllüğünü artırmak ve olası yan etkileri en aza indirmek amacıyla tasarlanmaktadır. Vektörel taşıyıcılar ile fiziksel yöntemler arasında seçim, uygulamanın türüne, hedef hücre tipine ve istenen düzenleme düzeyine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Huang ve ark., 2022).

Virüsler, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında, genetik materyalin hücrelere taşınmasında doğal vektörler olarak işlev görmeleri ve kolayca manipüle edilebilmeleri nedeniyle özellikle gen terapisi uygulamalarında ilk olarak tercih edilir. Adeno ilişkili virüsler (AAV), tek zincirli DNA (ssDNA) genomlarına sahip olmaları ve birçok hücreyi enfekte edebilmeleri, insan hücrelerinde ciddi bağışıklık tepkisi oluşturmadan genetik materyal transferi gerçekleştirebilmeleri gibi avantajları sayesinde hem in vitro hem de in vivo koşullarda CRISPR-Cas9 bileşenlerinin hücrelere iletilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. AAV'lere alternatif olarak, adenovirüsler (AV) ve lentivirüsler (LV) de CRISPR-Cas9 bileşenlerinin hücresel iletiminde kullanılmaktadır. AV ve LV sistemleri, daha yüksek klonlama kapasitesine sahip olmaları sayesinde, Cas9, gRNA ve işaretleyici proteinlerin tek bir vektörle taşınmasına olanak tanır. Özellikle LV'lerin, hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelerde yüksek transdüksiyon verimliliği göstermesi, onları çeşitli hücre tipleri için etkili bir taşıyıcı sistem haline getirmektedir Şekil 10 (Li ve ark., 2023; Sioson ve ark., 2021).



Şekil 10. Virüsler aracılığıyla CRISPR-Cas sisteminin taşınması (Sioson ve ark., 2021).

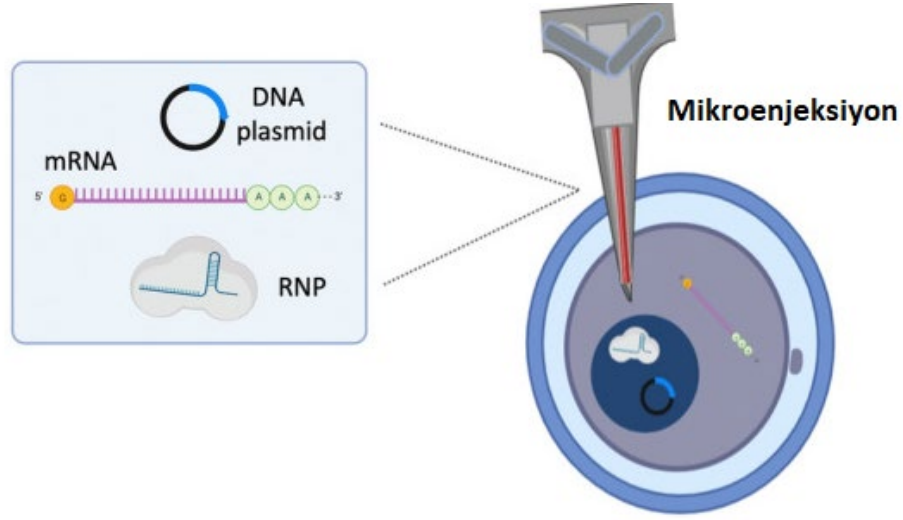
CRISPR sistemlerinde kullanılan diğer bir taşıyıcı ise lipid bazlı nanopartiküller (LNP) dir. LNP'ler, fosfolipit, kolesterol ve polietilen glikol gibi lipid bileşenlerden meydana gelmektedir. Yüksek biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilir yapıları ve taşıdıkları yükleri koruyarak hedefe iletebilme özellikleri nedeniyle, birçok çalışmada terapötik ajanların iletiminde etkin taşıyıcılar olarak tercih edilmektedirler. Düşük maliyet, üretim kolaylığı, düşük immünojenite ve transgenik DNA'nın boyutunda sınırlama olmaması avantajlarıyla, nanomalzeme bazlı taşıyıcılar da gen terapisi için sıklıkla kullanılmaktadır (Sinclair ve ark., 2023).

Lipofektamin, DNA, mRNA ve ribonükleoprotein (RNP) kompleksleri dahil olmak üzere çeşitli oligonükleotidlerin veya proteinlerin etkin biçimde iletilmesi amacıyla geliştirilmiş fosfolipid formülasyonları ailesidir. Katyonik lipit temelli bu sistem, genetik materyalin hücrelere iletilmesini sağlamak amacıyla anyonik yüke sahip hücre zarları ile etkileşime geçebilmekte ve bu zarları geçebilmektedir (Sinclair ve ark., 2023)

Katyonik polimer taşıyıcı sistemler ise kimyasal çeşitlilik ve işlevsel potansiyel göstermekte olup, esnek yapısal tasarımlar için daha fazla olanak sunmakta ve iletim özelliklerini artırmak üzere CRISPR/Cas9 bileşenleriyle doğrudan kompleks oluşturabilmektedir. Bu taşıyıcılardan biri olan polietilenimin (PEI), doğrusal veya dallı yapılarda bulunabilen ve farklı moleküler ağırlıklara sahip hidrofilik bir katyonik polimerdir. PEI, elektrostatik etkileşimler aracılığıyla negatif yüklü DNA ile kompleks oluşturabilir ve onu yoğunlaştırabilir. Ayrıca, endozomal kaçışı kolaylaştıran pH tamponlama kapasitesi sayesinde genetik materyalin hücre içi taşınmasında önemli avantajlar sunmaktadır (Sinclair ve ark., 2023).

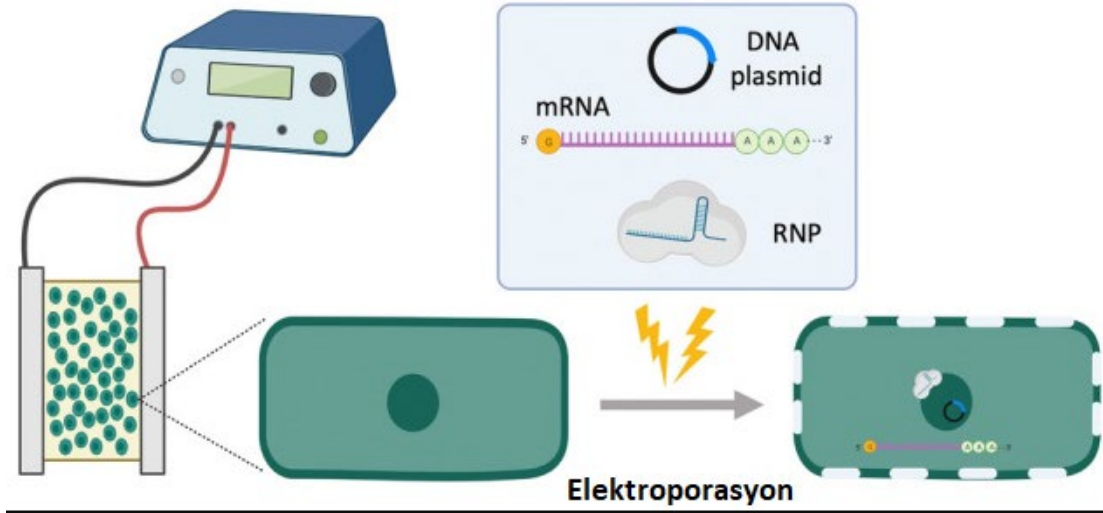
Fiziksel taşıyıcı sistemlerden biri olan mikroenjeksiyon, CRISPR bileşenlerinin hücrelere %100'e yakın bir verimlilikle aktarılmasını sağlar. Bu yöntemde, CRISPR bileşenleri hücrelere tek tek enjekte edilir. İşlem sırasında bir mikroskop ve 0,5–5,0 µm çapında bir iğne kullanılarak hücre zarı delinmekte ve taşınmak istenen kargolar doğrudan hücre içindeki hedef bölgeye iletilmektedir (Şekil 11). Mikroenjeksiyon, hücre dışı matriksler, hücre zarı ve sitoplazmik bileşenlerin neden olabileceği fiziksel engelleri ortadan kaldırır. Ayrıca, viral vektörlerin

kullanımında karşılaşılan ve kargo moleküllerinin büyüklüğü gibi sınırlayıcı faktörler, bu yöntemde geçerli değildir. Ancak, mikroenjeksiyon yalnızca in vitro çalışmalar için uygundur. (Lino ve ark., 2018).



Şekil 11. CRISPR bileşenlerinin mikroenjeksiyon yöntemiyle hücreye aktarılması (Sioson ve ark., 2021).

Gen düzenleme araçlarının bir hücre popülasyonuna iletilmesi için uzun süredir kullanılan fiziksel yöntemlerden bir diğeri elektroporasyondur. Bu teknik, tampon içerisinde süspansiyon edilmiş hücrelerin zarlarında geçici nanometre boyutunda gözenekler oluşturmak amacıyla darbeli yüksek voltajlı elektrik akımları kullanır. Bu geçici gözenekler, hidrodinamik çapları onlarca nanometre olan CRISPR bileşenlerinin hücreye geçişini mümkün kılar. Elektroporasyon, hücre zarını geçici olarak zedeleyerek sistemin hücre içerisine iletilmesine olanak tanıyan optimize edilmiş bir voltaj uygulamasıdır. Bu yöntemin önemli avantajlarından biri, farklı hücre tipleri arasında ayırım yapmaksızın çalışabilmesi ve başlangıçta manipülasyonu zor olan hücrelere CRISPR bileşenlerini etkin biçimde aktarabilmesidir. Elektroporasyon, genellikle in vitro ortamda kullanılmakla birlikte, mikroenjeksiyonda olduğu gibi ex vivo uygulamalar için de uygundur. Bununla birlikte, hücre zarlarına uygulanması gereken yüksek voltaj nedeniyle, bu yöntemin in vivo uygulamalarda kullanımı sınırlıdır (Sioson ve ark., 2021).



Şekil 12. Elektroporasyon yöntemiyle CRISPR bileşenlerinin hücreye aktarılması. (Sioson ve ark., 2021).

1.4.7. CRISPR/Cas Sistemlerinin Moleküler Sınırlamaları

Günümüzde CRISPR tabanlı sistemler, gen düzenleme alanında önemli gelişmelere olanak sağlamış ve CRISPR, CRISPRi ve CRISPRa gibi farklı varyantları aracılığıyla gen ekspresyonunun inhibisyonu veya aktivasyonunda güçlü biyomoleküler araçlar haline gelmiştir. Bu sistemlerin gelişmesi sayesinde, genetik, epigenetik ve transkripsiyonel düzensizliklere müdahale edilebilmekte ve orak hücreli anemi, Huntington hastalığı, beta-talasemi ve Duchenne musküler distrofi gibi çeşitli kalıtsal hastalıkların tedavisinde umut verici sonuçlar elde edilebilmektedir. Ancak, hedef dışı mutasyonlar, DNA onarım mekanizmalarının sınırlı verimliliği ve sistem bileşenlerinin hedef hücre ya da dokulara güvenli ve etkin biçimde iletilmemesi gibi çeşitli teknik ve biyolojik sınırlamalar, bu sistemlerin yaygın klinik uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır (Sinclair ve ark., 2023).

CRISPR/Cas9 temelli gen düzenleme sistemlerinde karşılaşılan en temel güvenlik sorunu, hedef dışı etkilerin ortaya çıkma riskidir. Yaklaşık 20 nükleotid uzunluğundaki gRNA, teorik olarak özgül hedef DNA dizisine yönlendirme işlevi görse de, deneysel veriler gRNA'nın genomda benzer dizilimlere sahip başka bölgelerle de etkileşime girebildiğini ve bunun da istenmeyen mutasyonlara yol açabileceğini göstermiştir. Bu sorunun önüne geçebilmek amacıyla çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Örneğin, hedef dışı bağlanma olasılığı düşük gRNA dizilerinin tercih edilmesi ve Cas9 protein konsantrasyonunun azaltılması, bu etkiyi

sınırlayabilmektedir; ancak bu tür optimizasyonlar aynı zamanda hedef DNA üzerinde kesim etkinliğini azaltma riski taşımaktadır (Sinclair ve ark., 2023; Huang ve ark., 2022).

CRISPR/Cas9 sisteminde hedefe yönelik hassas gen düzenlemesi temelde HDR mekanizmalarına dayanmaktadır. Ancak literatürdeki çok sayıda çalışma, HDR yolunun genellikle düşük verimlilikle çalıştığını ve hücrelerin daha hızlı olmasına rağmen hata yapma olasılığı yüksek olan NHEJ mekanizmasını tercih ettiğini ortaya koymuştur. Bu durum, istenilen genetik değişikliklerin etkin şekilde gerçekleştirilmesini sınırlandıran önemli bir faktördür. Buna ek olarak, CRISPR/Cas sistemlerinin hedef hücre ya da dokulara güvenli ve verimli bir biçimde ulaştırılması, en büyük teknik zorluklardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Viral vektörler, yüksek transfeksiyon verimliliği sunmaları nedeniyle yaygın olarak tercih edilse de; sınırlı taşıma kapasitesi, konak bağışıklık sistemi tarafından tanınarak bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyeli, genom entegrasyonuna bağlı mutagenез riski ve sınırlı hedef doku seçiciliği gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Viral olmayan taşıyıcı sistemler ise, bu tür biyogüvenlik sorunlarını büyük ölçüde ortadan kaldırırsa da, dolaşımdan uzaklaştırılması ya da hedef dokulara yeterli düzeyde spesifik dağılım sağlayamaması gibi kendilerine özgü başka engeller barındırmaktadır (Sinclair ve ark., 2023).

CRISPR/Cas sistemleri hastalıkların genetik temeline yönelik müdahalelerde önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak bu teknolojilerin klinik uygulamalara güvenli, etkin ve sürdürülebilir biçimde katkı sağlayabilmesi için mevcut sınırlamaların farklı açılardan ele alınması gerekmektedir. Hedef dışı mutasyon risklerinin azaltılması, DNA tamir mekanizmalarının yönlendirilerek düzenleme verimliliğinin artırılması ve kargoların uygun taşıyıcılarla hedef hücrelere hassas bir şekilde iletilmesi, bu alandaki öncelikli araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu alanlarda gerçekleştirilecek ileri düzey çalışmalar, CRISPR sistemlerinin klinik alanda daha yaygın ve güvenli biçimde kullanılmasını sağlayacaktır (Sinclair ve ark., 2023; Huang ve ark., 2022).

İKİNCİ BÖLÜM

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyal

2.1.1. Etik Kurul İzni ve Hayvan Materyali Temini

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 08/02/2022 tarihli ve 221 no'lu etik kurul izni alınmıştır. Çalışmada kullanılan hayvan materyali BALB/C ırkı 8-10 haftalık erkek fareler olacak şekilde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Farelere yapılan cerrahi uygulamalar, yara bakımları ve örneklerinin toplanması işlemleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

2.1.2. Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonlar ve Kitler

Çalışmada uygulanan çeşitli yöntemlerde kullanılan reaktifler, malzemeler ve ekipmanlar Tablo 1'de detaylı şekilde listelenmiştir.

Tablo 1. Kullanılan reaktifler, malzemeler ve ekipmanlar

Hücre Kültür Ortamları ve Reaktifler		
Adı	Marka	Katalog No
Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco	70011-044
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Capricorn	HBSS-3A
Alpha Minimum Essential Medium Eagle (α -MEM)	Capricorn	MEMA-RXA
RPMI-1640	Gibco	11875093
Fetal Bovine Serum (FBS)	Capricorn Scientific	CP14-1114
L-glutamin	Gibco	1230909
Penisilin-streptomisin	Gibco	1780182
Gentamisin	Capricorn Scientific	CP15-1393

Amfoterisin-B	Capricorn Scientific	CP15
DMEM, high glucose	Gibco	11-965-092
Trypsin-EDTA	Gibco	25200056
Polybren	Sigma-Aldrich	TR-1003
Polietilenimin (PEI, MW 25,000)	Polysciences	23966
StemPro Accutase	Gibco	A1110501
Askorbik Asit	Thermo Fisher Scientific	A15613.36
Deksametazon	Thermo Fisher Scientific	A17590.14
β -Glycerophosphate	Sigma-Aldrich	G5422
Kollajenaz tip I	Bioshop	col004.100)
Histoloji ve Boyama Reaktifleri		
Adı	Marka	Katalog No
Formalin solution, neutral buffered, 10%	Sigma	HT501128-4L
Oil Red O	Sigma-Aldrich	1.02419
Alizarin red	Sigma-Aldrich	TMS-008-C
TRITON X-100	Sigma-Aldrich	X100
N,N-Dimethylformamide	Merck	103034
Naphthol AS MX-PO4	Sigma-Aldrich	N4875
TRIS Base	Merck Millipore	648310-M
Fast Red Violet LB Salt	Sigma-Aldrich	F3381

Gümüş nitrat	Merck	101512
Sitrat Tampon	Thermo Scientific	258580010
Tween 20	Sigma-Aldrich	822184
Hidrojen Peroksit	Merck	1085569025
Keçi Serumı	Gibco	16210064
Polilizinli lam	Sigma-Aldrich	P0425
Moleküler Biyoloji Enzim ve Kitleri		
Adı	Marka	Katalog No
T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK)	NEB	M0201S
10X T4 DNA ligase buffer	NEB	M0202S
BsmBI-HF Enzyme	NEB	R0739S
5X HotStart Taq Polimeraz	NEB	M0495S
Shrimp Alkaline Phosphatase	NEB	M0371S
Exonuclease I	NEB	M0568
QuickExtract DNA Extraction	Lucigen	-
High-Capacity cDNA RT Kit	Applied Biosystems	4374966
2X SYBR Green Master Mix	GenemarkBio	-
BigDye Terminator v3.1 Cycle Seq. Kit	Applied Biosystems	4337456
Hücreler, Plazmidler ve Transfeksiyon Reaktifleri		
Adı	Marka	Katalog No
HEK293T Hücreleri	ATCC	CRL-3216
FuGENE HD transfeksiyon Ajanı	Promega	E2311

Opti-MEM	Gibco	31985070
lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro Plazmidi	Addgene	99373
LentiGuide-Hygro-eGFP Plazmidi	Addgene	99375
Zarf Plazmidi pMD2.G	Addgene	12259
Paketleme Plazmidi pCMVR8.74	Addgene	22036
Ampisilin	Merck	59349
Kitler		
Adı	Marka	Katalog No
Muse Count & Viability Assay Kit	Merck	-
Plasmid Miniprep Kit	GenemarkBio	-
Mix & Go! E. coli Transformation Kit	Zymo Research	T3001
Luria Bertani	Merck Millipore	110285
OneShot Stbl3 Chemical Competent E. coli	Thermo Fisher Scientific	C737303
Maxiprep EndoFree Plasmid Kit	Qiagen	12362
Quick-RNA Miniprep Kit	Zymo Research	R1055
Antikorlar		
Adı	Marka	Katalog No
PE Anti-Human/Mouse CD44	Elabscience	E-AB-F1100D
PE Mouse Anti-Human/Mouse CD90	BD Pharmingen	555596
CD34 PE Conjugated	Bioss	bs-0646r-pe
CD45 PE Conjugated	Bioss	bs-4819R-PE

Anti-Osteocalcin Monoclonal	Santa Cruz	sc-365797
Anti-Osteonectin Polyclonal	Elabscience	E-AB-14366
Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) FITC	Elabscience	E-AB-1014
IL-10 Polyclonal	Elabscience	E-AB-70235
TNF- α Polyclonal	Elabscience	E-AB-33121
MMP-2 Polyclonal	Elabscience	E-AB-32054
BrdU Monoclonal	Elabscience	E-AB-70248
İn Vivo Çalışmalar		
Adı	Marka	Katalog No
Ketamin-HCl (Ketalar)	Eczacıbaşı	-
Ksilazin-HCl (Rompun)	Bayer	-
3M Tegaderm Şeffaf Yara Örtüsü	3M	1626W

- **Kullanılan Solüsyonlar**

Primer Hücre Kültür Ortamı

α -MEM besin ortamı + %15 FBS + %1 L-Glutamin + %1 Gentamisin + %1 Penisilin-Streptomisin + %1 Amfoterisin B + 5 ng/ml FGF-2 ile hazırlandı.

Osteojenik Farklılaştırma Hücre Kültür Ortamı

α -MEM besin ortamı + %10 FBS + %1 L-Glutamin + %1 Gentamisin + 100nM Deksametazon + 10 mM β - gliserofosfat + 200 μ M Askorbik asit ile hazırlandı.

Taze Substrat

Naphthol (0,0008 g) + Tris-HCL (4,20 mL) + DMF (33,3 μ L) + Red violet (0,005 g) ile hazırlandı. Karışım hazırlandıktan sonra 0,22 μ filtreden geçirildi ve taze olarak kullanıldı.

Tris-HCL

Saf su (50 mL) + Tris (2,42 g) + HCL (1 mL) + Saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%2,5'luk Gümüş Nitrat Solüsyonu

AgNO₃ (2.5g) ve distile su (100 mL) ile hazırlandı.

%10'luk Keçi Serumı

10 mL için, 1 mL keçi serumu ve 9 mL PBS kullanılarak hazırlandı.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Fare Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, İzole Edilen Hücrelerin Kültürü ve Pasajlanması

Bu çalışmada kullanılan sekiz haftalık erkek Balb-C fareler, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Anestezi, ketamin/ksilazin kombinasyonu ile sağlanarak ve ardından hayvanlar servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

Sakrifiye edilen fareler, yüzey sterilizasyonu amacıyla %70 etanol içerisinde 5 dakika bekletilerek ve daha sonra laminar akışlı kabin içerisine alınarak alkolden arındırıldı. Steril şartlar altında, sırtüstü pozisyonda yerleştirilen farelerin pelvis bölgesine yakın bir noktadan deri, steril pens ve makas kullanılarak açıldı. Böbreklerin arka kısmında ve testislerin yanlarında bulunan adipoz dokular izole edildi. Bu dokular, 1X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (Phosphate-buffered saline [PBS]) içerisinde yıkandıktan sonra temiz bir petri kabına alınarak bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış adipoz dokuları, %0.075 Tip I kollajenaz ve Ca/Mg içermeyen Hank's Dengeli Tuz Solüsyonu (HBSS) içeren çözeltiye aktararak 37°C'de 60 dakika boyunca belirli aralıklarla çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant uzaklaştırılarak ve pelet üzerine 10 ml Minimum Essential Medium Eagle (α -MEM) hücre kültür ortamı, %15 fetal sıgır serumu [FBS], %1 gentamisin, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin ve %0.1 amfoterisin B, 5 ng/ml FGF-2 eklendi. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Son aşamada, elde edilen hücreler, hücre kültür ortamı ile 25 cm² yüzey alanına sahip kültür kabına aktararak 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi. Hücreler

%80 doluluk seviyesine ulaştığında, mevcut besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak hücreler dikkatlice 1X PBS ile yıkandı. PBS solüsyonu ortamdan tamamen çekildikten sonra hücrelerin yüzeyi 1 mL StemPro Accutase solüsyonu ile kaplanarak, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 dakika süreyle inkübe edildi. Hücrelerin kültür yüzeyinden tamamen ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendiğinde, hücre süspansiyonuna 4 mL taze hücre kültür ortamı eklenerek elde edilen süspansiyon 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktararak 1000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücreler 1:2 oranında olacak şekilde yeni kültür kaplarına pasajlanarak 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alınarak inkübasyona devam edildi.

2.2.2. Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

2.2.2.1. Oil Red O Boyama

Oil Red O, trigliseritleri ve lipid damlacıklarını seçici olarak boyayan lipofilik bir boyadır. Fare ADKH'lerin adiposit yönünde farklılaştığı durumda, hücre sitoplazmasında lipid birikimi olur. Oil Red O bu lipid damlacıklarını kırmızımsı renkte boyar ve mikroskopik olarak görünür hale getirir. İzole edilen ADKH'lerin adipoz hücreler ile kontamine olup olmadığını belirlemek için bu yöntem kullanılmıştır.

ADKH'ler elde edildikten sonra 6 gözlü hücre kültür kabına ekilerek 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilerek %80 doluluğa ulaşması sağlandı. Ardından hücrelerin kullandıkları besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerin yüzeyi 2 kez 1X PBS ile yıkandı ve %10 formalin eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında fiksasyon edildi. Fiksasyon sonrasında formalin uzaklaştırılarak distile su ile 2 kez yıkama yapıldı. Distile su çekilerek %60 isopropanol ile 5 dakika inkübe edildi. Isopropanol uzaklaştırılarak hücrelerin yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde Oil Red O boya eklenerek plate çalkalayıcıda 10-20 dakika inkübe edildi. Hücrelerin boyanmasının ardından 2 kez distile su ile yıkama yapılarak hücreler mikroskop altında gözlemlendi.

2.2.2.2. Akış Sitometrisi ile Adipoz Doku Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Akış sitometri analizleri için 25 cm²'lik flasklarda bulunan farklılaşmamış 3. ve 5. pasajda bulunan ADKH'ler 1 ml StemPro™ Accutase™ ile 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 4 dakika inkübe edilerek yüzeyden kaldırıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminin ardından %10'luk keçi serumu ilave edilerek 60 dakika inkübasyon

yapıldı. Ardından hücrelerin üzerine 1:25 oranında %10'luk keçi serumunda seyreltilmiş CD44, CD90, CD34 ve CD45 primer antikörleri sırası ile ayrı ayrı tüplere ilave edilerek +4°C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Inkübasyon sonrasında hücreler 1 defa PBS ile yıkanarak 1000 rpm'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Yıkama sonrası süpernatantlar dökülerek akış sitometrisinde analiz edilmek üzere hücrelerin üzerine 150 µl PBS ilave edildi ve 5 ml'lik FACS tüplerine aktarıldı. Hücreler FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) cihazı ile analiz edildi.

2.2.2.3. İmmünofloresan Boyama ile Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İzole edilen ADKH'lerin karakterizasyonu immünofloresan (IF) boyamalar için 2 farklı 6 gözlü hücre kültür kaplarına 3. ve 5. pasaj olacak şekilde ekilen ADKH hücrelerinin 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilerek yüzeye tutunmaları sağlandı. Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besin ortamı uzaklaştırılarak gözler 1 ml PBS ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkandı. Fiksasyon için %4'lük taze paraformaldehit eklendi ve 60 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda %4'lük paraformaldehit ortamdan uzaklaştırılarak gözler 1 ml PBS ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkandı. Ardından her bir göze 1 ml %10'luk keçi serumu bloklama amacıyla eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Inkübasyon sonunda %10'luk keçi serumu ortamdan uzaklaştırılarak 1. göz herhangi bir primer antikörün eklenmediği kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Diğer gözler MKH'lere spesifik 1:200 oranında CD44, CD90 ve hematopoetik hücrelere spesifik 1:200 oranında CD34, CD45 primer antikörleri ile nemli kutu içerisinde karanlık ortamda +4°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün primer antikörler ortamdan uzaklaştırılarak 1 ml PBS ile 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı ve ardından gözlere 1 ml 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ilave edilerek karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda DAPI ortamdan uzaklaştırılarak gözlerde 1 ml PBS ile 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı. Yıkama işlemi sonunda hücrelerin bulunduğu gözlerin ters faz kontrast floresan mikroskop (Axio, Zeiss) ile analizi yapıldı.

2.2.3. Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

Adipoz dokudan izole edilen MKH'lerin osteoblastik farklılaşmasını sağlamak amacıyla, α -MEM besin ortamı, %15 FBS, %1 L-Glutamin, %1 Gentamisin, %1 Penisilin-Streptomisin, %0,1 Amfoterisin B, 50 µg/ml askorbik asit, 10⁻⁸ M deksametazon ve 10 mM β -gliserofosfat içeren osteoblastik farklılaşma ortamı

hazırlanmıştır. 7., 14. ve 21. günler için ayrı ayrı 24 gözlü hücre kültür kaplarına pasajlanan ADKH'ler, IF ve histokimyasal yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir.

2.2.3.1. İmmunofloresan Yöntem

Osteoblasta farklılaştırılan ADKH'ler, osteonektin ve osteokalsin antikorları kullanılarak 7., 14. ve 21. günlerde IF analizi ile değerlendirildi. Bunun için ilk 3 gözünde ADKH hücrelerinin bulunduğu 3 farklı 24 gözlü kültür kabının birincisi 7. günde, ikincisi 14. günde ve üçüncüsü 21. günde aşağıda belirtilen protokole göre analiz edildi. Bunun için, ilk 3 gözde bulunan hücrelerin üzerindeki kullanılmış ortam uzaklaştırılarak PBS ile bir kez yıkandı. Fiksasyon için %4'lük taze paraformaldehit eklenerek 60 dakika inkübe edildi. %4'lük paraformaldehit çekilerek 1 ml PBS ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkama yapıldı. Ardından her bir göze 1 ml olacak şekilde %0,1 Triton X-100 eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası gözler gözler 1 ml PBS ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkandı. Ardından her bir göze 1 ml %10'luk keçi serumu bloklama amacıyla eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda %10'luk keçi serumu ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerin bulunduğu gözlere osteokalsin ve osteonektin primer antikorları eklenerek nemli kutu içerisinde +4°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün primer antikorlar ortamdan uzaklaştırılarak gözler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Ardından, 1:500 oranında hazırlanan Elabscience Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(FITC conjugated) (E-AB-1014) sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. Bu süre sonunda 1 ml PBS ile 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı. Ardından, gözlere DAPI ilave edilerek karanlık ortamda 10 dakika inkübe edilerek inkübasyon işlemi sonunda gözler 1 ml PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Tüm işlemler sonunda 7., 14. ve 21. günlere ait osteoblasta farklılaştırılan ADKH'lerin floresan mikroskop ile analizleri yapıldı.

2.2.3.2. Histokimyasal Yöntemler

2.2.3.2.1. Alkalen Fosfataz /Von Kossa (ALP/ VK) Boyaması

24 gözlü hücre kültür kaplarında ayrı ayrı gruplandırılarak 7, 14 ve 21 gün olacak şekilde farklılaştırma ortamı ile kültüre edilen hücreler bu sürelerin sonunda Ca^{+2} iyon birikiminin gözlenmesi amacıyla ALP/ VK boyaması yapıldı.

Kullanılmış kültür ortamı çekilerek PBS ile hücre yüzeyi yıkandı. Ardından %1'luk soğuk nötral formalinde 15 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrasında formalin

uzaklaştırılarak bir kez distile su ile yıkanarak ardında dakika distile suda bekletildi. Distile su uzaklaştırılarak taze olarak hazırlanan ve filtrelenen substrat (Naphthol AS MX-PO₄, N,N-Dimethylformamide (DMF), Tris-HCl pH 8.3, Red Violet LB salt, distile su) ile oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde substrat uzaklaştırıldı ve 4 kez distile su ile yıkandı. Hazırlanan %2,5'lik gümüş nitrat çözeltisi ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 3 kez distile su ile yıkanarak gümüş nitrat ortamdan uzaklaştırıldı. Boyanan hücreler ters faz kontrast floresan mikroskop ile gözlemlendi. Tutunan hücrelerde ALP enzim aktivitesinin olduğu alanların kırmızı, mineralize nodüllü alanların kahverengi veya siyah boyandığı gözlemlendi.

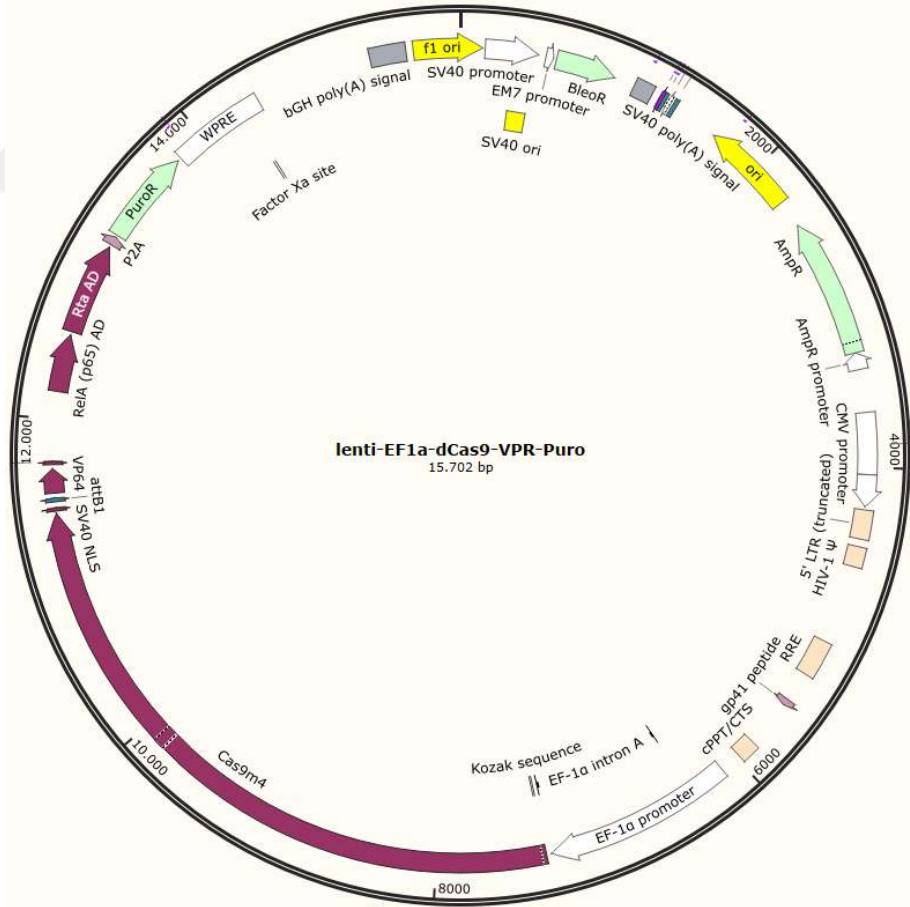
2.2.3.2.2. Alizarin Kırmızısı (AK) Boyaması

24 gözlü hücre kültür kaplarında ayrı ayrı gruplandırılarak 7, 14 ve 21 gün olacak şekilde farklılaştırma ortamı ile kültüre edilen hücre yüzeyleri PBS ile yıkanarak %70'lik soğuk etanol ile oda sıcaklığında 1 saat fikse edildi. Fiksasyondan sonra etanol uzaklaştırılarak distile su ile iki kez yıkandı. Hazır olarak bulunan AK boya ile 30 dakika inkübe edildi. Boyama sonrasında 4 kez distile su ile yıkanarak aydınlık alanda ters faz kontrast mikroskop ile gözlemlendi.

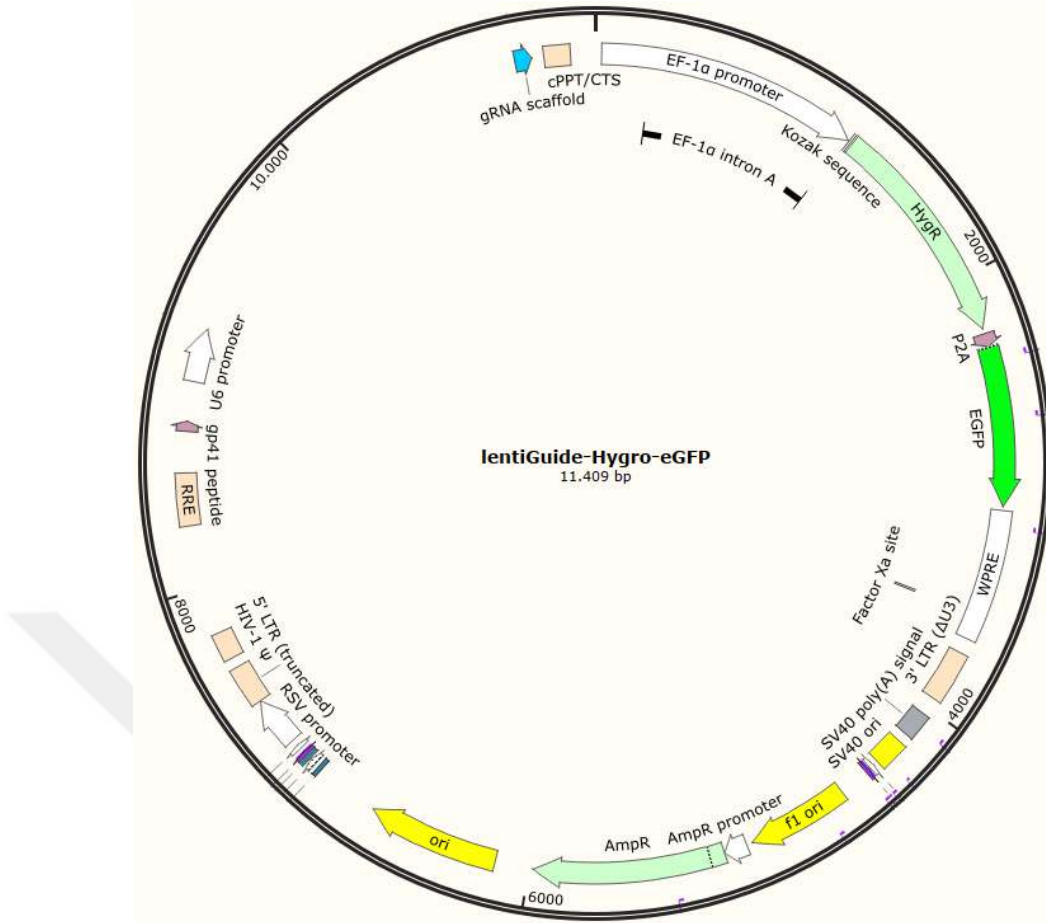
2.2.4. Çalışma için Uygun CRISPRa/dCas9 Plazmid Seçimi

Çalışma için ADKH'lerde stabil bir şekilde lentivirüs aracılığıyla dCas9 ekspresyonunu sağlaması ve hedeflenen genlerin ekspresyonunu artırması amacıyla lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro (Plazmid #99373, Addgene) plazmidi (Şekil 13) seçilmiştir. Lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro plazmidinin iskelet yapısında; lentiviral genomda hedef genlerin entegrasyonunu sağlayan uzun terminal tekrar (long terminal repeat, LTR) dizileri, ökaryotik translasyon uzama faktörü alfa (elongation factor alpha, EGF α) promotörü aracılığıyla ekspresyonu gerçekleştirilen dCas9 enzimi, bu enzimin 3' ucuna bağlı üç farklı transkripsiyon aktivatörü (VP64, p65 ve Rta'dan oluşan VPR kompleksi) ile birlikte; enfekte hücrelerin seçimini mümkün kılan puromisin antibiyotik direnç gen kaseti yer almaktadır. Ayrıca, LentiGuide-Hygro-eGFP (Plazmid #99375, Addgene) plazmidi (Şekil 14) dCas9 enziminin, küçük rehber RNA'lar (small guide RNA/sgRNA) aracılığıyla ICAM1 ve E-kaderin genlerine yönelik ekspresyonu artıracak şekilde hedef bölgelere yönlendirilmesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Bu plazmidin iskeletinin yapısında yine lentiviral genomu arzu edilen genlerin entegrasyonunu sağlayan LTR sekansının yanı sıra U6 promotörünün ekspresyonunu sağladığı gRNA iskele yapısının oluşmasını sağlayan

bir gen kaseti bulunmaktadır. Ayrıca, bu plazmidin iskeletinde hygromisin direnç geni ve yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein/GFP) geni bulunmaktadır. Böylece, lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro ve lentiGuide-Hygro-eGFP transfer plazmidleri ile üretilen lentivirüsler aracılığıyla transfekte olan hücreler ortama ökaryotik puromisin ve hygromisin antibiyotiği verilmesi halinde bu antibiyotiğe karşı direnç göstererek sağ kalırken, bu iki direnç geni ile transfekte olmayan hücrelerin çoğunluğu puromisin ve hygromisin etkisine bağlı olarak öleceklerdir. Böylece, lentiviral gen transferine bağlı olarak ortamda çoğunlukla gen aktarımı yapılmış ADKH'ler bulunacaktır. Ayrıca, lentiviral gen transferine bağlı olarak ADKH'lere aktarılan GFP ile hücrelerdeki enfeksiyon verimliliği (Multiplicity of infection/MOI) yani lentiviral gen transfer oranı basit bir şekilde belirlenebilecektir. Ayrıca, çalışmada yukarıda bahsedilen transfer plazmidlerinin lentivirüs genomuna entegrasyonu ve bu şekilde lentivirüs üretimi için gerekli olan zarf plazmid pMD2.G (Addgene #12259) ve paketlenme plazmid pCMVR8.74 (Addgene #22036) kullanılmıştır.



Şekil 13. lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro plazmid iskelet yapısı ve bulundurduğu gen kasetleri.



Şekil 14. lentiGuide-Hygro-eGFP plazmid iskelet yapısı ve bulundurduğu gen kasetleri.

2.2.4.1. lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro ve lentiGuide-Hygro-eGFP Plazmidlerinin Çoğaltımı ve Küçük Ölçek Plazmid İzolasyonu

Luria Bertani (LB) agar stabında Addgene firmasından ticari olarak satın alınan kompetent *E. coli* bakterilerinde bulunan lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro ve lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidlerini elde etmenin ilk adımında, ilgili kompetent bakteriler, çizgi plaka yöntemi kullanılarak 100 µg/ml ampisilin içeren seçici bir LB agar plakasında tek bakteri kolonisi haline getirildi. Sonraki adımda, lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro plazmidini içeren tek bakteri kolonisine dokundurulan steril bir pipet ucu, 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml sıvı LB besiyeri içeren iki ayrı 15 ml'lik santrifüj tüpünden birine yerleştirildi. Benzer şekilde, lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidini barındıran tek bakteri kolonisine dokundurulan steril pipet ucu ise ikinci 15 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirildi. Tüpler, 37°C ve 250 rpm'de 12-16 saat boyunca çalkalayıcı bir inkübatörde inkübe edildi. Bu inkübasyon süresinden sonra, iki ayrı tüpte çoğaltılan bakterilerden ilgili plazmidlerin izolasyonu, ticari Plasmid Miniprep

İzolasyon Kiti'nde (GenemarkBio, Tayvan) belirtilen prosedürlere göre gerçekleştirildi. Çıkarılan plazmidlerin miktarı ve saflığı, Nanodrop cihazı (Maestrogen, Tayvan) kullanılarak değerlendirildi. Tüm bu prosedürler, daha sonraki aşamalarda ICAM1 ve E-kaderin genlerinin promotor bölgesini hedefleyen sgRNA duplekslerinin lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidine klonlanması sonrası tekrar gerçekleştirildi.

2.2.4.2. ICAM1 ve E-Kaderin Hedef Genlerinin Promotor Bölgelerine Özgü gRNA'ların Dizaynı ve Dizayn Edilen sgRNA'ların lentiGuide-Hygro-eGFP Plazmidine Klonlanması

Bu çalışmanın odak noktası, fare (*Mus musculus*) ADKH'lerindeki ICAM1 ve E-Kaderin genlerinin promotor bölgesi, özellikle transkripsiyon başlangıç bölgesinin (+1) yukarısında bulunan bölgedir. Bunun için lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidinin U6 promotor bölgesinin 3' ucuna klonlanmak üzere tasarlanan sgRNA'lar hem ICAM1 hem de E-Kaderin promotor bölgelerini hedef alacaktır. Canlı genomundaki hedeflenen DNA dizisini düzenlemek için gerekli olan sgRNA'lar, "ChopChop" ve "CRISPR-ERA" çevrimiçi programlarıyla eş zamanlı olarak birden fazla varyasyonda tasarlanmıştır. Tek bir sgRNA yerine fazla sayıda sgRNA oluşturma'nın ardındaki mantık, her bir gRNA'nın CRISPR/dCas9 sistemini belirli hedef DNA dizisine yönlendirmedeki değişken verimliliğini hesaba katmaktır. Sonuç olarak, toplam beş farklı sgRNA tasarlanmıştır: üçü E-kaderin gen promotorunu ve ikisi ise ICAM1 gen promotorunu hedef almaktadır. Şekil 15 ve Şekil 16'da gösterildiği ve Tablo 2'de ayrıntılı olarak belirtildiği gibi her sgRNA, ilgili ICAM1 ve E-Kaderin genleri için genomik DNA'nın kalıp olmayan ipliğine bağlanır.



Şekil 15. Dizayn edilen sgRNA'ların hedef E-Kaderin promotor bölgesindeki bağlanma yerleri.



Şekil 16. Dizayn edilen sgRNA'ların hedef ICAM1 promotor bölgesindeki bağlanma yerleri.

Tablo 2. sgRNA'ların nükleotid dizilimleri ve E-kaderin ve ICAM1 promotor bölgesi üzerindeki bağlanma noktaları.* TSS: Transcription Start Site

sgRNA Adı	sgRNA Nükleotid Dizisi (5'→3')	Bağlanma Noktası (TSS'ye göre*)
ecadsgRNA1	5' GGCTAGGATTTCGAACGACCG 3'	-310
ecadsgRNA2	5' GTGCGTCCCCAGCCAATCAG 3'	-184
ecadsgRNA3	5' GTGCCTGCGGGCTCACCTGG 3'	-150
icamlsgRNA1	5' GCGCGAGGTTTCCCGGAAAG 3'	-146
icamlsgRNA2	5' GTTCCGGAGGGGAAGGCGCG 3'	-161
sgNT	5' ACGGAGGCTAAGCGTTGCAA 3'	—

Ayrıca, pozitif kontrol olarak kullanılması amacıyla fare (*Mus musculus*) genomunda herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen small guide hedefsiz sgRNA (sgNT) dizisi olan 5' ACGGAGGCTAAGCGTTGCAA 3' nükleotid dizisi lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidine klonlanması amacıyla sentezletirildi.

sgRNA'ların lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidine klonlanabilmesi için sgRNA'ların karşı iplikleride sentezletirilerek oligo duplekslerinin oluşturulması sağlandı (Tablo 3). Ayrıca, sgRNA'ların ileri ve geri dizilerinin 5' uçlarına plazmidlerde enzim kesimi sonucu açığa çıkacak olan yapışkan uçlara Golden Gate ligasyon işlemi ile bağlanabilmesi için ileri dizinin (Forward) 5' ucuna “5'-CACC-3'” nükleotid dizisi eklenirken, geri (reverse) dizinin 5' ucuna “5'-AAAC-3'” nükleotid dizisi ilave edildi.

Tablo 3. Hedef Gen ve sgRNA ileri ve geri nükleotid dizileri.

Hedef Gen	sgRNA Adı	sgRNA Nükleotid Dizisi
E-Kaderin	ecadsgRNAF1	5' caccGGCTAGGATTCTGAACGACCG 3'
	ecadsgRNAR1	5' aaacCGGTCGTTCGAATCCTAGCC 3'
E- Kaderin	ecadsgRNAF2	5' caccGTGCGTCCCCAGCCAATCAG 3'
	ecadsgRNAR2	5' aaacCTGATTGGCTGGGGACGCAC 3'
E- Kaderin	ecadsgRNAF3	5' caccGTGCCTGCGGGCTCACCTGG 3'
	ecadsgRNAR3	5' aaacCCAGGTGAGCCCGCAGGCAC 3'
ICAM1	icam1sgRNAF1	5' caccGCGCGAGGTTTCCCGGAAAG 3'
	icam1sgRNAR1	5' aaacCTTTCCGGGAAACCTCGCGC 3'
ICAM1	icam1sgRNAF2	5' caccGTTCCGGAGGGGAAGGCGCG 3'
	icam1sgRNAR2	5' aaacCGCGCCTTCCCCTCCGGAAC 3'
sgNT	sgNTF1	5' caccACGGAGGCTAAGCGTTGCAA 3'
	sgNTR1	5' aaacTTGCAACGCTTAGCCTCCGT 3'

İleri ve geri sgRNA oligolarının lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidine klonlanabilmesi için komplementer sgRNA oligoları dupleks hale getirildi ve uç bölgeleri fosforile edildi. Bunun için ilk başta, sgRNA oligoları duplekslerinin 5' uçları T4 PNK (NEB, İngiltere) enzimi ile 37°C'de 30 dakika, 95°C'de 5 dakika ve 95°C'den 25°C'ye dakikada 5°C inecek şekilde ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) fosforile edilip oligo duplexi haline getirilerek uç bölgeleri fosforile edildi. Fosforilasyon için gereken reaksiyon bileşenleri Tablo 4'de belirtilmiştir.

Tablo 4. T4 PNK için gereken reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
1 µl oligo 1 (100 µM)
1 µl oligo 2 (100 µM)
1 µl 10X T4 ligaz tamponu (NEB)
6,5 µl ddH ₂ O
0,5 µl T4 PNK (NEB)
10 µl Total

Dizayn edilen sgRNA'ların lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidine ayrı ayrı olarak plazmidin U6 promotor dizisinin 3' ucuna Golden Gate moleküler klonlama yöntemi ile klonlandı. Bu yöntemde klonlanacak olan uçları fosforillenmiş sgRNA oligo duplesi, plazmid, restriksiyon enzimi ve ligaz enzimi aynı reaksiyon içerisinde birlikte kullanıldı. Böylece, restriksiyon enzimi ile kesilen plazmidin agaroz jelden geri kazanımı, alkalen fosfataz basamağı gibi fazladan zaman ve iş yükü gerektiren basamaklar ortadan kaldırıldı. Fosforile edilmiş sgRNA oligo dupleksleri için aşağıdaki reaksiyon karışımı kullanıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Golden Gate klonlama reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri
100 ng lentiGuide-Hygro-eGFP
2 µl Fosforile sgRNA oligo duplesi (1:200)
1 µl BsmBI-HF enzimi (NEB)
2 µl T4 DNA ligaz tamponu (NEB)
1 µl T4 DNA ligaz (NEB)
X µl ddH ₂ O
20 µl total

Hazırlanan bileşenlerin restriksiyon enzim kesimi ve ligasyon için gerekli ısı şartları ısı döngü cihazında 30 döngü olacak şekilde aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (Tablo 6).

Tablo 6. Golden Gate klonlama ısı koşulları.

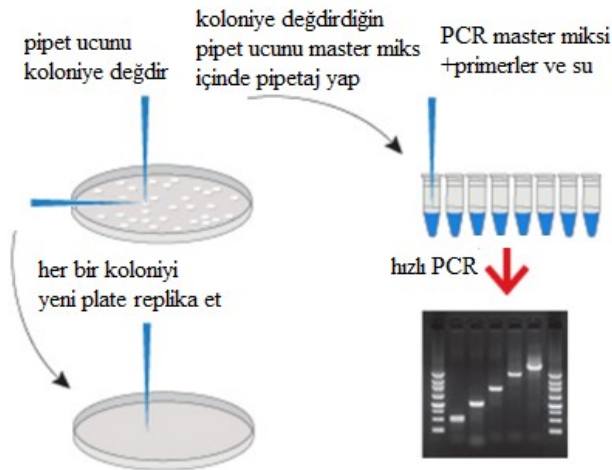
Isı Koşulları
37°C’de 5 dakika (restriksiyon enzim kesimi)
16°C’de 5 dakika (ligasyon)
60°C’de 5 dakika (reaksiyon inhibisyonu)

Klonlama işlemleri sonunda, sgRNA oligo duplekslerinin klonlandığı lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidleri ilgili sgRNA’ların hedeflediği gen ve sayısına göre yeniden adlandırılarak toplamda 5 farklı sgRNA dupleksine sahip 5 farklı plazmid elde edildi. E-kaderin sgRNA1 dupleksinin klonlandığı plazmid “EkaderinsgRNA1”, E-kaderin sgRNA2 dupleksinin klonlandığı plazmid “EkaderinsgRNA2”, E-kaderin sgRNA3 dupleksinin klonlandığı plazmid “EkaderinsgRNA3”, ICAM1 sgRNA1 dupleksinin klonlandığı plazmid “ICAM1sgRNA1”, ICAM1 sgRNA2 dupleksinin klonlandığı plazmid “ICAM1gRNA2” ve sgNT dupleksinin klonlandığı plazmid “sgNT” olarak adlandırıldı. Herhangi bir klonlama işleminin gerçekleştirilmediği lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro plazmidi ise “dCas9puro” olarak adlandırıldı.

2.2.4.3. sgRNA Plazmidlerinin Transformasyonu, EndoFree Plazmid İzolasyonu ve Sekans Analizi

sgRNA duplekslerinin klonlandığı plazmidlerin çoğaltılması ve transfeksiyon deneylerinde kullanılabilmesi için Mix & Go! E.coli Transformasyon ve Tampon Seti kitinin ilgili prosedürüne göre hazırlanmış olan plazmid aktarımına hazır OneShot Stbl3 kimyasal kompetent E. coli (Thermo Fisher Scientific, A.B.D) bakterileri kullanıldı. Bunun için, hazırlandıktan sonra -86 °C’de 1.5 ml’lik santrifüj tüplerinde saklanan hazır kompetent E.coli bakterilerinin bulunduğu 5 farklı tüp kırılmış buz parçalarının üzerine konularak bakterilerin içinde bulunduğu sıvının yavaşça erimesi sağlandı. Buz üstünde erimeleri sağlanan 6 farklı tüpdeki bakterilerin üzerine klonlama işlemlerinin gerçekleştirildiği EkaderinsgRNA1, EkaderinsgRNA2, EkaderinsgRNA3, ICAM1sgRNA1, ICAM1sgRNA2 ve sgNT plazmidlerinden maestrogen nanodrop (Maestrogen, Tayvan) cihazı ile ölçüm sonrası 100 ng/µl olacak şekilde sırası ile eklendi. Plazmidlerin bakterilerin üzerine eklenmesi sonrası tüplerin

dip kısımlarına parmak ucuyla vurularak plazmidlerin ortamda karışması sağlandı ve ardından tüpler 5 dakika buz üstünde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ilgili plazmidleri bünyelerine alan 6 farklı tüpdeki bakteriler içinde 100 µg/ml ampisilin bulunan 6 farklı seçici besi yeri LB agar plağına yayıldı ve gece boyu 37°C’de inkübe edildi. Bu şekilde plazmidlerin bünyesinde bulundurduğu ampisilin direnç geni ile plazmidlerin aktarıldığı kompetent bakterilerin seçilimi sağlanmış oldu. Ertesi gün plazmidlerdeki klonlama bölgelerine sgRNA duplekslerinin doğru sekans dizisiyle klonlandığının doğrulanması amacıyla her bir 6 farklı LB agar plaktaki bakteri kolonilerinden 3’üne ayrı ayrı steril pipet uçları değdirildi. Steril pipet uçlarının değdirildiği koloniler ise numaralandırılarak yeni bir LB agar plağına değdirilerek replika edildi ve ardından uçlarında transforme bakterilerin bulunduğu pipetlerin uçları sırası ile 18 farklı 0.2 ml’lik tüplere içinde lenginekontF1 5’-tgggcaagttgtggaattgg-3’ lenginekontR1 5’-tcaagatctagttacgccaagct-3’ primerlerinin bulunduğu Tablo 7’de miktarları belirtilen 5XHotStart TaqPolimeraz master miksi içerisine sokularak koloni Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gerçekleştirmek amacıyla pipetaj yapıldı (Tablo 7) (Şekil 17). lenginekontF1 5’-tgggcaagttgtggaattgg-3’ lenginekontR1 5’-tcaagatctagttacgccaagct-3’ primerleri lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidinin sgRNA klonlama bölgesini içine alacak şekilde 200 nükleotidlik bir PCR ürünü oluşmasını sağlar. Böylece bu primerler klonlama yapılan bölgenin sekans analizini mümkün kılar.



Şekil 17. Koloni PCR aşamalarının gösterimi.

Tablo 7. Küçük ölçek plazmid PCR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
Mikropipet ucunda bulunan bakteri plazmid DNA'sı
4 µl 5x 5XHotStart TaqPolimeraz master miksi
1 µl lengluidkontF1 PrimerForward (10 pmol/µl)
1 µl lengluidkontR1 PrimerReverse (10 pmol/µl)
25 µl ddH ₂ O
30 µl Total

PCR karışımının hazırlanmasından sonra pipet uçlarında bulunan bakterilerin master miks içerisinde yayılması sağlanmış oldu. Ardından 18 farklı 0.2 ml'lik tüp Tablo 8'de belirtilen şartlar altında ısı döngü cihazına yüklenerek koloni PCR gerçekleştirildi. PCR döngü koşulları; ısı döngü cihazının kapak sıcaklığı 105°C olacak biçimde, 40 döngü (denatürasyon, bağlanma ve uzama işlemi) olacak şekilde ısı döngü cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 8. PCR döngü koşulları

Döngü koşulları
95°C'de 5 dakika (ön denatürasyon)
95°C'de 20 saniye (denatürasyon)
60°C'de 20 saniye (bağlanma)
72°C'de 30 saniye (uzama)
72°C'de 3 dakika (son uzama)

Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 1 saat yürütülüp amplifikasyonun olduğu doğrulandıktan sonra her bir PCR reaksiyonundan 10 µl alındı ve üzerlerine 2,5 µl shrimp alkalen fosfataz ve 1 µl Ekzonükleaz I ilave edildi. Ardından örnekler ısı döngü cihazında, artan primer ve deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP)'lerin ortamdaki eliminasyonu için, 37°C'de 30 dakika ve 95°C'de 5 dakika ısı döngü cihazında (SensoQuest, Almanya) temizlik aşamasına tabi tutuldu. Temizlik aşamasından sonra her bir hedef plazmidin PCR örneği için ayrı ayrı PCR tüplerine aşağıdaki bileşenler ilave edildi (Tablo 9).

Tablo 9. Sanger sekans PCR reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon bileşenleri
2 µl PCR örneği
1 µl 10X BigDye Buffer (Applied Biosystems / A.B.D)
0,5 µl lengluidkontF1 primeri
0,5 µl BigDye (Applied Biosystems / A.B.D)
6 µl ddH ₂ O
10 µl total

Hazırlanan bileşenlerin sekans PCR reaksiyonları, kapak sıcaklığı 105°C olacak biçimde, 35 döngü (denatürasyon, bağlanma ve uzama işlemi) ısı döngü cihazında gerçekleştirildi (Tablo 10).

Tablo 10. PCR döngü koşulları.

Döngü koşulları
96°C'de 1 dakika (ön denatürasyon)
96°C'de 10 saniye (denatürasyon)
50°C'de 5 saniye (bağlanma)
60°C'de 4 dakika (uzama)
4°C'de ∞

Son olarak elde edilen sekans PCR ürünleri sanger sekans cihazında (ABI genetic analyzer 3130, A.B.D) okutularak hedef klonlama bölgesinin nükleotid dizileri elde edilerek sekans doğrulaması yapıldı. sgRNA duplekslerinin doğru sekansla klonlanmış olduğu belirlenen plazmidlerin aktarıldığı 6 farklı agar plaktaki replika bakteri kolonilerinden her bir sgRNA için tek bir koloni steril mikropipet ucu ile alındı. Bu mikropipet uçları 6 farklı steril cam şişe içerisinde bulunan 100 µg/ml ampisiline sahip 500 ml LB sıvı besiyerine aktarıldı ve gece boyu çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, elde edilen bakteriyel kültürlerden plazmid izolasyonu Maxiprep EndoFree Plasmid Kit kullanılarak, üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidlerin konsantrasyon ve saflık analizleri NanoDrop spektrofotometresi ile ölçüldü. Ayrıca, dCas9puro plazmidini taşıyan stok E. coli bakterileri, 100 µg/ml ampisilin içeren katı LB agar plakasına çizgi

plaka yöntemiyle ekildikten 24 saat sonra oluşan tek bir koloni, steril bir mikropipet ucu ile alınarak, yine 100 µg/ml ampisilin içeren 500 mL sıvı LB besiyeri bulunan steril bir cam şişeye aktarıldı. Bu kültür, gece boyunca 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek büyütüldü. İnkübasyonun ardından, elde edilen bakteriyel kültürden plazmid izolasyonu Maxiprep EndoFree Plasmid Kit kullanılarak, üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidlerin konsantrasyon ve saflık analizleri NanoDrop spektrofotometresi ile ölçüldü.

2.2.4.4. Fare Meme Kanseri Hücre Hattında (67NR) E-kaderin ve ICAM1 Gen Promotorlarını Hedefleyen sgRNA Plazmidlerinin dCas9-Puro ile Transfeksiyonu ve Real-Time qPCR (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyon Analizi

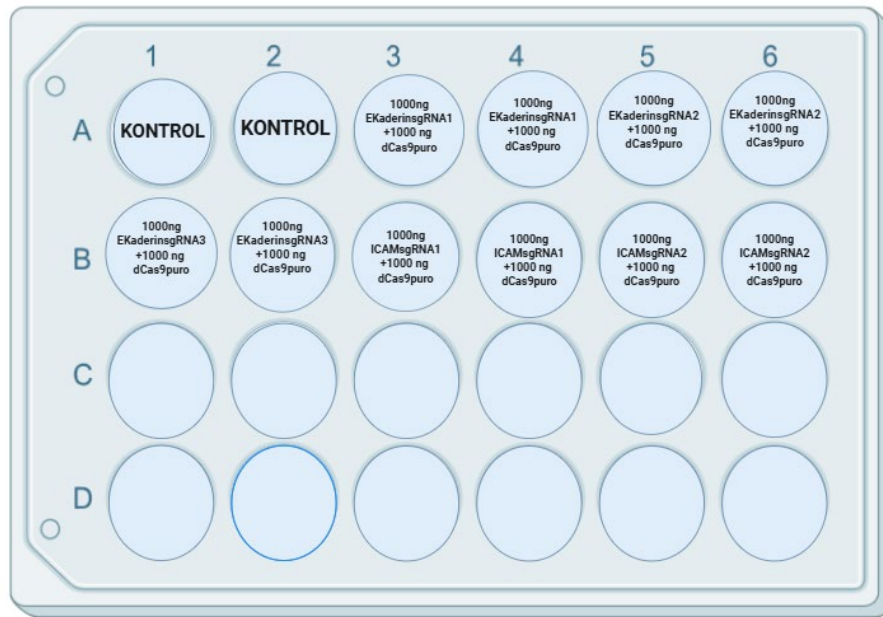
sgRNA’lar dizilimleri ve bağlanma bölgelerine göre Cas9 enzimini farklı verimlilikle hedef gen bölgesine yönlendirirler. Bu amaçla, bu çalışmada, E-kaderin ve ICAM1 genlerinin promotor bölgelerinin farklı noktalarına bağlanacak şekilde sgRNA’lar dizayn edildi ve bu sgRNA’lar yukarıda da bahsedildiği gibi lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidine klonlanıp sekans analiziyle kontrol edildi. Elde edilen EkaderinsgRNA1, EkaderinsgRNA2, EkaderinsgRNA3, ICAM1sgRNA1 ve ICAM1sgRNA2 plazmidlerinin hedef E-kaderin ve ICAM1 genlerinin mRNA ekspresyonlarını ne derecede artırdığının analizi için bu plazmidler dCas9puro plazmidi ile birlikte bir primer fare meme kanseri hücre hattı olan 67NR hücrelerine transfeke edildi. Dizayn edilen sgRNA’lar fare genomuna özgü olduklarından ve plazmidler ile transfeksiyonları daha kolay olduklarından çalışılacak hücre hattı 67NR olarak seçildi.

Bu amaçla, %10 fetal sığır serumu %1 Penisilin/streptomisin ve %1 L- Glutamin içeren RPMI-1640 hücre kültür ortamında çoğaltılan 67NR hücreleri, en az 3 pasajlama ve tripsinizasyon işlemi sonrası, Merck Muse® Count & Viability Assay kitiyle MUSE hücre analiz cihazında sayıldı. Sayım işlemi ardından hücre kültür ortamında bulunan 67NR hücreleri 1 adet 24 kuyucuklu kültür kabının 12 gözünün her birine 50.000 ml/hücre olacak şekilde aktarıldı ve 37 °C, %5 CO₂ koşullarında her bir göz %70-80 doluluk seviyesine gelene kadar 14-18 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ilk iki göz negatif kontrol hücreleri için ayrıldı, sonraki gözler sırasıyla duplike olacak biçimde EkaderinsgRNA1 + dCas9puro, EkaderinsgRNA2 + dCas9puro, EkaderinsgRNA3 + dCas9puro, ICAM1sgRNA1 + dCas9puro ve ICAM1sgRNA2 + dCas9puro plazmid setlerinin transfeksiyonu için ayrıldı. İlgili

plazmidlerin 67NR hücrelerine transfeksiyonu Tablo 11’de belirtilen değerlere göre 1:3 (weight(plazmid/ng)/volume(FuGENEHD/μl) oranlarında FuGENE HD transfeksiyon ajanı kullanılarak gerçekleştirildi. Transfeksiyon öncesi gözlerdeki eski hücre kültür ortamları çekilerek yerlerine 1 ml antibiyotiksiz hücre kültür ortamı ilave edildi. Her plazmid seti için (sgRNA plazmidi+dCas9puro plazmidi) 0.2 ml’lik PCR tüplerine X2 reaksiyon için olacak şekilde 100 μl Opti-MEM ilave edildi. Her bir tüpde bulunan Opti-MEM’lerin üzerine Tablo 10’de belirtilen miktarlarda X2 reaksiyon için olacak şekilde plazmidler ve 6 μl FuGENEHD eklendi ve hazırlanan karışımlar oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Hazırlanan her karışım duplike olacak şekilde Tablo 11’de belirtildiği üzere kültür kabının ilgili gözlerine damla damla mikropipet yardımıyla eklendi (Şekil 18).

Tablo 11. Duplike oran için hazırlanan transfeksiyon karışım maddeleri ve miktarları.

24 gözlü hücre kültür kabı sıralaması	Transfeksiyon Karışımı / Uygulama
A1 – A2	Antibiyotiksiz kültür ortamı (kontrol)
A3 – A4	1000 ng EkaderinsgRNA1 + 1000 ng dCas9puro
A5 – A6	1000 ng EkaderinsgRNA2 + 1000 ng dCas9puro
B1 – B2	1000 ng EkaderinsgRNA3 + 1000 ng dCas9puro
B3 – B4	1000 ng ICAM1sgRNA1 + 1000 ng dCas9puro
B5 – B6	1000 ng ICAM1sgRNA2 + 1000 ng dCas9puro



Şekil 18. 24 gözlü hücre kültür kabında hazırlanan transfeksiyon karışım maddeleri ve miktarları.

Transfeksiyon sonrası hücreler 37 °C’de ve %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildi. 24 saat inkübasyon sonrası A1 gözü hariç diğer gözlerden eski kültür ortamı uzaklaştırıldı ve gözlere 0,5 µg/ml puromisin içeren 1 ml antibiyotikli RPMI-1640 hücre kültür ortamı ilave edilerek hücrelerin 37 °C’de ve %5 CO₂ koşullarında 72 saat daha inkübasyonu sağlandı. 72 saatlik inkübasyon süresi, hücrelerin bulunduğu kültür ortamı ölü hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla 24 saatte bir eski kültür ortamının uzaklaştırılması ve yeni puromisinli hücre kültür ortamının ilavesi şeklinde gerçekleştirildi.

72 saatlik süre sonunda A1 gözünde bulunan kontrol hücreleri ve plazmid transfeksiyonu ile puromisin seleksiyonu gerçekleştirilen hücrelerden E-kaderin ve ICAM1 mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla RNA izolasyonu Quick-RNA Miniprep kitiyle üretici firmanın ilgili prosedürüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları NanoDrop spektrofotometresi ile ölçüldü. Daha sonra, total RNA’lardan cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanılarak üretici firmanın ilgili prosedürüne göre gerçekleştirildi. Her iki gen bölgesine özgü primer dizileri Tablo 12’de verilmiştir. Reaksiyon koşullarının doğruluğunu sağlamak ve primer-dimer oluşumunu önlemek amacıyla reaksiyon parametrelerinin özgüllük ve verimlilik açısından optimizasyonu yapıldı. Bu kapsamda primer konsantrasyonları 1 picomol olarak belirlenmiş, primer bağlanma sıcaklıkları 60 °C olarak optimize edilmiştir. Normalizasyon için ise HPRT1 house keeping genine özgü primerler kullanıldı (Tablo 12). Örneklere ait elde edilen cDNA’lar E-kaderin ve ICAM1 mRNA ekspresyon analizi SYBR Green floresan boyası kullanılarak tek renkli qPCR platformunda, başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 5 dakika, 40 döngüden oluşan denatürasyon: 95 °C, 15 saniye (sn), primer bağlanma ve uzama: 60 °C olacak şekilde RT-qPCR cihazında 2X SYBR Green Master Mix kiti ile gerçekleştirildi. RT-qPCR cihazından elde edilen Ct verileri 2^{-ΔΔCt} metoduna göre analiz edildi (Livak ve Schmittgen, 2001).

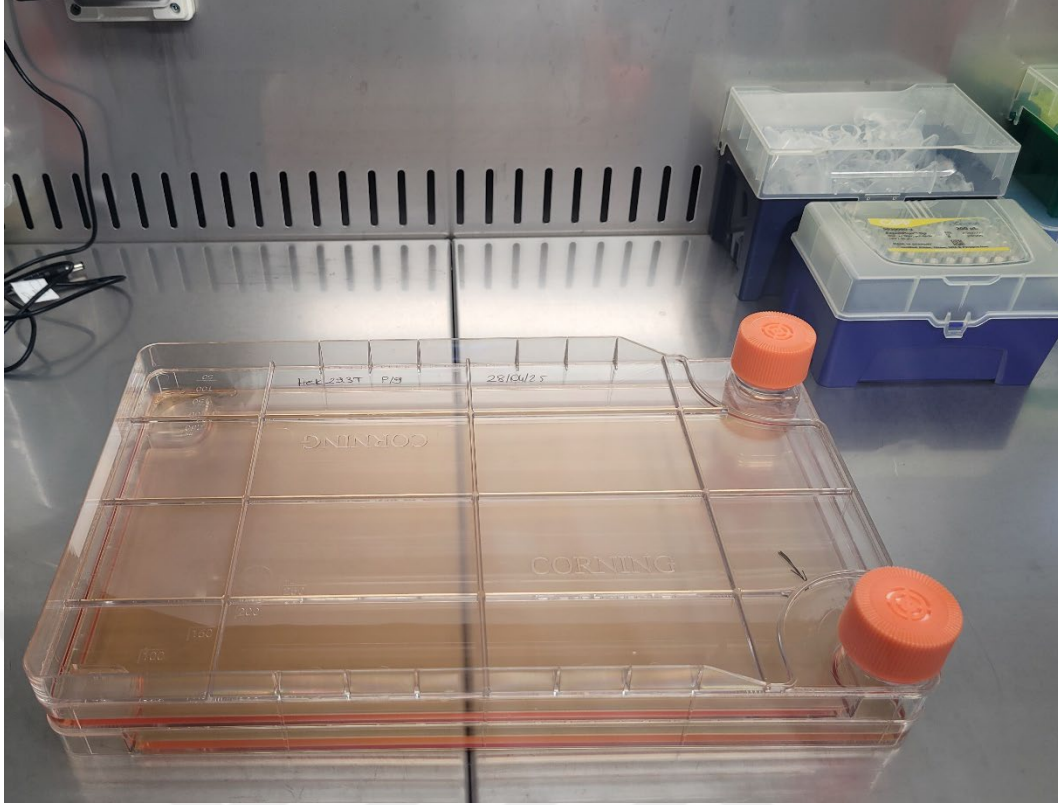
Tablo 12. E-kaderin ve ICAM1 mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla kullanılan primerlerin nükleotid dizileri.

Gen	Primer Adı	Nükleotid Dizisi
E-kaderin	ecadF1	5' ACGTCGTAATCACCACACTGA'3
	ecadR1	5' TGCCATCGTTGTTCACTGGA'3
ICAM1	icam1F1	5' CCATCCATCCCAGAGAAGCC'3
	icam1R1	5' CACTGAGTCTCCAAGCCCAG'3
HPRT1	hpertF1	5' CGTCTTGCTCGAGATGTGAT'3
	hpertR1	5' TTCAGTGCTTTGATGTAATCCAG'3

2.2.4.5. Lentiviral Transfeksiyon İçin İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı (HEK293T) Hücrelerinin Hazırlanması ve İlgili Plazmidlerin Transfeksiyonu

10. pasajda bulunan HEK293T hücreleri (CRL-3216, ATCC), antibiyotiksiz hücre kültür ortamında (%10 FBS ve %1 L-glutamin içeren DMEM High Glucose) 75 cm² kültür kaplarında, 37 °C, %5 CO₂ koşullarında 48 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler yaklaşık %80–90 doluluk seviyesine ulaştığında, kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 4 ml 1X PBS ile yıkandı. Ardından, 2 ml %0.25 tripsin-EDTA eklendi ve hücreler 37 °C inkübatörde 3 dakika inkübe edilerek yüzeyden ayrılması sağlandı. Tripsinizasyonu takiben, 4 ml antibiyotiksiz hücre kültür ortamı eklenerek tripsin etkisi nötralize edildi. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve 5 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 2 ml taze ortam ilave edilerek hücreler süspanse edildi. Bu hücreler, 15 ml taze kültür ortamı içeren yeni 75 cm² kültür kaplarına 1 ml oranında ekildi. Bu pasajlama işlemi, transfeksiyon öncesi iki kez tekrarlandı.

Pasajlama sonrası elde edilen hücreler, Merck Muse Count & Viability Assay Kiti kullanılarak MUSE hücre analiz cihazında sayıldı. Yaklaşık 4×10^7 hücre , 200 ml antibiyotiksiz hücre kültür ortamı içeren, 1272 cm² yüzey alanına sahip iki katlı Corning® CellSTACK® hücre kültür kabına aktarıldı. Hücreler, 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında 32 saat inkübe edildi (Şekil 19).

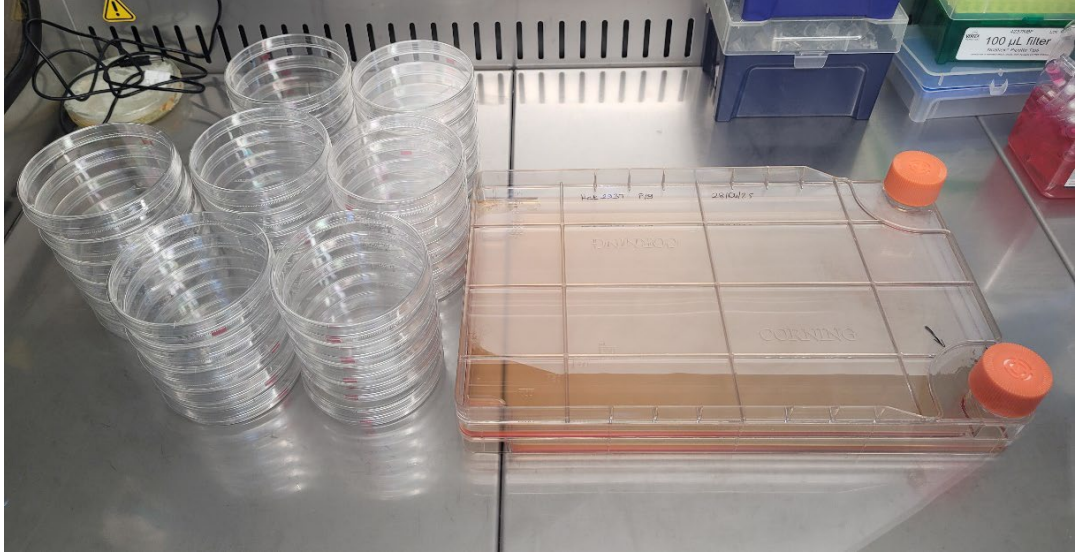


Şekil 19. HEK293T hücrelerinin 1272 cm² yüzey alanına sahip hücre kültür kabına pasajlanması.

İnkübasyon sonunda, ortam uzaklaştırıldı, hücreler 100 ml PBS ile yıkandı ve ardından 25 ml %0.25 tripsin-EDTA eklendi. 5 dakika inkübasyon sonrası hücreler yüzeyden ayrıldı. Tripsin etkisini durdurmak amacıyla 100 ml taze hücre kültür ortamı ilave edildi. Hücre süspansiyonu iki adet 50 ml'lik tüpe alındı ve 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelet, 20 ml taze ortam ile homojenize edildi. Yeniden MUSE hücre analiz cihazı ile sayım yapıldı.

Sayımı yapılan hücrelerden her biri yaklaşık 3.8×10^6 hücre içerecek şekilde, 8 ml hücre kültür ortamı içeren 24 adet 10 cm'lik hücre kültür kabına ekildi. Hücreler, 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında 16 saat inkübe edildi (Şekil 20).

Transfeksiyon öncesinde eski hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı ve yerine 8 ml taze antibiyotiksiz hücre kültür ortamı eklendi.



Şekil 20. HEK293T hücrelerinin 10 cm’lik hücre kültür kaplarına ekilmesi.

RT-qPCR analiz sonuçlarına göre fare 67NR hücrelerinde E-kaderin ve ICAM1 genlerinin aşırı ifadelerindeki artışı en etkili olarak EkaderinsgRNA1 ve ICAM1sgRNA1 plazmidleri sağlamışlardır. Dolayısıyla lentivirüs üretiminde E-kaderin ve ICAM1 genlerinin promotor bölgelerini hedeflemek amacıyla bu plazmidler kullanıldı. Lentiviral üretim için dört farklı transfer plazmidi (EkaderinsgRNA1, ICAM1sgRNA1, sgNT ve dCas9puro), zarf plazmidi pMD2.G (Addgene #12259) ve paketleme plazmidi pCMVR8.74 (Addgene #22036) kullanılarak transfeksiyon karışımları hazırlandı. Her plazmid seti için (transfer plazmidi+zarf plazmidi+paket plazmidi) 5.6 ml Opti-MEM üzerine ilgili plazmidler Tablo 13’de belirtilen miktarlarda eklendi (Tablo 13). Karışımın üzerine 480 µl polietilenimin eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Her karışımdan 1 ml, ilgili 10 cm’lik hücre kültür kabına damla damla mikropipet yardımıyla eklendi.

Tablo 13. Lentivirüs üretimi için gerekli olan HEK293T hücre ekimi yapılmış toplamda 24 hücre kültür kabı için dört farklı plazmid setinin kullanımını ve her bir sette yer alan plazmidlerin miktarları. Her bir grup 6 kültür kabından oluşmaktadır.

Hücre Kültür Kabı Grubu (n = 6)	Transgen Plazmid	Paketleme ve Zarf Plazmid
E-kaderin sgRNA1	74.1 µg Ekaderin-sgRNA1	61.2 µg pCMVR8.74 + 16.62 µg pMD2.G
ICAM1 sgRNA1	74.1 µg ICAM1-sgRNA1	61.2 µg pCMVR8.74 + 16.62 µg pMD2.G
sgNT (negatif kontrol)	78 µg sgNT	61.2 µg pCMVR8.74 + 16.62 µg pMD2.G
dCas9-VPR-Puro	102 µg lenti-EF1α-dCas9-VPR-Puro	61.2 µg pCMVR8.74 + 16.62 µg pMD2.G

İlgili plazmitlerin transfeksiyonundan 24 saat sonra hücrelerin üzerinde bulunan eski hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı ve 8 ml yeni hücre kültür ortamı ilave edildi. İlgili plazmitlerin transfeksiyonundan 48 saat sonra ise ADKH’lerde E-kaderin promotor bölgesini hedefleyen sgRNA ekspresyonunu sağlayan EkaderinsgRNA1 lentiviral partikülleri, ICAM1 promotor bölgesini hedefleyen sgRNA ekspresyonunu sağlayan ICAM1sgRNA1 lentiviral partikülleri, herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen sgRNA ekspresyonunu sağlayan sgNT pozitif kontrol lentiviral partikülleri ve dCas9 enziminin ekspresyonunu sağlayan dCas9puro lentiviral partiküllerini bulunduran hücre kültür ortamındaki süpernatantlar 50 ml’lik steril santrifüj tüplerine toplandı. Böylece transfer plazmidlerinin lentivirüs üretiminde kullanıldığı her bir grup için toplamda 48 ml lentiviral partikül içeren süpernatant elde edildi. Elde edilen bu lentiviral ürünler, üretimlerinde kullanılan transfer plazmidlerine göre sırasıyla “EkaderinsgRNA1”, “ICAM1sgRNA1”, “sgNT” ve “dCas9puro” olarak adlandırıldı. Bu adlandırmalar, lentiviral partiküllerin sonraki aşamalarda gerçekleştirilmiş olan deneysel analizlerde tanımlanması amacıyla kullanıldı.

2.2.4.6. RT-qPCR Tabanlı Lentiviral Titrasyon Analizi ve Enfeksiyon Verimliliği (Multiplicity of infection/MOI) Değerinin Belirlenmesi

Lentiviral titre belirleme çalışması kapsamında, EkaderinsgRNA1, ICAM1sgRNA1, sgNT ve dCas9puro lentiviral stok çözeltilerinden aşağıdaki Tablo 14’de belirtildiği üzere onluk ardışık dilüsyonlar hazırlandı.

Tablo 14. EkaderinsgRNA1, ICAM1sgRNA1, sgNT ve dCas9puro lentiviral stok çözeltilerinin her biri için aşağıdaki gibi onluk ardışık dilüsyonlar hazırlandı.

Dilüsyon Numarası	Hazırlama Şekli	Son Konsantrasyon (Dilüsyon Katsayısı)
1. dilüsyon	500 µL viral stok çözeltisi	10 ⁰ (stok)
2. dilüsyon	50 µL 10 ⁰ + 450 µL DMEM	10 ⁻¹
3. dilüsyon	50 µL 10 ⁻¹ + 450 µL DMEM	10 ⁻²
4. dilüsyon	50 µL 10 ⁻² + 450 µL DMEM	10 ⁻³
5. dilüsyon	50 µL 10 ⁻³ + 450 µL DMEM	10 ⁻⁴

Reverse transdüksiyon amacıyla EkaderinsgRNA1, ICAM1sgRNA1, sgNT ve dCas9puro gruplarına ait hazırlanan viral dilüsyonlardan sırası ile 24 gözlü kültür kabının her bir gözüne 500 µl eklendi. Negatif kontrol gözlerine yalnızca antibiyotiksiz hücre kültür ortamı eklendi. Ardından her bir göze 10 µg/ml olacak şekilde stok polybren çözeltisinden ilave edildi. Yani, kültür kabının birinci gözü negatif kontrol (transdüksiyon yapılmayan) olarak ve her virüs için 5 gözü ardışık dilüsyonlarla enfeksiyon gerçekleştirmek üzere ayrıldı. Son olarak gözlere 10 µl’de 7×10^4 hücre olacak şekilde HEK293T hücreleri aktarıldı. Hücreler, 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, ortam uzaklaştırıldı, hücreler 250 µl PBS ile yıkandı ve ardından 250 µl %0.25 tripsin-EDTA (eklendi. 3 dakika inkübasyon sonrası hücreler yüzeyden ayrıldı. Tripsin etkisini durdurmak amacıyla hücrelerin üzerine 500 µl antibiyotiksiz DMEM hücre kültür ortamı ilave edildi. Hücre süspansiyonları 1.5 ml’lik santrifüj tüplerine alındı ve 5 dakika 1000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, her bir hücre peletinin üzerine 60 µL QuickExtract™ DNA Extraction çözeltisi eklendi. Ardından bu hücre süspansiyonları 0.2 mL’lik PCR tüplerine transfer edildi ve tüpler ısı döngü cihazına yerleştirildi. Isıl işlem, cihazda şu şekilde uygulandı: 15 dakika 68 °C, ardından 8 dakika 95 °C’de inkübasyon ve son olarak 4 °C’de süresiz bekletme. Reaksiyonun tamamlanmasının

ardından, DNA içeriği tüpteki sıvı süpernatantda bulunurken, hücre kalıntıları alt fazda çökelmiş şekilde kaldı.

Lentiviral partikül yoğunluğu, transgen spesifik bir hedef olan WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element) geni ve referans olarak kullanılan tek kopyalı bir insan geni olan albümin genine ait primer çiftleri kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) yöntemiyle Barczak ve ark.'larının belirlediği yöntemle göre gerçekleştirildi (Barczak, Suchorska, Rubiś, & Kulcenty, 2015) Her iki gen bölgesine özgü primer dizileri Tablo 15'de verilmiştir. Reaksiyon koşullarının doğruluğunu sağlamak ve primer-dimer oluşumunu önlemek amacıyla reaksiyon parametrelerinin özgüllük ve verimlilik açısından optimizasyonu yapılmıştır. Bu kapsamda primer konsantrasyonları 1 pikomol olarak belirlenmiş, bağlanma sıcaklıkları 60 °C olarak optimize edilmiştir. Tüm reaksiyonlar SYBR Green floresan boyası kullanılarak tek renkli qPCR platformunda, başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 5 dakika, 45 döngüden oluşan denatürasyon: 95 °C, 10 sn, primer bağlanma: 60 °C, 10 sn ve uzama: 72 °C, 10 sn olacak şekilde RT-qPCR (Qiagen, A.B.D) cihazında 2X SYBR Green Master Mix (GenemarkBio, Tayvan) kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 15. Lentiviral titre tayini için kullanılan primer dizileri.

Gen	Primer Adı	Nükleotid dizisi
Albümin	ALB F1	5'TTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGA'3
Albümin	ALB R1	5'TGGGGAGGCTATAGAAAATAAGG'3
WPRE	WPRE F1	5'GTCCTTTCCATGGCTGCTC'3
WPRE	WPRE R1	5'CCGAAGGGACGTAGCAGA'3

Lentiviral titre (TU/ml; hedef hücreleri transdükte edebilen viral partikül sayısı/ml), standart protokole göre aşağıdaki parametreler dikkate alınarak belirlendi: 1. transdüksiyon sırasında kullanılan hedef hücre sayısı, 2. hücre başına düşen lentiviral kopya sayısı ve 3. kullanılan lentiviral süpernatant hacmi. Titre tayini, deneysel tekrarlanabilirliğin sağlanması amacıyla iki tekrar halinde gerçekleştirildi. Elde edilen verilerde, hem referans gen (albümin) hem de lentivirüs kaynaklı WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element) sekansı için

ortalama kopya sayıları dikkate alındı. Lentiviral kopya sayısı, şu formüller ile hesaplandı:

Hücre başına düşen lentiviral kopya sayısı=(WPRE kopya sayısı/Alb kopya sayısı)×2. Buradaki 2 çarpanı, albümin geninin diploid hücrelerde iki alel şeklinde bulunmasını yansıtmaktadır. Elde edilen bu veri, belirtilen formül ile titre (TU/ml) değerine dönüştürüldü: Titre (TU/ml) = (Reverse transfeksiyon sırasında ekilen hücre sayısı × numunedeki hücre başına lentiviral kopya sayısı)/kullanılan lentivirüs hacmi (ml). MOI (Multiplicity of Infection), her bir hedef hücreye düşen ortalama viral partikül sayısını temsil eder ve belirtilen şekilde hesaplandı. MOI=Kullanılan toplam viral partikül sayısı (TU)/Toplam hedef hücre sayısı.

MOI hesaplamaları, hedef hücrelerin enfeksiyon verimliliğini belirlemek, uygun viral dozajı seçmek ve enfeksiyon sonrası hücresel cevapları optimize etmek amacıyla yapıldı. Bu kapsamda, elde edilen TU/ml değeri kullanılarak ADKH deney koşullarına uygun “MOI değeri 1” olarak belirlendi ve transdüksiyon işlemleri bu değere göre gerçekleştirildi.

2.2.4.7. ADKH’lerde Optimal Puromisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Memeli hücreleri üzerinde selektif etki gösteren bir antibiyotik olan puromisin, protein sentezini inhibe eden bir bileşiktir. Bu çalışmada, yapısında puromisin direnç geni bulunan dCas9puro plazmidinin transfekte edilmediği hücrelerin, kültür ortamına puromisin eklenmesi yoluyla selektif olarak elimine edilmesi hedeflendi. Bu amaç doğrultusunda, ADKH’ler üzerinde en az toksisiteye sahip optimal puromisin konsantrasyonunun belirlenebilmesi için, plazmid aktarımı yapılmamış ADKH’leri kullanarak bir puromisin optimizasyonu çalışması gerçekleştirildi. Hücre canlılık ve sayım işlemi Merck Muse® Count & Viability Assay kiti aracılığıyla MUSE hücre analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından, hücreler 24 kuyucuklu hücre kültür kabının 12 gözüne 1 ml’de α-MEM hücre kültür ortamında 1.2×10^4 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Hücreler, kültür kabında 18 saat boyunca 37 °C’de, %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi. Çalışılacak gruplara ait gözler duplike olacak şekilde hazırlandı. 18 saatlik inkübasyon süresinin sonunda eski kültür ortamı uzaklaştırıldı ve ilk göze kontrol olarak sadece 1 ml α-MEM hücre kültür ortamı ilave edildi; geri kalan gözlere ise sırasıyla 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl, 3 µg/µl, 4 µg/µl puromisin içeren 1 ml α-MEM hücre kültür ortamı ilave edildi. Puromisinin hücreler üzerindeki etkisi, her 24 saatte bir olmak üzere toplam 72 saat boyunca, Olympus (Japonya) marka IX71

ters faz kontrast floresan mikroskop ile izlendi ve elde edilen gözlemler doğrultusunda optimal puromisin konsantrasyonu belirlendi.

2.2.4.8. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin ADKH’lerde Lentiviral Reverse Transdüksiyon Yoluyla Aşırı İfade Edilmesi

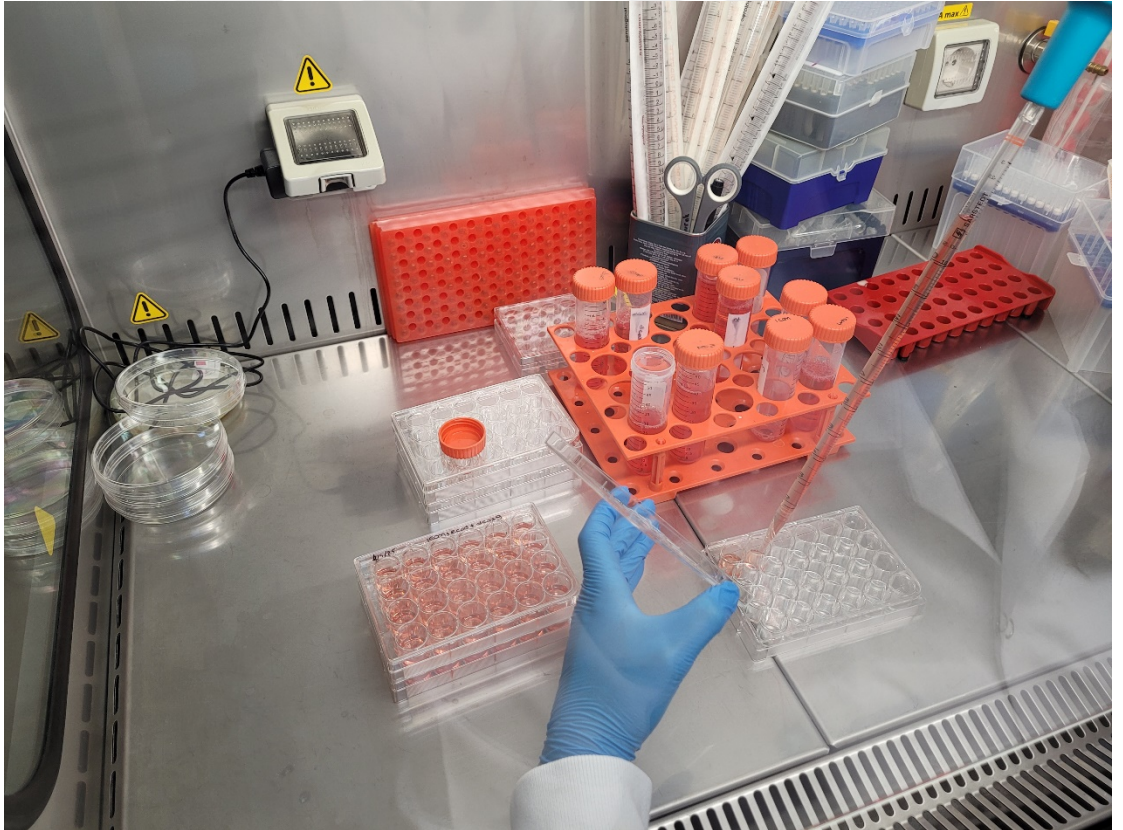
ADKH’lerde lentivirüs aracılıklı reverse transdüksiyon amacıyla EkaderinsgRNA1, ICAM1sgRNA1, sgNT ve dCas9puro gruplarına ait hazırlanan viral stoklardan Tablo 13’belirtilen miktarlarda her bir grup için MOI değeri 1 ve son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde polybren eklenmiş olarak hazırlanmıştır. ADKH’lerde E-kaderin ve ICAM1 genlerinin aşırı ifade çalışmalarının analizi amacıyla Tablo 16’da belirtildiği üzere 5 farklı grup oluşturulmuştur

Tablo 16. ADKH’lerde E-kaderin ve ICAM1 genlerinin aşırı ifade analizi çalışma grupları.

Grup No	Grup Tanımı
1. Grup	Sadece antibiyotiksiz hücre kültür ortamında üretilen ADKH (negatif kontrol grubu)
2. Grup	sgNT + dCas9puro lentiviral reverse transdüksiyonu uygulanan pozitif kontrol / sham grubu
3. Grup	ICAM1sgRNA1 + dCas9puro lentiviral reverse transdüksiyonu uygulanan ICAM1 aşırı ifade grubu
4. Grup	EkaderinsgRNA1 + dCas9puro lentiviral reverse transdüksiyonu uygulanan E-kaderin c grubu
5. Grup	ICAM1sgRNA1 + EkaderinsgRNA1 + dCas9puro lentiviral reverse transdüksiyonu uygulanan ICAM1 + E-kaderin kombine aşırı ifade grubu

Tablo 16’de belirtilen 5 farklı grup için toplamda 5 farklı 24 gözlü hücre kültür kabı kullanılmıştır. Birinci 24 gözlü hücre kültür kabının her bir gözüne sadece 2 ml antibiyotiksiz DMEM High Glucose hücre kültür ortamı ilave edildi. İkinci 24 gözlü hücre kültür kabının her bir gözüne ilk başta sgNT lentiviral karışımından 1 ml ardından üzerine 1 ml dCas9puro lentiviral karışımından ilave edildi. Üçüncü 24 gözlü hücre kültür kabının her bir gözüne ilk başta ICAM1sgRNA1 lentiviral karışımından 1 ml ardından üzerine 1 ml dCas9puro lentiviral karışımından ilave edildi. Dördüncü 24 gözlü hücre kültür kabının her bir gözüne ilk başta EkaderinsgRNA1 lentiviral karışımından 1 ml ardından üzerine 1 ml dCas9puro lentiviral karışımından ilave edildi. Beşinci 24 gözlü hücre kültür kabının her bir gözüne ilk başta ICAM1sgRNA1 ve EkaderinsgRNA1 lentiviral karışımlarından 1 ml ardından üzerine 1 ml dCas9puro

lentiviral karışımından ilave edildi (Şekil 21). Son olarak 2 farklı 75 cm² hücre kültür kabında üretilen ADKH'ler Merck Muse® Count & Viability Assay kitiyle ile MUSE hücre analiz cihazında analiz edilerek canlılık ve sayıları belirlendi. Sayıları belirlenen hücreler DMEM High Glucose hücre kültür ortamında 10 µl'de 1.2x10⁴ hücre olacak şekilde kendi besin ortamlarında süspanse edildi. Ardından 5 farklı 24 gözlü hücre kültür kabının her bir gözüne 10 µl'de 1.2x10⁴ hücre olacak şekilde ADKH'ler ilave edilerek hücreler 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kültür kaplarındaki eski hücre kültür ortamları uzaklaştırılarak gözlere 0,5 µg/ml puromisin içeren 2 ml antibiyotikli α-MEM hücre kültür ortamı ilave edilerek hücrelerin 37 °C'de ve %5 CO₂ koşullarında 72 saat daha inkübasyonu sağlandı. 72 saatlik inkübasyon süresi, hücrelerin bulunduğu kültür ortamı ölü hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla 24 saatte bir eski kültür ortamının uzaklaştırılması ve yeni puromisinli hücre kültür ortamının ilavesi şeklinde gerçekleştirildi.



Şekil 21. Lentiviral karışımların 24 gözlü hücre kültür kaplarına aktarılması.

2.2.4.9. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerde E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR Analizi

2.2.4.8'de belirtilen kontrol ve uygulama gruplarına ait 24 gözlü hücre kültür kaplarının 1 gözü E-kaderin ve ICAM-1 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin analizi için 37 °C'de StemPro™ Accutase™ ile bulundukları yüzeyden kaldırılarak inkübasyon sonunda hücrelerin üzerine 1 ml antibiyotikli α -MEM hücre kültür ortamı ilave edildi. Hücre süspansiyonları 5 farklı 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve 5 dakika 1000 RPM'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelletlerinden E-kaderin ve ICAM1 mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla RNA izolasyonu Quick-RNA Miniprep kitiyle üretici firmanın ilgili prosedürüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları NanoDrop spektrofotometresi (Maestrogen, Tayvan) ile ölçüldü. Daha sonra, total RNA'lerden cDNA sentezi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) kullanılarak üretici firmanın ilgili prosedürüne göre gerçekleştirildi. Her iki gen bölgesine özgü primer dizileri Tablo 12'de verilmiştir. Normalizasyon için ise HPRT1 house keeping genine özgü primerler kullanıldı (Tablo 12). Örneklerle ait elde edilen cDNA'lar E-kaderin ve ICAM1 mRNA ekspresyon analizi başlık 2.2.4.4 belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

2.2.4.10. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerinin Ekildikleri Kültür Ortamındaki Adezyon ve Canlılık Deneyleri

2.2.4.8'de belirtilen kontrol ve uygulama gruplarına ait 24 gözlü hücre kültür kaplarının 1 gözü ekildikleri kültür ortamındaki yüzeyden ayrılma sürelerinin morfolojik olarak belirlenmesi amacıyla analiz edildi. Bunun için, hücrelerin bulunduğu gözlerdeki eski hücre kültür ortamları çekildi ve ardından 1 ml PBS ile yıkandı. PBS ile yıkama işlemi sonrası gözlere 1 ml StemPro™ Accutase™ ilave edildi ve her iki dakikada bir ters faz kontrast floresan mikroskop (Axio, Zeiss) ile aydınlık ve floresan alan fotoğrafları çekilip analizi yapılmak üzere toplamda 15 dakika 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona konuldu. Analiz sonunda hücreleri bulundukları yüzeyden StemPro™ Accutase™ ile kaldırmanın hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek ve bir sonraki hücre tutunma deneyi için sayılarını belirlemek amacıyla gözlerdeki hücreler MUSE hücre analiz cihazında analiz edilerek canlılık ve sayıları belirlendi.

2.2.4.11. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerde Tutunma Sürecinin Morfolojik Analizi

2.2.4.10'da belirtilen kontrol ve uygulama gruplarına ait 24 gözlü hücre kültür kaplarında bulundukları yüzeyden kaldırılmış olan ADKH'lerin canlılık ve sayıları belirlendi. Bu aşamadan sonra beş farklı gruba ait hücreler sayıları her bir göz için 1.2×10^4 hücre/ ml olacak şekilde yeni bir 24 gözlü hücre kültür kabının birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci gözlerine ekilerek her üç saatte bir ters faz kontrast floresan mikroskop (Axio, Zeiss) ile aydınlık ve floresan alan fotoğrafları çekilip analizi yapılmak üzere toplamda 21 saat 37°C 'de, %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi.

2.2.4.12. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği Adipoz Doku Kaynaklı Hücrelerin In Vitro Yara İyileşme Modelinde Etkinliğinin İncelenmesi

2.2.4.8'de belirtilen kontrol ve uygulama gruplarına ait 24 gözlü hücre kültür kaplarının 1 gözündeki hücreler in vitro ortamda yara iyileşme modelinin oluşturulması amacıyla ekildikleri kültür ortamındaki yüzeyden 1 ml StemPro™ Accutase™ ile kaldırıldı. Kaldırılan hücreler MUSE hücre analiz cihazında analiz edilerek canlılık ve sayıları belirlendi. Sayım ve canlılık analizi sonrası beş farklı gruba ait hücreler sayıları her bir göz için 1.2×10^4 olacak şekilde yeni bir 24 gözlü hücre kültür kabının birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci gözlerine ekilerek 24 saat 37°C 'de, %5 CO_2 'li inkübatörde inkübasyona konuldu. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin bulunduğu gözlerin orta hattı boyunca 200 µl'lik pipet ucuyla düz bir hat çizilerek yara modeli oluşturuldu. Ardından, her altı saatte bir ters faz kontrast floresan mikroskop (Axio, Zeiss) ile aydınlık ve floresan alan fotoğrafları çekilip analizi yapılmak üzere yara bölgeleri kapanana kadar hücreler 37°C 'de, %5 CO_2 'li inkübatörde inkübasyona konuldu.

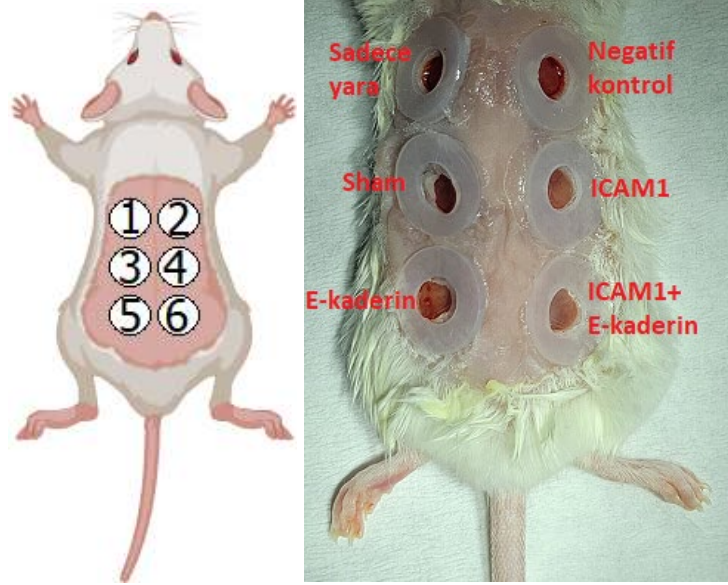
2.2.4.13. Fare Yara Modeli Oluşturulması ve E-kaderin ve ICAM-1 Aşırı İfade Edildiği ADKH'lerin Oluşturulan Yara Bölgesine İmplantasyonu

İn vivo çalışma kapsamında 48 adet albino BALB/c fare kullanıldı. Her bir deneysel değerlendirme zamanı için $n=6+2$ yedek hayvan olacak şekilde gruplandırma yapıldı. Fareler, intraperitoneal enjeksiyon yoluyla 1:2 oranında hazırlanmış ksilazin ve ketamin karışımı ile anestezi altına alındı. Anestezik solüsyon, %1 Ksilazin-HCl (Rompun, Bayer, Almanya) ve %10 Ketamin-HCl (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye)

kullanılarak hazırlandı. Ardından sırt tüyleri önce traşlanarak kısaltıldı ve kalan tüyler tüy dökücü krem (Veet, Reckitt Benckiser, Kanada) uygulanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra kalan tüy dökücü krem artıkları steril gazlı bez ve steril serum fizyolojik ile temizlendi. Yara oluşturulması için fareler yüz üstü pozisyonda sabitlenerek cerrahi alan temizliği yapıldı (Şekil 22). Her bir farede sırtın orta hattının her iki yanına denk gelecek şekilde, 5 mm çapında biyopsi punch (Stiefel, Almanya) yardımıyla dikkatli bir şekilde, tam kat deri defektleri oluşturuldu. Yara kontraksiyonunu önlemek amacıyla, panniculus carnosus kasının büzüşme etkisini izole etmek için, 6 mm punch ile delinmiş, 12 mm çapındaki ve %70'lik etanol ile sterilize edilmiş silikon simitler kullanıldı. Bu simitler, yara dudaklarını sabitlemek üzere, 6 mm'lik merkez delikleri yara alanı ile hizalanacak şekilde yara çevresine hızlı yapıştırıcı ile dikkatlice yapıştırıldı (Şekil 23).



Şekil 22. BALB/c farelerin tüylerinin temizlenmesi.



Şekil 23. Farelerde tam kat deri defekti oluşturulması ve silikon simitler ile yara kenarlarının sabitlenmesi.

Silikon simitlerin oluşturduğu rezervuar alanlarına, hücreler Tablo 18’da belirtilen deney gruplarına ve Şekil 23’de gösterilen sıralamayla yara bölgelerine uygulandı. ADKH’ler, her bir yara alanına 50 μ l’de 5×10^4 hücre içerecek şekilde tek doz olarak implante edildi. Uygulama işlemi steril koşullarda, yara oluşturulmasını takiben gecikmeden gerçekleştirildi.

Tablo 17. İn vivo çalışma grupları.

Grup	Yara Bölgesi Üzerine Verilecek Hücreler
1. grup	Herhangi bir uygulama yapılmayan ve hücre verilmeyen sadece tam kat deri defekti uygulanan yara
2. grup	Herhangi bir gen modifikasyonu uygulanmamış negatif kontrol ADKH’lerin implante edildiği yara
3. grup	Herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen sgRNA ve dCas9 kompleksinin viral transdüksiyon ile aktarıldığı sham ADKH’lerin implante edildiği yara
4. grup	ICAM1 gen ifadesi artırılmış ADKH’lerin implante edildiği yara
5. grup	E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH’lerin implante edildiği yara
6. grup	ICAM1 ve E-Kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH’lerin implante edildiği yara

İlgili yara bölgelerine hücreler implante edildikten sonra 5 dakika beklenmiş ve ardından açılan yaraların üstü 3M Tegaderm 1626W (3M, ABD) şeffaf yara örtüsü ile örtüldü. Böylece yara bölgesi dış ortamdan izole edilerek enfeksiyon riski azaltılmış ve implant edilen hücrelerin yara bölgesinde stabil kalması sağlandı. Uygulama sonrası fareler gözlenerek olası komplikasyonlar açısından izlendi ve bireysel kafeslere yerleştirildi. 22 ± 1 °C sıcaklıkta, %40-60 nem seviyesine sabitlenmiş ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsüne sahip, filtrelenmiş havalandırması olan bir odada saf su ve standart fare yemi ile beslenerek deney süresince bakımları yapıldı.

Uygulama sonrası belirtilen günlerde yara örtüleri ve silikon simitler çıkarıldı ve yara bölgelerinin fotoğrafları çekildi, klinik olarak yara kapanması, iyileşme hızı açısından incelendi ve gruplara ait doku örnekleri alındı.

2.2.4.14. E-kaderin ve ICAM-1 İfade Seviyesi Artırılmış ADKH'lerin Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin Histolojik ve İmmunofloresan Olarak Değerlendirilmesi

3, 7, 15 ve 21. günlerde yara yerinden meydana gelen histopatolojik değişiklikler ve bu değişiklikleri kontrol eden moleküler mekanizmalar değerlendirildi. İlgili gruplara ait dokulardan alınan örneklerden histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı.

2.2.4.14.1. Dokuların Parafin Bloklara Gömülmesi

Belirlenmiş günlerde her bir gruba ait örnekler %10' luk formaline alınarak 2 gün boyunca fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra dokular ait oldukları gruba göre isimlendirilerek doku kasetlerine aktararak artan alkol serilerinden (%70, 80, 90, 96, 100) geçirilerek dehidrate edildi. Ardından ksilol ve parafin serilerinden geçirilen dokular parafin içerisine gömülerek parafin bloklar elde edildi. Elde edilen parafin bloklardan histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler yapılmak üzere mikrotom (Leica, HistoCore MULTICUT - Semi-Automated Rotary Microtome, Almanya) ile 5 µm olacak şekilde lizinli lamlara kesitler alındı.

2.2.4.14.2. Hematoksilen-Eozin Boyama

Gruplara ait hazırlanan kesitlerden dokuların histokimyasal incelemesi için Hematoksilen-Eozin boyama gerçekleştirildi.

Parafin uzaklaştırma işlemi için lamalar, öncelikle 60 °C’de 30 dakika süreyle etüvde bekletildi. Daha sonra sırasıyla ksilol ve azalan alkol serilerinden (%96, 80,70,60) geçirildi ve ardından akar suda 20 dakika süreyle yıkandı. Hematoksilen ile 10 dakika boyanan kesitler, fazla boyayı uzaklaştırmak amacıyla akar suda yıkamaya tabi tutuldu. Preparatlar üzerindeki fazla su uzaklaştırıldıktan sonra, kesitler asit-alkol solüsyonuna 2–3 saniye süreyle daldırılıp çıkarıldı. Süzdürme işleminin ardından, kesitler 2–3 saniye boyunca eozin boyasına batırılıp çıkarılarak tekrar akarsuda yıkandı. Devamında %96’lık alkol serisinden iki kez geçirilerek kuruması sağlandı. Şeffaflaştırma amacıyla kesitler ksilende 1 saat süreyle bekletildi. İşlem sonunda lamalar lam kapatıcı ile kapatılarak ışık mikroskobu (Axio, Zeiss) ile incelendi.

2.2.4.14.3. E-kaderin ve ICAM-1 İfade Seviyesi Artırılmış ADKH’lerin Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin İmmunofloresan Olarak Değerlendirilmesi

Dokulara ait parafin bloklardan alınan kesitler, parafinin uzaklaştırılması amacıyla 60 °C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika süreyle bekletildi. Ardından, kesitler ksilen içerisinde her biri 20 dakika olacak şekilde üç kez değişimli olarak bekletildi. Takiben, kesitler sırasıyla %96, %80, %70 ve %60’lık azalan alkol serilerinden ikişer dakika süreyle geçirildi ve 1X PBS ile üç kez, her biri 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Hücre zarının geçirgenliğini artırmak amacıyla, önceden 97 °C’de ısıtılmış su banyosunda cam şaleler içerisine yerleştirilen kesitler, sitrat tampon çözeltisi (10 ml hazır sitrat tampon + 90 ml saf su + 50 µl Tween 20) içerisinde 30 dakika bekletildi. Bu işlem sonrasında cam şalelerin oda sıcaklığında soğuması için 20–25 dakika süreyle bekleme yapıldı. Soğuyan preparatlar, 1X PBS içerisinde her biri 5 dakika olacak şekilde üç kez yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla, kesitler %3’lük hidrojen peroksit çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Ardından 1X PBS ile üç kez, her biri 5 dakika olacak şekilde yıkama işlemi gerçekleştirildi. Lamalar üzerindeki dokuların çevresi kurutma kağıdı ile dikkatlice silinerek kurutuldu ve PAP-PEN kullanılarak dokuların etrafı sınırlandırıldı. Sonrasında, bloklama işlemi için %10 keçi serumu (9 ml 1X PBS + 1 ml keçi serumu) dokular üzerine uygulanarak, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve lamalar, nemli ortam sağlayacak kutulara yerleştirildi. Yara iyileşme sürecinde rol oynayan moleküler mekanizmaların belirlenmesine yönelik olarak seçilen primer antikorlar (Tablo 18) %10’luk keçi serumu içerisinde 1:200 oranında seyreltilerek dokular üzerine uygulandı ve +4 °C’de

gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda preparatlar 1X PBS ile üç kez, her biri 5 dakika olacak şekilde yıkandı.

Tablo 18. IF boyama için kullanılan primer antikorlar.

Hedef Protein (Primer Antikor)	Marka	Katalog Numarası
IL-10	Elabscience IL10 Polyclonal Antibody	E-AB-70235
TNF- α	Elabscience TNF alpha Polyclonal Antibody	E-AB-33121
MMP-2	Elabscience MMP2 Polyclonal Antibody	E-AB-32054
BrdU	Elabscience BrdU Monoclonal Antibody	E-AB-70248

Bu aşamadan itibaren, kullanılacak sekonder antikor floresan konjugatlı olduğundan, işlemler karanlık ortamda sürdürüldü. Kesitler, 1X PBS ile 1:100 oranında seyreltilmiş Elabscience Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (FITCconjugated) (E-AB-1014) sekonder antikoruna ile oda sıcaklığında, karanlık koşullarda 2 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kesitler 1X PBS ile üç kez, her biri 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Sonrasında, DAPI uygulanarak kesitler karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi ve 1X PBS ile üç kez, 5'er dakikalık yıkama gerçekleştirildi.

Yıkama işleminin ardından, dokuların şeffaflaştırılması amacıyla 30 dakika süreyle ksilen içerisinde bekletildi. Bu işlemin ardından fazla ksilen uzaklaştırıldı ve lamalar kapatma solüsyonu ile kapatılarak kuruması sağlandı. Hazırlanan örnekler, Zeiss Axiovert floresan mikroskobu ile floresan ışık altında incelendi.

2.2.4.15. Makroskopik İncelemeler ve Yara Kapanma Hızı Tayini

Yara iyileşme sürecinin makroskopik düzeyde değerlendirilmesi amacıyla, deneysel gruplarda oluşturulan tam katlı deri defektleri, postoperatif 3., 7., 15. ve 21. günlerde fotoğraflar çekilerek takip edildi. Yara kapanma oranı, aşağıda belirtilen formül yardımıyla yüzde (%) cinsinden hesaplandı:

$$\text{Kapanma Yüzdesi (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_n}{A_0} \right) \times 100$$

- A_0 : 0. gündeki orijinal yara alanı
- A_n : n. gündeki toplam yara alanı

2.2.4.16. İstatistiksel Analizler

Gruplar arasındaki farklılıklar SPSS 23.0 programı aracılığıyla One-Way ANOVA analizi ve Post-Hoc Tukey analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Mikroskop analizlerinin değerlendirilmesinde ImageJ programı kullanılmıştır. $p < 0.05$ 'den küçük değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.



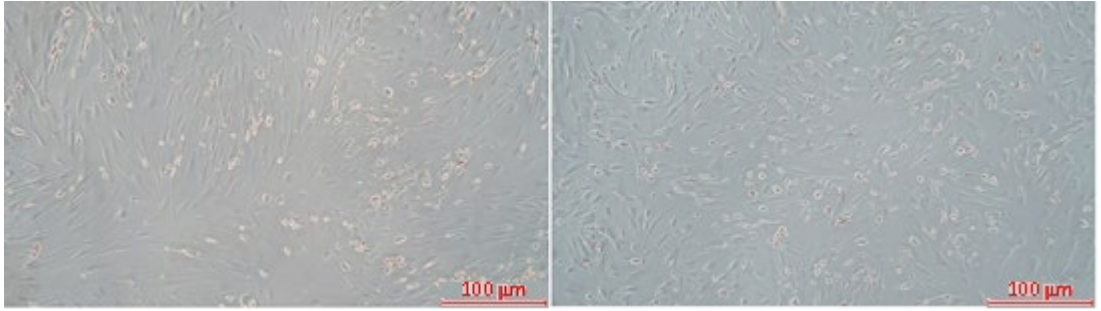
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Bulgular

3.1.1. Fare Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu, İzole Edilen Hücrelerin Kültürü ve Pasajlanması

Sekiz haftalık erkek Balb/C farelerden, böbreklerin arka yüzeyine ve testislerin lateral bölgelerinde yer alan adipoz dokular dikkatle çıkarılmıştır. Elde edilen doku örnekleri, steril koşullarda tip I kollajenaz çözeltisi ile enzimatik olarak parçalanarak elde edilen hücresel süspansiyon, standart hücre kültürü protokolüne uygun olarak kültüre edilmiştir. Dört gün süresince kültürde tutulan hücrelerin, inkübasyon sonunda yaklaşık %80 doluluk hale geldiği ve kültür yüzeyine tam olarak yapıştığı mikroskopik olarak gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, bu hücrelerin iğsi /mekik şekilli morfolojik özellikler sergilediği ve tipik MKH fenotipiyle uyumlu bir görünüm sunduğu tespit edilmiştir (Şekil 24).

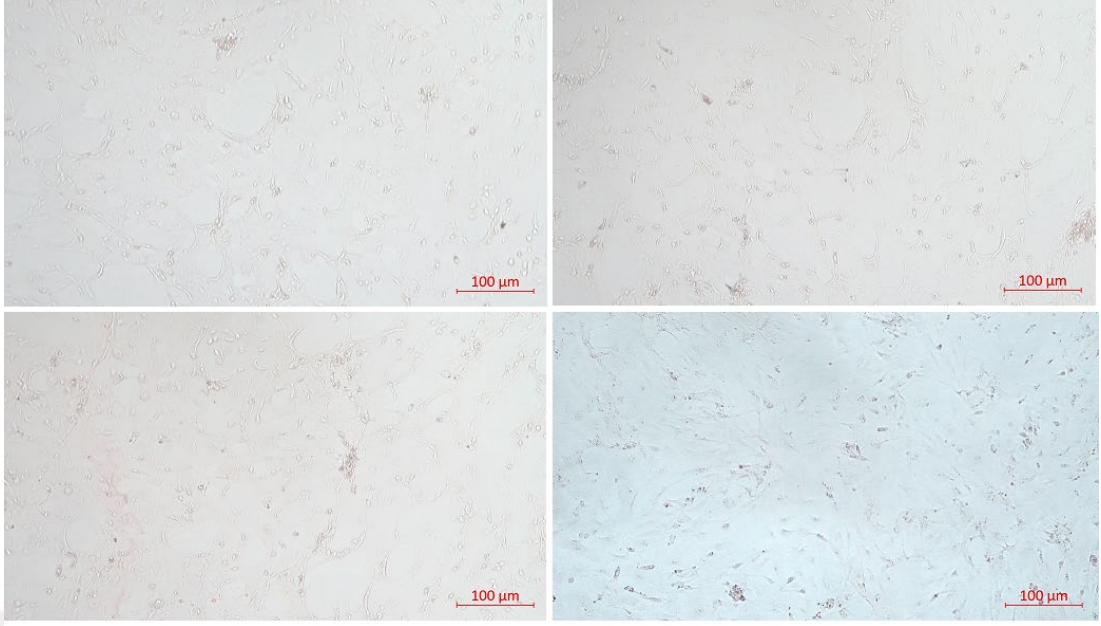


Şekil 24. ADKH'lerinin ters faz kontrast mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).

3.1.2. Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

3.1.2.1. Oil Red O Boyama

Fare adipoz dokusundan izole edilen P0 ADKH'lere uygulanan Oil Red O boyası, hücre sitoplazmasında nötral lipid ve trigliserid birikimini histokimyasal olarak değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Boyama sonrası elde edilen mikroskopik görüntülerde, hücre sitoplazmasında Oil Red O ile spesifik olarak boyanan lipid damlacıklarına rastlanmamıştır. Bu bulgu, hücrelerin adiposit fenotipine geçiş yapmadığını, farklılaşmamış durumda kaldıklarını ve MKH'lere ait karakteristik özelliklerini koruduklarını göstermektedir (Şekil 25).

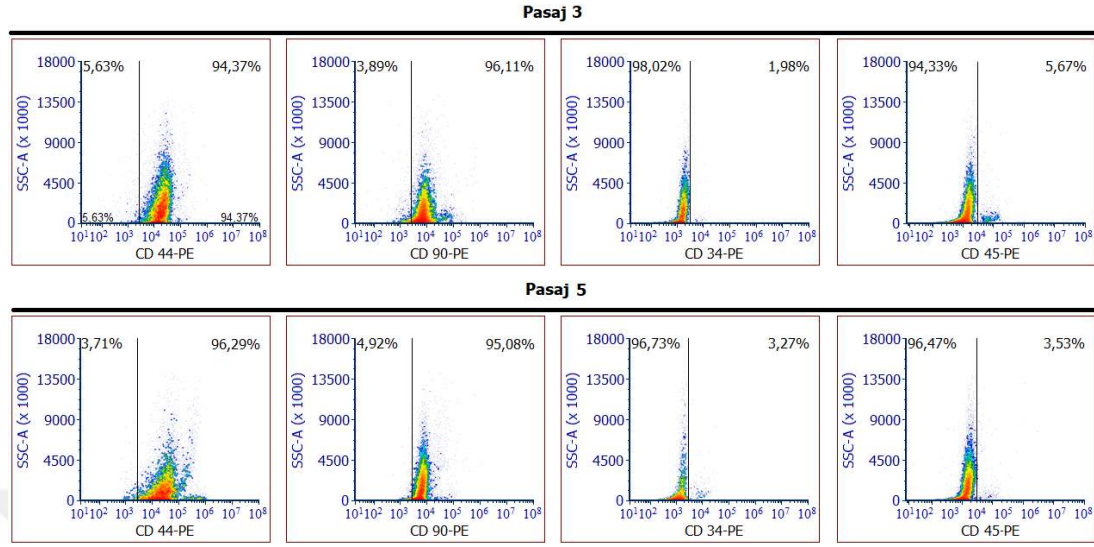


Şekil 25. ADKH'lerde P0'da gerçekleştirilen Oil Red O boyama sonuçlarının ters faz kontrast mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).

3.1.2.2. Akış Sitometrisi ile Adipoz Doku Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Bu çalışmada, fare adipoz dokusundan izole edilen ve kültüre alınarak 3. ve 5. pasajlara kadar çoğaltılan ADKH'ler, karakteristik yüzey antijen ekspresyonları akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Hücrelerin kök hücre özelliğini koruyup korumadığı, mezodermal kök hücreler için pozitif (CD44 ve CD90) ve negatif (CD34 ve CD45) olarak tanımlanan yüzey markırlarına göre değerlendirilmiştir. 3. pasajdaki ADKH'lerde CD44 ekspresyonu %94,37 ve CD90 ekspresyonu %96,11 oranında pozitif bulunmuştur (Şekil 26). Bu hücrelerde hematopoetik hücre belirteçleri, CD34 ve CD45 ise sırasıyla %1,98 ve %5,67 oranlarında tespit edilmiştir. Bu durum, 3. pasaj hücrelerinin yüksek oranda MKH özelliği gösterdiğini, hematopoetik hücre kontaminasyonunun ise minimal düzeyde olduğunu göstermektedir. 5. pasajdaki hücrelerde de benzer bir profil gözlenmiştir. CD44 ve CD90 ekspresyon oranları sırasıyla %96,29 ve %95,08 olarak tespit edilmiştir. Negatif markırlar olan CD34 ve CD45 ekspresyon oranları ise sırasıyla %3,27 ve %3,53 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, kültür süresince hücrelerin mezenkimal fenotiplerini büyük ölçüde koruduklarını ve kültür geçişlerinin kök hücre karakteristiği üzerinde anlamlı bir bozulmaya yol açmadığını göstermektedir. Genel olarak, hem 3. hem de 5. pasajdaki ADKH'lerde yüksek düzeyde CD44 ve CD90 pozitifliği ile düşük düzeyde CD34 ve CD45 pozitifliği gözlenmesi, izole edilen hücrelerin MKH özelliklerini taşıdığını

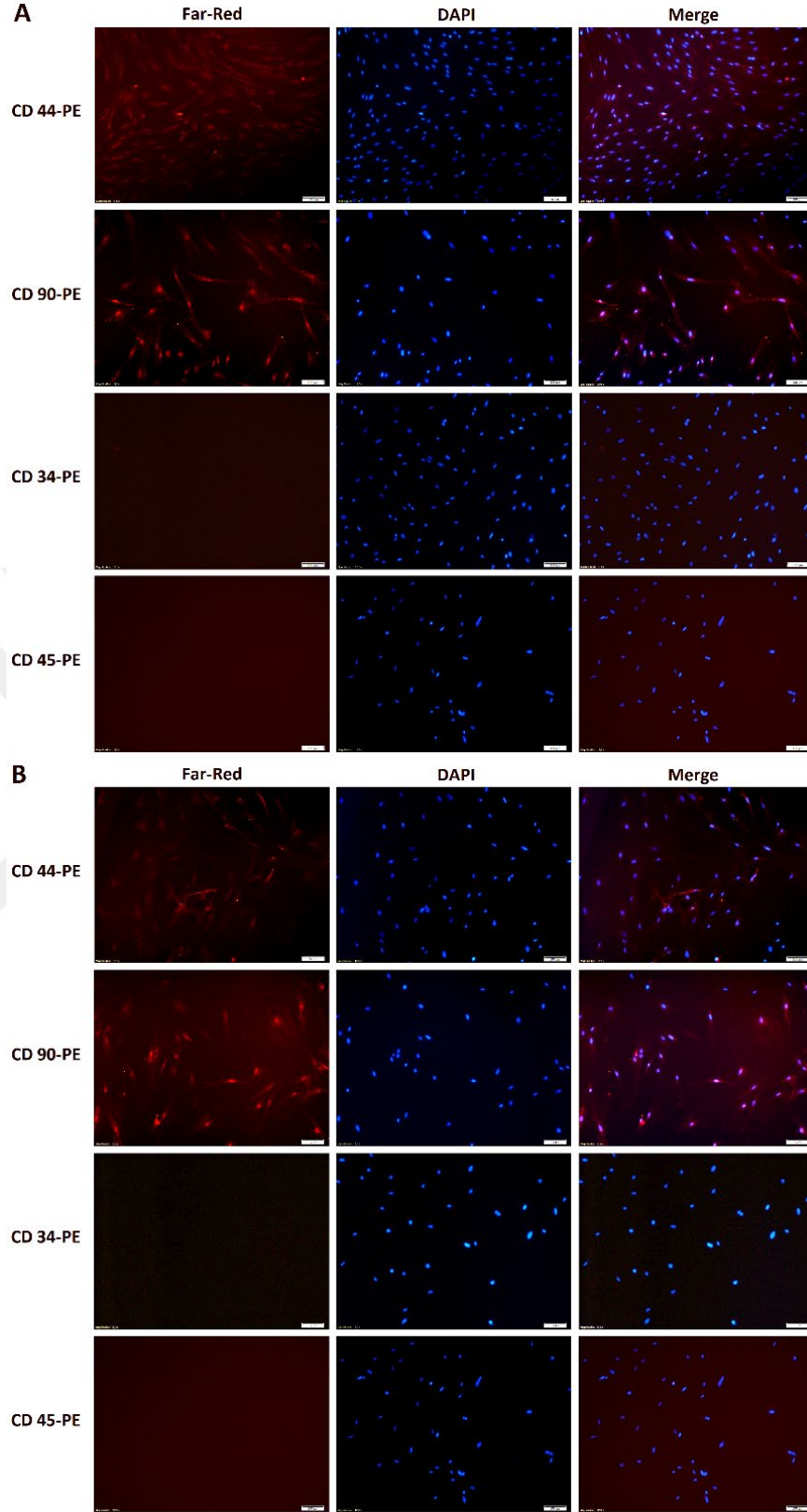
doğrulamaktadır. Bu bulgular, izole edilen ADKH'lerin sonraki genetik ve fonksiyonel analizler için uygun bir hücresel model olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 26. 3. ve 5. pasajdaki ADKH CD44, CD90, CD34 ve CD45 yüzey belirteç ekspresyonlarının akış sitometrisi analizi.

3.1.2.3. İmmüno Floresan Boyama ile Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Bu çalışmada, fare adipoz dokusundan izole edilen ve kültüre alınarak 3. ve 5. pasajlara kadar çoğaltılan ADKH'ler, bu hücrelere özgü yüzey belirteçlerinin (CD44 ve CD90) ve hematopoetik kökenli hücre belirteçlerinin (CD34 ve CD45) ifade düzeyleri, IF boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir. Buna göre, 3. pasajda bulunan CD44 ve CD90 ile işaretlenmiş hücreler, belirgin şekilde kırmızı floresan sinyali göstermiştir (Şekil 27). Buna karşın, CD34 ve CD45 ile işaretlenen hücrelerde herhangi bir floresan sinyal gözlenmemiştir. Benzer şekilde, 5. pasajda bulunan hücrelerde de CD44 ve CD90 pozitifliği, fikoeritrin (PE) floresansı ile açık şekilde doğrulanmıştır. Buna karşın, CD34 ve CD45 antikorlarına karşı herhangi bir floresan reaksiyon saptanmamıştır. Bu sonuçlar, her iki pasajda da elde edilen hücre popülasyonunun mezenkimal kökenli olduğunu, aynı zamanda hematopoetik hücre kontaminasyonunun bulunmadığını göstermektedir (Şekil 27).

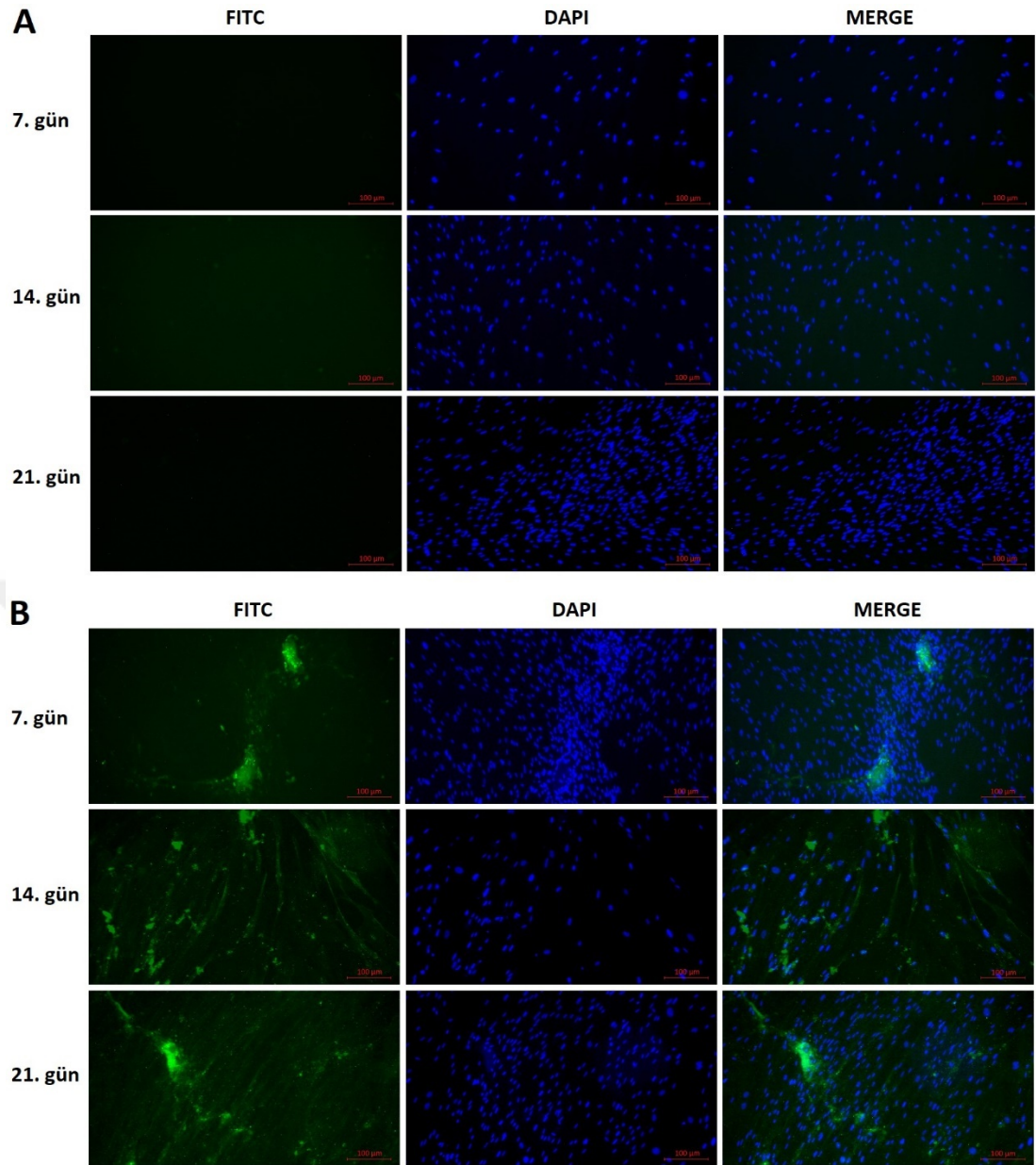


Şekil 27. A) 3. Pasajda ADKH’lerde CD yüzey markırlarının IF analizi ile değerlendirilmesi. **B)** 5. Pasajda ADKH’lerde CD yüzey markırlarının IF analizi ile değerlendirilmesi (10X Büyütme).

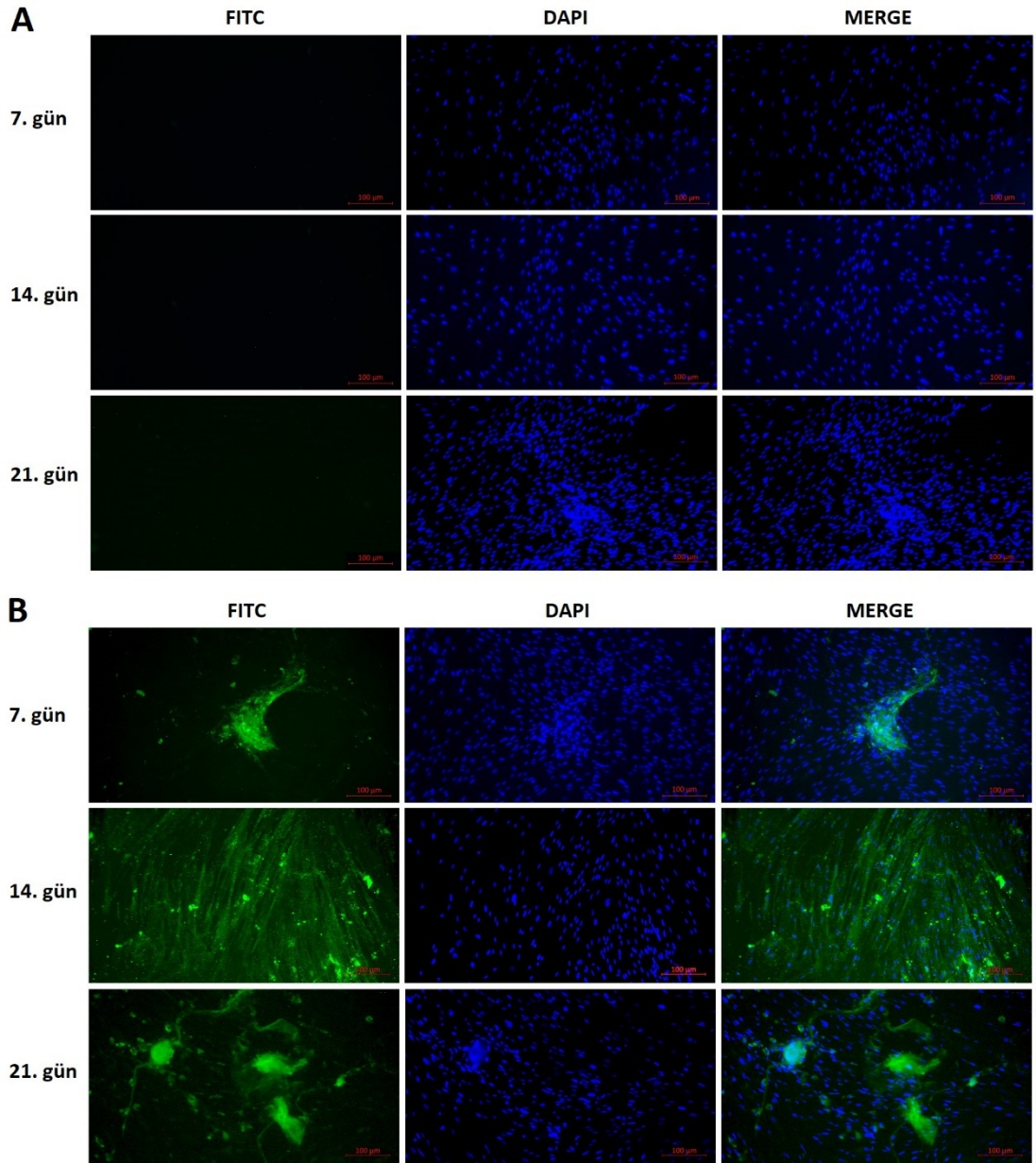
3.1.3. Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

3.1.3.1. İmmunofloresan Yöntem

Bu çalışmada, ADKH'lerin osteoblastlara farklılaştırılabilirliği, osteoblastlara özgü protein belirteçleri olan osteokalsin ve osteonektin ekspresyonları üzerinden IF analizi ile değerlendirilmiştir. Farklılaştırma için 50 µg/ml askorbik asit, 10⁻⁸ M deksametazon ve 10 mM β-gliserofosfat içeren osteojenik farklılaşma ortamı kullanılmıştır. Farklılaştırılan ADKH'lerin 7., 14. ve 21. günlerinde, anti-osteokalsin ve anti-osteonektin primer antikoları ile uygulanan IF boyama protokolü sonucunda, FITC bağlı sekonder antikolar yardımıyla elde edilen floresan sinyalleri floresan mikroskop ile analiz edilmiştir (Şekil 28 ve 29). Negatif kontrol (farklılaştırma yapılmamış ADKH'ler) grubunda, osteokalsin ve osteonektin antikolarına karşı herhangi bir yeşil floresan (FITC) sinyali gözlemlenmemiştir. Buna karşılık, osteojenik farklılaştırma uygulanan gruplarda, belirlenen analiz günlerinde osteoblastik markırlara özgü FITC sinyalleri belirgin şekilde tespit edilmiştir. Buna göre, 7. günde, hücrelerde osteokalsin ve osteonektin varlığına dair orta düzeyde FITC sinyali görülmüştür. 14. günde, bu sinyallerin daha yoğun hale geldiği gözlemlenmiş, osteoblastik fenotipin güçlenmeye başladığı anlaşılmıştır. 21. günde ise FITC sinyali hem yoğunluk hem de yaygınlık açısından en üst düzeye ulaşmış, osteoblastik farklılaşmanın ileri evreye taşındığı doğrulanmıştır. Bu bulgular, osteokalsin ve osteonektin markırlarının, osteoblastik farklılaşma sürecinde zamanla artan şekilde eksprese edildiğini ve kullanılan protokolün ADKH'lerde başarılı bir osteojenik yönlendirme sağladığını göstermektedir.



Şekil 28. ADKH’lerde osteojenik farklılaştırma sonrası osteoblastik markır olarak osteokalsin ekspresyonunun IF analizi. **(A)** negatif kontrol grubuna ait ADKH’lerin sırasıyla 7., 14. ve 21. günlerdeki osteokalsin ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri. (10X Büyütme) **(B)** Osteoblastik farklılaştırma ortamında kültüre edilen ADKH’lerin 7., 14. ve 21. günlere ait osteokalsin ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).

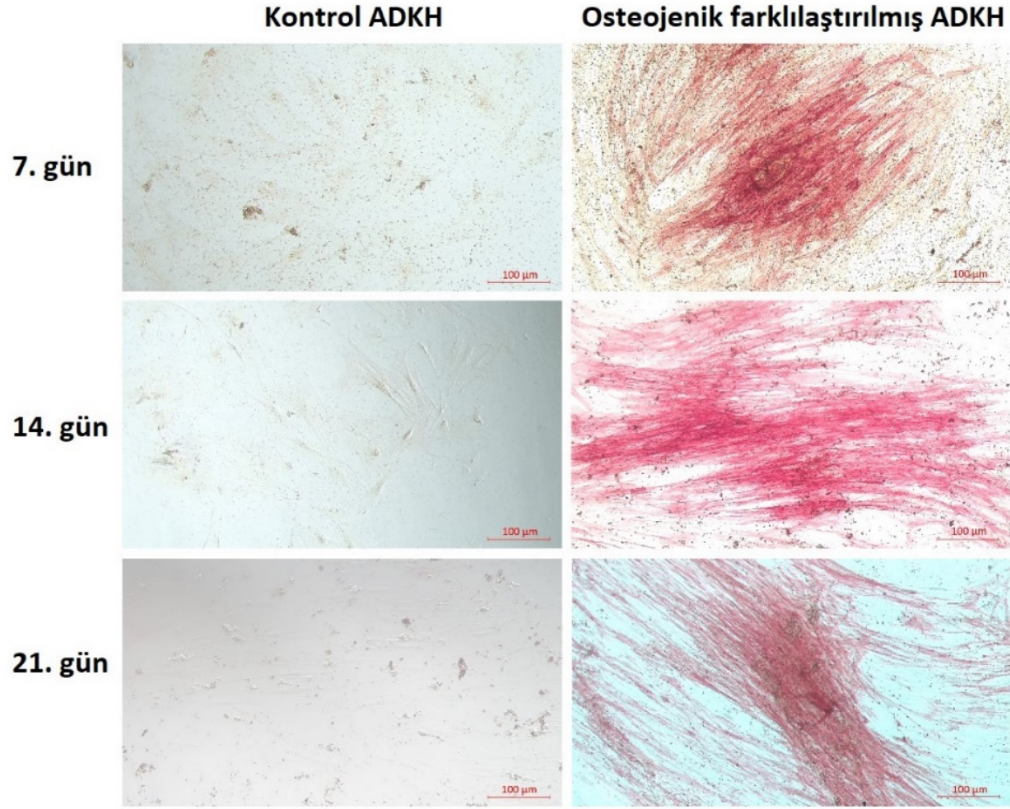


Şekil 29. ADKH’lerde osteojenik farklılaştırma sonrası osteoblastik markır olarak osteonektin ekspresyonunun IF analizi. **(A)** negatif kontrol grubuna ait ADKH’lerin sırasıyla 7., 14. ve 21. günlerdeki osteonektin ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri. **(B)** Osteoblastik farklılaştırma ortamında kültüre edilen ADKH’lerin 7., 14. ve 21. günlere ait osteonektin ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).

3.1.3.2. İmmunositokimyasal Yöntemler

3.1.3.2.1. Alkalen Fosfataz /Von Kossa (ALP/ VK) Boyaması

ADKH'lerde osteojenik farklılaştırma kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla, osteoblast farklılaştırma ortamında 7, 14 ve 21 gün süreyle kültüre edilen hücrelerde alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi ve mineralizasyon düzeyleri ALP/Von Kossa (VK) boyama yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 30). Belirlenen analiz günlerinin sonunda, ALP enzim aktivitesine sahip bölgelerin kırmızı renk aldığı gözlenmişken, kalsiyum iyonu birikimi olan mineralize nodül bölgelerinde kahverengi renklenme olduğu tespit edilmiştir. 7. gün sonunda, ALP aktivitesi düşük düzeyde olup, mineralize nodül oluşumu sınırlı düzeyde gözlenmiştir. 14. günde, hücreler üzerinde kırmızı boyanmış ALP pozitif alanların sayısı artmış olarak bulunmuştur. 21. gün sonunda ise, ALP aktivitesi maksimum seviyeye ulaşmış; çok sayıda yoğun kırmızı boyanmış alan ve geniş kahverengi mineralize nodül birikimleri gözlenmiştir. Bu durum, osteoblastik farklılaşmanın ileri evrelere ulaştığını ve hücrelerin kalsifiye matriks oluşturmaya başladığını göstermiştir. Bu bulgular, ADKH'lerin osteojenik yönlendirme sonrası zamanla artan osteoblastik aktivite ve mineralizasyon kapasitesi sergilediğini göstermiştir.

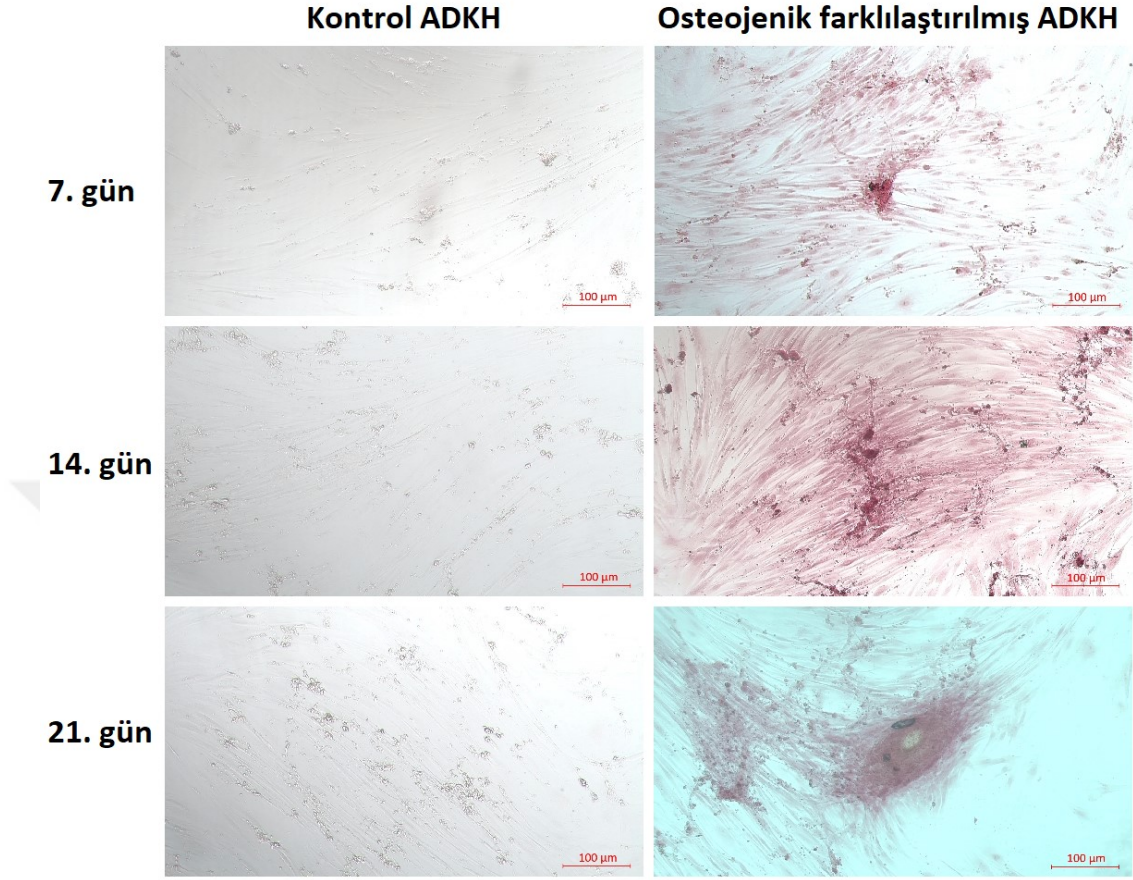


Şekil 30. Osteojenik farklılaştırılan ve kontrol ADKH’lerde 7., 14. ve 21. günlerde gerçekleştirilen ALP/Von Kossa boyama sonuçlarının ters faz kontrast mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).

3.1.3.2.2. Alizarin Kırmızısı Boyaması

Bu çalışmada, ADKH’lerin osteoblastlara farklılaştırılmasını takiben ekstrasellüler kalsiyum birikimini değerlendirmek amacıyla AK boyama uygulanmıştır. Osteoblastik farklılaştırma ortamında 7, 14 ve 21 gün süreyle kültüre edilen hücrelerin yüzeylerinin boyama sonrası, hücre yüzeyinde kalsiyum içeren mineralize alanların AK tarafından kırmızı renkle işaretlendiği, mikroskop ile yapılan gözlemlerde net bir şekilde belirlenmiştir (Şekil 31). 7. gün sonunda mineralizasyonun başlangıç düzeyinde olduğu ve başlangıç aşamasında AK pozitif (kırmızı) odakların ortaya çıktığı belirlenmiştir. 14. günde, kalsiyum birikimi artmış ve hücre yüzeyinde daha yoğun AK pozitif (kırmızı) odaklar ortaya çıktığı belirlenmiştir. 21. gün sonunda ise boyalı alanların hem yoğunluğu hem de yaygınlığı maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Bu durumun osteoblastik farklılaşmanın ileri evrelerine işaret eden güçlü kalsifikasyon aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak AK boyama ile elde edilen morfolojik verilerin, osteoblast yönünde farklılaştırılmış ADKH’lerde zamana

bağlı olarak artan kalsifikasyon ve mineral matriks üretimini doğruladığını göstermiştir.



Şekil 31. ADKH’lerde osteojenik farklılaştırma sonrası kalsiyum birikiminin AK boyaması ile değerlendirilmesi. Osteojenik farklılaştırılan ve kontrol ADKH’lerde 7., 14. ve 21. günlerde gerçekleştirilen AK boyama sonuçlarının ters faz kontrast mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).

3.1.4. sgRNA Duplekslerinin Klonlandığı Plazmidlerin Klonlama Bölgelerinin Sanger Sekans Analizi

EkaderinsgRNA1, EkaderinsgRNA2, EkaderinsgRNA3, ICAM1sgRNA1, ICAM1sgRNA2 ve sgNT sgRNA duplekslerinin hedef plazmid bölgelerine doğru bir şekilde klonlandığının belirlenebilmesi amacıyla hedef plazmidlerin üzerinde klonlamanın gerçekleştiği U6 promotor bölgesinin 3’ uç bölgesi ve sgRNA iskele yapısını kodlayan gen bölgesi arasındaki nükleik asit dizisi sanger sekans analizi ile incelenmiştir. Şekil 32’de gösterildiği üzere ilgili EkaderinsgRNA1, EkaderinsgRNA2, EkaderinsgRNA3, ICAM1sgRNA1, ICAM1sgRNA2 ve sgNT

sgRNA duplekslerinin hepsi herhangi bir delesyon ya da insersiyon içermeksizin hedef bölgeye başarı ile klonlanmıştır.

Şekil 32. EkaderinsgRNA1, EkaderinsgRNA2, EkaderinsgRNA3, ICAM1sgRNA1, ICAM1sgRNA2 ve sgNT sgRNA duplekslerinin hedef plazmid bölgesine doğru bir şekilde bağlandığını gösteren sanger elektroferogramı.

Yürütülen bu deneysel çalışmada, CRISPR/dCas9 sistemi ile birlikte kullanılan sgRNA sisteminin, hedef gen promotor bölgelerine bağlanarak mRNA ekspresyon düzeylerini artırma kapasiteleri değerlendirilmiştir. ICAM1 ve E-kaderin genlerinin promotor bölgelerine özgü olarak dizayn edilen sgRNA'lar, lentiGuide-Hygro-eGFP plazmidine klonlandıktan sonra sekans doğrulamaları yapılarak dCas9puro plazmidini ile birlikte 67NR hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfeksiyonların ardından ICAM1 geni mRNA düzeyleri, RT-qPCR ile ölçülmüştür. Negatif kontrol ve NT (hedefsiz sgRNA) pozitif kontrol gruplarında ICAM1 mRNA düzeyleri bazal seviyelerde kalmıştır. Buna karşın, ICAM1sgRNA1 ve ICAM1sgRNA2 ile transfekte edilen hücrelerde ICAM1sgRNA1 ile ICAM1 genine ait mRNA düzeyi yaklaşık 370 kat anlamlı ($p<0.0001$) bir artış göstermiştir (Tablo 19) (Şekil 33). Bu, ICAM1 promotoruna en etkili bağlanmanın ICAM1sgRNA1 ile sağlandığını göstermektedir. Ayrıca, E-kaderin'e yönelik sgRNA'lar (sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3) ile yapılan transfeksiyonlar sonucunda ise EkaderinsgRNA1 ile transfekte edilen hücrelerde E-kaderin genine ait mRNA düzeyi yaklaşık 14 kat anlamlı ($p<0.0001$) bir artış göstermiştir (Tablo 20) (Şekil 33). Bununla birlikte, negatif kontrol ve NT (hedefsiz sgRNA) pozitif kontrol gruplarında E-kaderin mRNA düzeyleri bazal seviyelerde kaldığı belirlendi. Ayrıca, analiz sonuçlarına göre ICAM1 geninin aşırı ifade olmasının E-kaderin gen ekspresyonu üzerinde ya da E-kaderin geninin aşırı ifade olmasının ICAM1 gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir artış oluşturmadığı ($p>0.05$) belirlendi. Bu durum hedef özgüllüğünün korunduğunu ve genler arası çapraz

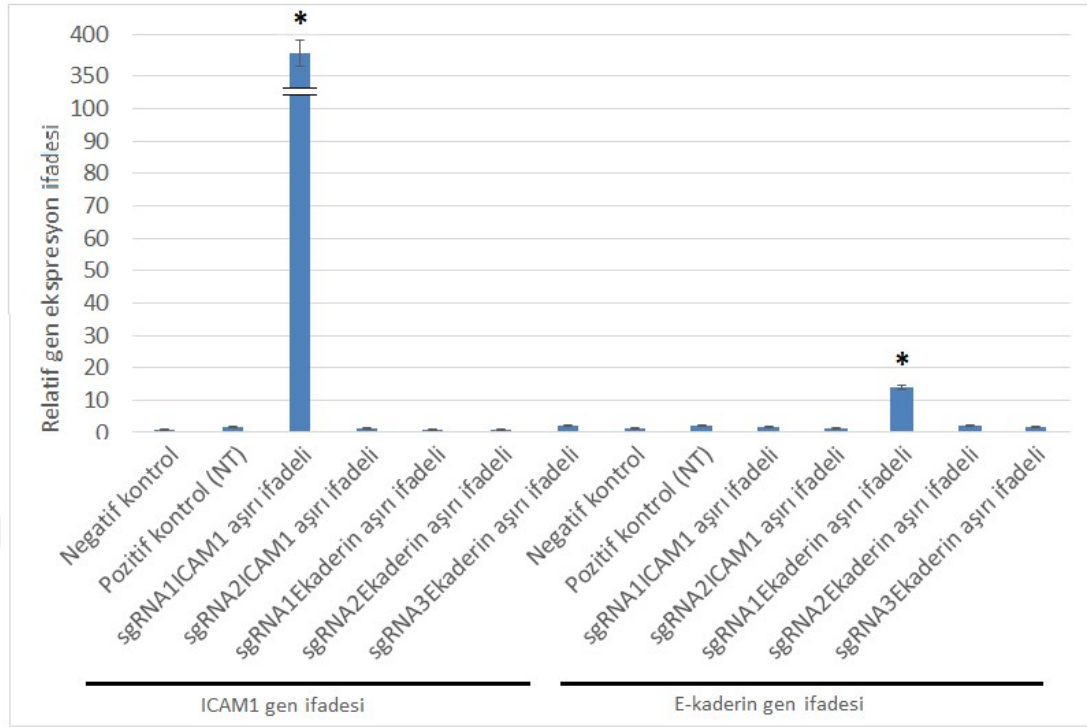
etkileşiminin olmadığını göstermektedir. Bu bulgular, farklı sgRNA dizilerinin hedef promotora bağlanma etkinliğinde büyük farklılıklar gösterebileceğini ve dolayısıyla gen aktivasyon potansiyellerinin de değişken olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, ICAM1sgRNA1 ve EkaderinsgRNA1 nükleotid dizilimleri bu bağlamda çalışmada en yüksek aktivasyon verimi sağlayan dizaynlar olmuştur.

Tablo 19. 67NR hücrelerinde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile ICAM1 geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçlarının gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.

Gruplar			Anlamlılık (<i>p</i>) değeri
Negatif kontrol grubuna göre	→	Pozitif kontrol (NT)	1,000
	→	sgRNA1ICAM1 aşırı ifadeli	,000
	→	sgRNA2ICAM1 aşırı ifadeli	1,000
	→	sgRNA1Ekaderin aşırı ifadeli	1,000
	→	sgRNA2Ekaderin aşırı ifadeli	1,000
	→	sgRNA3Ekaderin aşırı ifadeli	,994

Tablo 20. 67NR hücrelerinde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile E-kaderin geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçlarının gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.

Gruplar			Anlamlılık (<i>p</i>) değeri
Negatif kontrol grubuna göre	→	Pozitif kontrol (NT)	1,000
	→	sgRNA1ICAM1 aşırı ifadeli	1,000
	→	sgRNA2ICAM1 aşırı ifadeli	1,000
	→	sgRNA1Ekaderin aşırı ifadeli	,000
	→	sgRNA2Ekaderin aşırı ifadeli	0,034
	→	sgRNA3Ekaderin aşırı ifadeli	,010



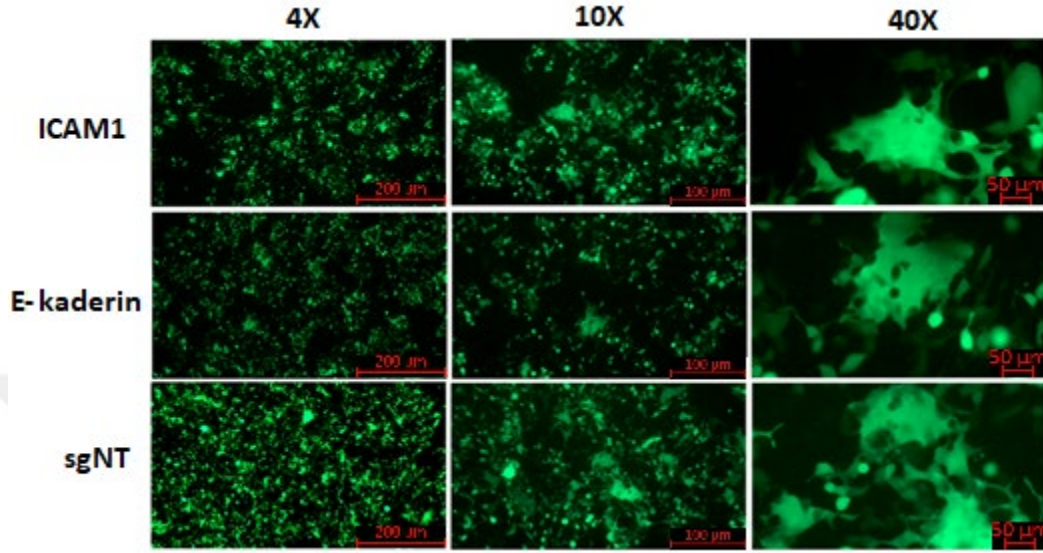
Şekil 33. 67NR hücrelerinde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile ICAM1 ve E-kaderin geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçları (ortalama $\pm$ SD, n=3). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (*p < 0.0001).

3.1.6. Lentiviral Transfeksiyon İçin İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı (HEK293T) Hücrelerinin Hazırlanması ve İlgili Plazmidlerin Transfeksiyonu

Lentiviral vektör üretimi amacıyla kültüre alınan HEK293T hücreleri, 32 saatlik inkübasyon süresi sonunda kültür yüzeyinde homojen bir yayılım göstererek %80–90 doluluk seviyesine ulaşmıştır. MUSE hücre analiz sistemi ile yapılan ölçümlerde hücre canlılık oranı %94’ün üzerinde belirlenmiş, bu da hücrelerin transfeksiyon için uygun fizyolojik durumda olduğunu göstermiştir.

EkaderinsgRNA1, ICAM1sgRNA1, sgNT ve dCas9puro plazmidleri ile yapılan transfeksiyon işlemleri sonrası elde edilen mikroskopik görüntülerde, HEK293T hücrelerinde yeşil floresan protein (GFP) sinyallerinin yaygın olarak gözlemlenmesi, transfeksiyonun yüksek başarıyla gerçekleştiğini doğrulamıştır. Lentiviral üretim süreci hem hücresel verimlilik hem de genetik aktarım etkinliği açısından başarılı olduğu gösterilmiştir (Şekil 34). Elde edilen lentiviral vektörlerin

sonraki deneysel uygulamalar için biyolojik olarak uygun nitelikte olduğunu ortaya konmuştur. Transfeksiyonun 48. saatinde kültür ortamlarından toplanan süpernatantlar değerlendirildiğinde, her grup için ortalama 48 ml viral partikül içeren süpernatant elde edilmiştir.



Şekil 34. Transfeksiyon işlemleri sonrası HEK293T hücrelerinde GFP sinyalleri.

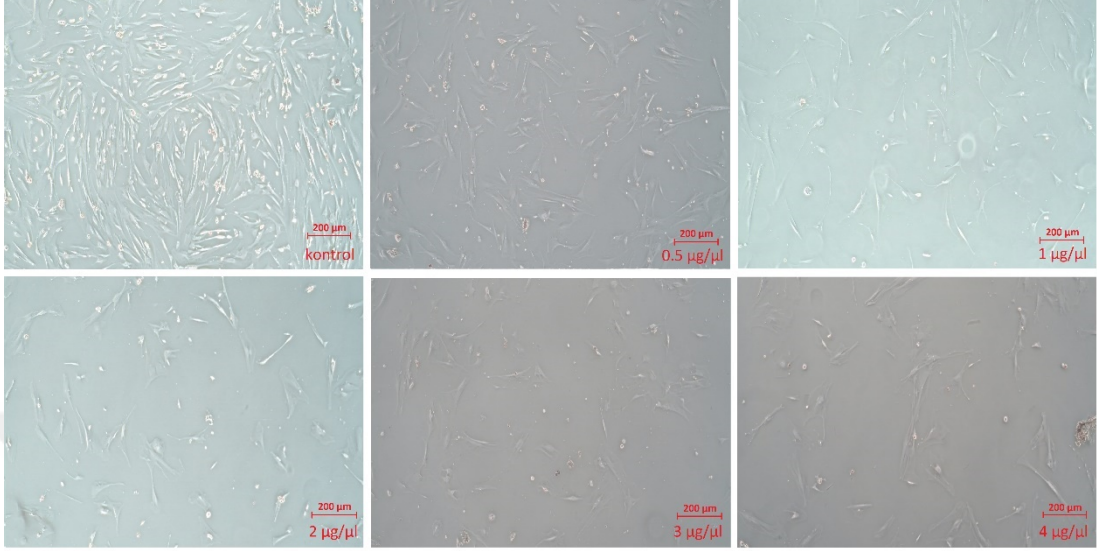
E-kaderin sgRNA1, ICAM1 sgRNA1, kontrol sgRNA (sgNT) ve dCas9-puro lentiviral stok çözeltilerinin titrelerinin belirlenmesi amacıyla RT-qPCR tabanlı kantitatif yöntem kullanılmıştır.

3.1.7. ADKH’lerde Optimal Puromisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Puromisin direnç geni bulunan dCas9puro plazmidinin transfekte edilmediği ADKH’lerde, puromisin aracılığıyla seçim sağlanabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylece, sonraki deneylerde puromisin konsantrasyonunun hücreler üzerindeki toksik etkisini en aza indirecek optimal doz belirlenmiştir.

Yapılan mikroskopik analizler sonucunda, kontrol grubundaki hücelere göre 0.5 µg/µl puromisin uygulanan hücre gruplarında canlılığın %30-50 oranında olduğu belirlenmiştir (Şekil 35). Bu doz, optimal düzeyde toksik ve seçici etkiyi sağlayan konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Diğer daha yüksek puromisin dozlarında (1–4 µg/µl), ADKH’lerinin çoğunluğunun 72 saat sonunda morfolojik bütünlüğünü kaybettiği ve yaygın hücre ölümü gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, ADKH’lerinde 0.5 µg/µl puromisin, sonraki lentiviral reverse

transdüksiyon deneylerinde puromisin seçilimi uygulamak için uygun ve güvenli bir konsantrasyon olarak belirlenmiştir.



Şekil 35. ADKH’lerde farklı puromisin konsantrasyonlarının 72 saatlik kültür sürecinde hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesine ait ters faz kontrast mikroskop görüntüleri (4X Büyütme).

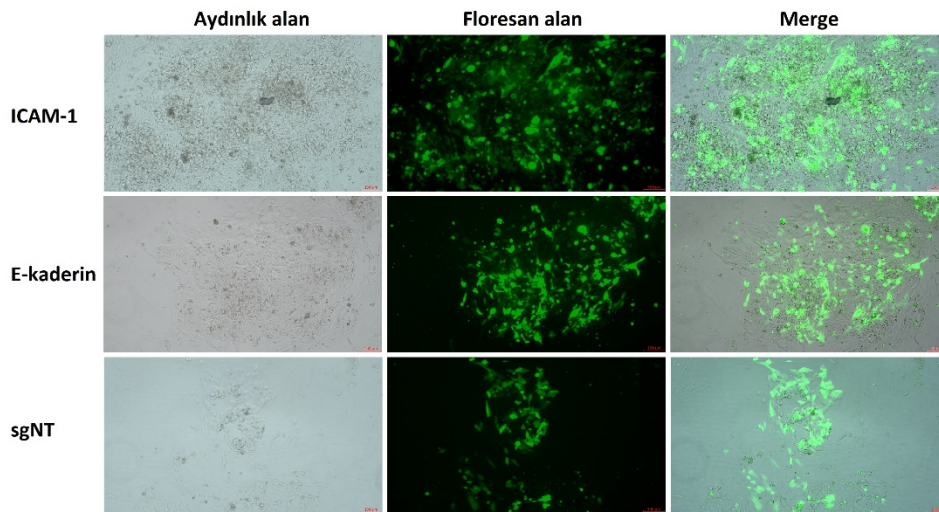
3.1.8. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin ADKH’lerde Lentiviral Reverse Transdüksiyon Yoluyla Aşırı İfadesi

Tablo 21’de tanımlanan beş ayrı grup için uygulanan protokoller doğrultusunda ADKH’lerin her bir lentiviral kombinasyona karşı hücresel yanıtları ve morfolojik bütünlükleri değerlendirilmiştir. E-kaderin ve ICAM-1 genlerinin ADKH’lere lentiviral sistem aracılığıyla aşırı ifadesine yönelik gerçekleştirilen reverse transdüksiyon uygulamaları başarıyla tamamlanmıştır.

Tablo 21. ADKH’lerde E-kaderin ve ICAM1 genlerinin aşırı ifade analizi çalışma grupları

Grup No	Grup Tanımı
1. Grup	Sadece antibiyotiksiz hücre kültür ortamında üretilen ADKH (negatif kontrol grubu)
2. Grup	sgNT + dCas9puro lentiviral reverse transdüksiyonu uygulanan pozitif kontrol / sham grubu
3. Grup	ICAM1sgRNA1 + dCas9puro lentiviral reverse transdüksiyonu uygulanan ICAM1 aşırı ifade grubu
4. Grup	EkaderinsgRNA1 + dCas9puro lentiviral reverse transdüksiyonu uygulanan E-kaderin aşırı ifade grubu
5. Grup	ICAM1sgRNA1 + EkaderinsgRNA1 + dCas9puro lentiviral reverse transdüksiyonu uygulanan ICAM1 + E-kaderin kombine aşırı ifade grubu

İnkübasyonu takiben, transdüksiyon gerçekleştirilen gruplarda (Grup 2–5), puromisin seleksiyonu amacıyla 0,5 µg/ml puromisin içeren α -MEM hücre kültür ortamı kullanılarak 72 saatlik seleksiyon süreci uygulanmıştır. Bu süreçte, her 24 saatte bir kültür ortamı yenilenerek ölü hücrelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Seleksiyon süreci sonunda, pozitif kontrol (sgNT + dCas9puro), ICAM-1 aşırı ifade (ICAM1sgRNA1 + dCas9puro), E-kaderin aşırı ifade (EkaderinsgRNA1 + dCas9puro) ve kombine aşırı ifade (ICAM1sgRNA1 + EkaderinsgRNA1 + dCas9puro) gruplarında kültür kabı yüzeyine tutunmuş canlı hücre popülasyonları elde edilmiştir. Seleksiyon yapılan gruplarda gözlemlenen morfolojik bütünlük, transdüksiyon işleminin ve puromisin seçiliminin, uygun koşullarda uygulandığında ADKH’lerinde tolere edilebilir olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 36).



Şekil 36. Lentiviral reverse transdüksiyon ile aşırı ifade edilen ADKH (10X Büyütme).

3.1.9. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı ifade Edildiği ADKH’lerde E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin İfade Seviyelerinin RT-qPCR Analizi

Bu çalışmada, ADKH’lerde CRISPR/dCas9 sistemine entegre edilmiş sgRNA’lar aracılığıyla ICAM1 ve E-kaderin genlerinin promotor bölgelerine bağlanarak transkripsiyonel aktivasyon yoluyla aşırı ifade edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, hazırlanan lentiviral stoklar kullanılarak beş farklı deney grubu oluşturulmuş ve her bir grupta enfeksiyon verimliliği (MOI/multiplicity of infection) değeri 1 olacak şekilde reverse transdüksiyon gerçekleştirilmiştir.

Negatif kontrol grubunda herhangi bir gen aktarımı yapılmamışken; pozitif kontrol grubu sgNT ve dCas9puro içeren lentiviral sistemle transdükte edilmiştir. Üçüncü grup ICAM1 genine özgü ICAM1sgRNA1 ve dCas9puro içeren lentiviral sistemle; dördüncü grup E-kaderin genine özgü EkaderinsgRNA1 ve dCas9puro içeren lentiviral sistemle ve beşinci grup ise her iki sgRNA’nın birlikte kullanıldığı ICAM1sgRNA1+EkaderinsgRNA1 ve dCas9puro içeren lentiviral sistemle transdükte edilmiştir. Transdüksiyon sonrası 0,5 µg/ml puromisin içeren α-MEM kültür ortamında 72 saat seleksiyon yapılmış ve çoğunluğu başarılı şekilde transdükte edilmiş hücrelerin sağ kalımı sağlanmıştır.

RT-qPCR analizleri sonucunda ICAM1 gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde; negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol (sgNT) grubunda ICAM1 ekspresyonu yaklaşık 1,5 kat anlamsız bir artış göstermiştir ($p>0.05$) (Tablo 22) (Şekil 37). ICAM1 genine özgü ICAM1sgRNA1 ve dCas9puro ile transdükte edilmiş grupta ise ICAM1 ekspresyonunda negatif kontrol grubuna göre 208 kata kadar anlamlı ($p<0.0001$) bir artış gözlenmiştir. E-kaderin genine özgü EkaderinsgRNA1 ve dCas9puro ile transdükte edilmiş grupta ICAM1 ekspresyonu, pozitif kontrole benzer şekilde yaklaşık 1,5 kat artış göstermiştir. Her iki sgRNA sisteminin birlikte kullanıldığı beşinci grupta ise ICAM1 ekspresyon düzeyi yaklaşık 122 kat olarak negatif kontrole göre anlamlı ($p<0.0001$) bir artış göstermiştir. Her iki geni aynı anda hedeflemenin hücrelerde sistemsel rekabete veya transkripsiyonel sınırlamaya bağlı olarak ICAM1 gen ekspresyon seviyesinde ılımlı bir düşüşe sebep olabileceğini düşündürmüştür.

Benzer şekilde E-kaderin gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde; negatif kontrol grubuna göre pozitif kontrol (sgNT) grubunda E-kaderin gen

ekspresyon seviyesi yaklaşık 1,2 kat artmıştır ($p>0.05$) (Tablo 23) (Şekil 37). ICAM1sgRNA1 ve dCas9puro ile transdükte edilmiş hücrelerde E-kaderin ekspresyonunda negatif kontrole göre yaklaşık 2 kat kadar anlamsız bir artış gözlenmiştir ($p>0.05$). Buna karşın, EkaderinsgRNA1 ve dCas9puro ile transdükte edilmiş hücrelerde bu artış yaklaşık 8 kata ulaşmıştır. Her iki sgRNA sisteminin birlikte kullanıldığı beşinci hücre grubunda ise E-kaderin gen ekspresyonu negatif kontrole göre yaklaşık 4,6 kat anlamlı ($p<0.0001$) bir artış göstermiştir.

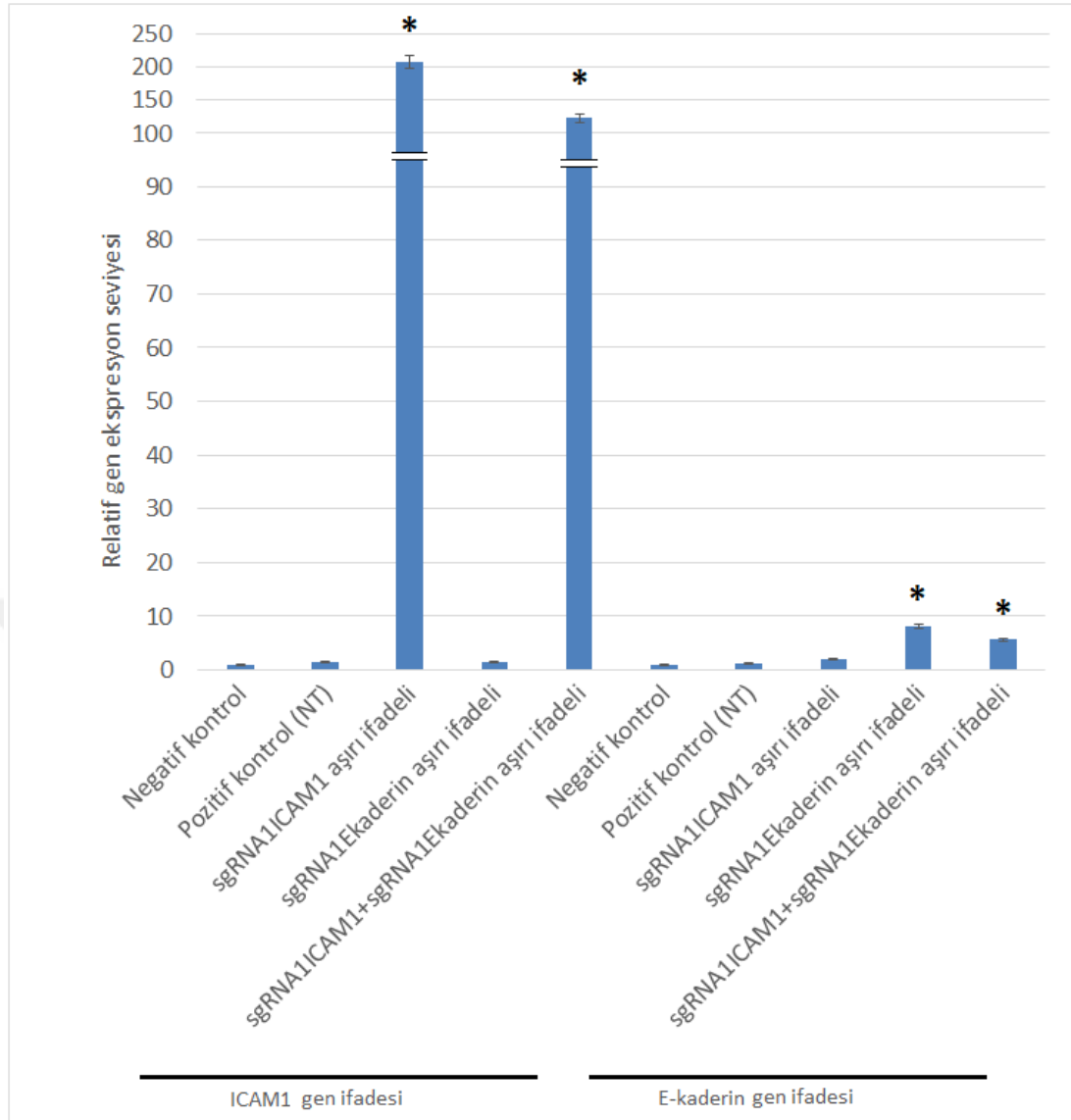
Sonuç olarak, her iki hedef gene yönelik olarak tasarlanan sgRNA'ların, CRISPR/dCas9 sistemine entegre edilerek ADKH'lerde etkili bir şekilde aşırı ifade edildiği ortaya koymuştur. ICAM1 genine özgü sgRNA1'in oldukça yüksek aktivasyon verimi gösterdiği, E-kaderin sgRNA1'in ise orta düzeyde bir ekspresyon artışı sağladığı belirlenmiştir.

Tablo 22. ADKH'lerde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile ICAM1 geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçlarının gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.

Gruplar			Anlamlılık (p) değeri
Negatif kontrol grubuna göre	→	Pozitif kontrol (NT)	,662
	→	sgRNA1ICAM1 aşırı ifadeli	,000
	→	sgRNA1Ekaderin aşırı ifadeli	,606
	→	sgRNA1ICAM1+sgRNA1Ekaderin aşırı ifade	,000

Tablo 23. ADKH'lerde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemi ile E-kaderin geninin aktivasyonuna yönelik RT-qPCR analiz sonuçlarının gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.

Gruplar			Anlamlılık (p) değeri
Negatif kontrol grubuna göre	→	Pozitif kontrol (NT)	,971
	→	sgRNA1ICAM1 aşırı ifadeli	,470
	→	sgRNA1Ekaderin aşırı ifadeli	,000
	→	sgRNA1ICAM1+sgRNA1Ekaderin aşırı ifade	,000



Şekil 37. ADKH’lerde CRISPR/dCas9-sgRNA sistemiyle gerçekleştirilen lentiviral reverse transdüksiyon sonrası ICAM1 ve E-kaderin genlerine ait kontrole göre orantılanmış mRNA ekspresyon düzeylerinin RT-qPCR ile analizi (ortalama $\pm$ SD, n=3). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (*p < 0.0001).

3.1.10. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH’lerin Ekildikleri Kültür Ortamındaki Adezyon ve Canlılık Deneyleri

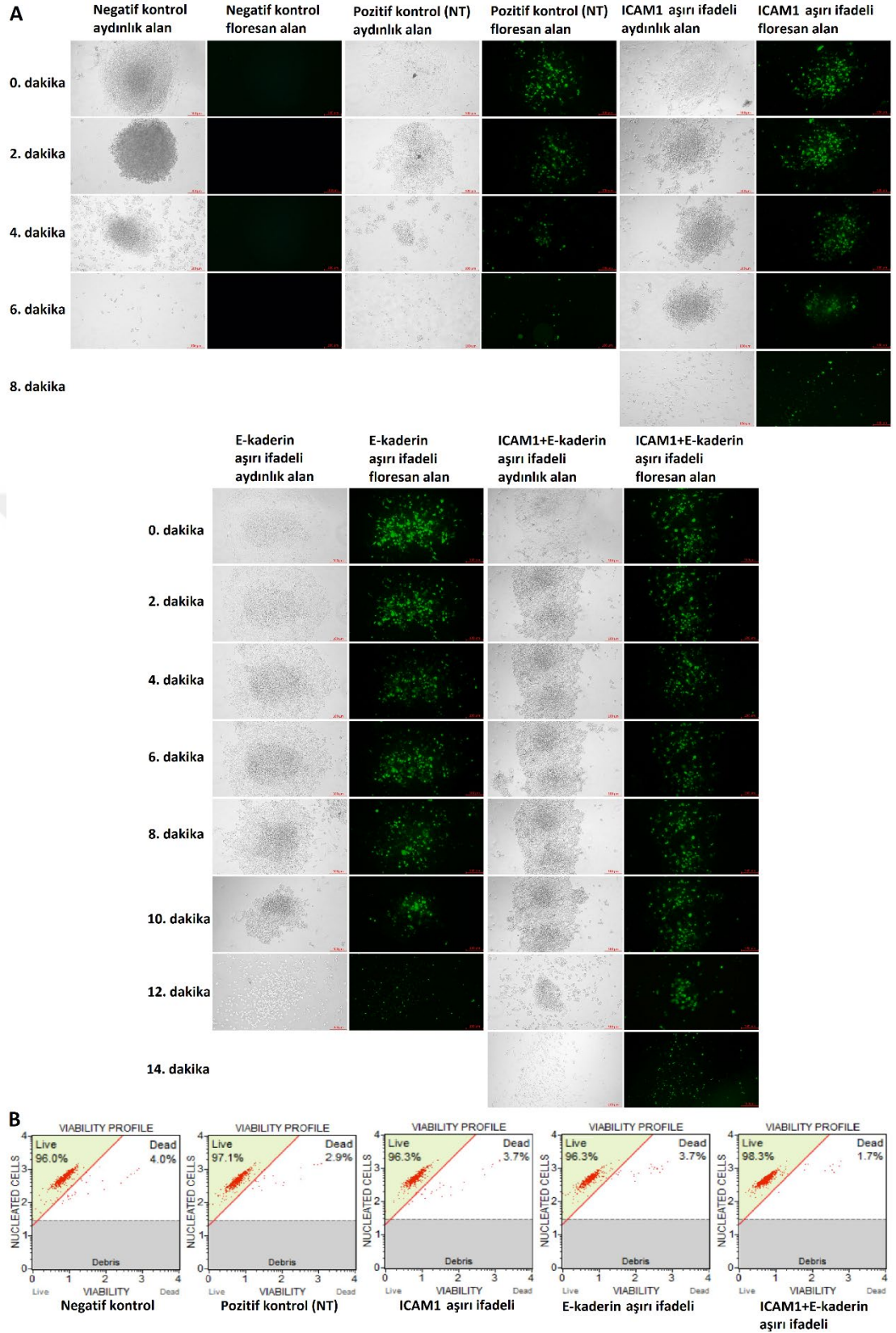
Bu çalışmada, ADKH yüzey tutunma özellikleri, çeşitli lentiviral gen aktarımı grupları arasında StemPro™ Accutase™ uygulaması sonrası zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir. Hücrelerin yuvarlaklaşarak yüzeyden ayrılmaya başlaması, yüzey adezyonlarının zayıfladığını gösteren önemli morfolojik bir göstergedir.

Negatif kontrol grubu olan gen aktarımı yapılmamış hücrelerde, 2. dakikadan itibaren belirgin yuvarlaklaşma gözlemlenmiştir (Şekil 38). Yüzeyden ayrılan hücrelerin yapılan canlılık analizi ile canlılık oranı %96 olarak bulunmuştur. NT pozitif kontrol grubu da benzer şekilde, genomu entegre olmayan, hedefsiz sgRNA içeren CRISPR/dCas9 sistemine maruz kalmış olmasına rağmen, yüzeyden ayrılma eğilimi açısından negatif kontrole benzer bir davranış sergilemiştir. Bu durum, lentiviral vektörün ya da GFP ekspresyonunun tek başına adezyon üzerine belirgin bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu gruba ait hücrelerin canlılık analizleri negatif kontrol grubu ile benzer olarak %97.1 olarak bulunmuştur. Buna karşın, ICAM1 aşırı ifade edilmiş hücreler ile E-kaderin aşırı ifade edilmiş hücreler, hem morfolojik bütünlüklerini daha uzun süre korumuş hem de 4. ve 6. dakikalarda bile büyük oranda yüzeye tutunma görünümündedir. Bu gruplarda yuvarlaklaşma daha geç başlamış, bazı hücreler ise 6. dakikada bile yayılmış formunu korumuştur. ICAM-1 aşırı ifade edilmiş hücreler, 8. dakikada belirgin biçimde yuvarlaklaşarak yüzeyden ayrılmıştır. E-kaderin aşırı ifade edilen hücreler ise 8. ve 10. dakikalarda büyük oranda yüzeye tutunmayı sürdürmüş, 12. dakikada ise yuvarlaklaşarak yüzeyden ayrılmışlardır. Negatif kontrol ve pozitif kontrol grubuna göre daha uzun sürede yüzeyden ayrılan ICAM-1, E-kaderin aşırı ifade hücreler uzun süre StemPro™ Accutase™ uygulamasına maruz kalmalarına rağmen canlılık oranları benzer şekilde %96.3 olarak bulunmuştur.

Bu bulgular, ICAM-1 ve E-kaderin genlerinin aşırı ifade ekspresyonunun hücre adezyonunu artırdığını ve yüzeyden ayrılmayı geciktirdiğini göstermektedir. ICAM-1 ve E-kaderin'in hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde rol alan adezyon molekülleri olduğu dikkate alındığında, elde edilen veriler literatürle de uyumludur.

ICAM-1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edildiği grup ise, en yüksek düzeyde yüzeye tutunma gösteren grup olarak öne çıkmıştır. Bu grupta, 6. dakikada hücrelerin büyük çoğunluğunun yüzeye tutunması devam etmiş ve morfolojik olarak yuvarlaklaşma minimal düzeyde kalmıştır. Bu durum 8. ve 10. dakikalarda da sürmüş, 12. dakikadan itibaren hücrelerin yuvarlaklaşarak yüzeyden ayrılmaları gözlemlenmiştir. Tüm hücrelerin yüzeyden ayrılması ise 14. dakikada tamamlanmıştır. En uzun süre StemPro™ Accutase™ uygulamasına maruz kalan ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edildiği grupta ise hücre canlılık oranı %98.3 olarak bulunmuştur.

Bu durum, ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edilmesinin adezyon kapasitesini sinerjistik olarak artırabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, GFP floresan görüntüleme, lentiviral gen aktarımının başarıyla gerçekleştiğini ve hücre popülasyonunun büyük bölümünde gen ekspresyonunun aktif olduğunu doğrulamaktadır. NT grubundaki GFP pozitifliği, gen aktarımının gerçekleştiğini; ancak spesifik bir hedefe yönelmediğini ortaya koymuştur. Bu sayede NT grup, vektörün ve transdüksiyon işleminin tek başına hücre davranışı üzerinde etkisi olmadığını göstermesi açısından anlamlı bir pozitif kontrol niteliğindedir. Sonuç olarak, ICAM1 ve E-kaderin'in ayrı ayrı aşırı ifadesi, ADKH'lerde yüzeye tutunmayı anlamlı şekilde artırmış ve yüzeyden ayrılmayı geciktirmiştir. Bu etkiler, iki genin (ICAM1 ve E-kaderin) birlikte aşırı ifadesi ile daha da belirginleşmiş, adezyon süresi en uzun olan hücre grubu olduğu gösterilmiştir. NT grup ile negatif kontrol grubunun benzer davranışlar sergilemesi, lentiviral vektör ve GFP ekspresyonunun adezyon üzerinde doğrudan bir etkisi olmadığını göstermiştir. Bu bulgular, adezyon moleküllerinin rejeneratif tıp, hücre taşıma, doku mühendisliği gibi alanlardaki uygulamalarında hücrelerin yüzeye tutunma kapasitelerinin genetik yollarla modüle edilebileceğini göstermektedir.

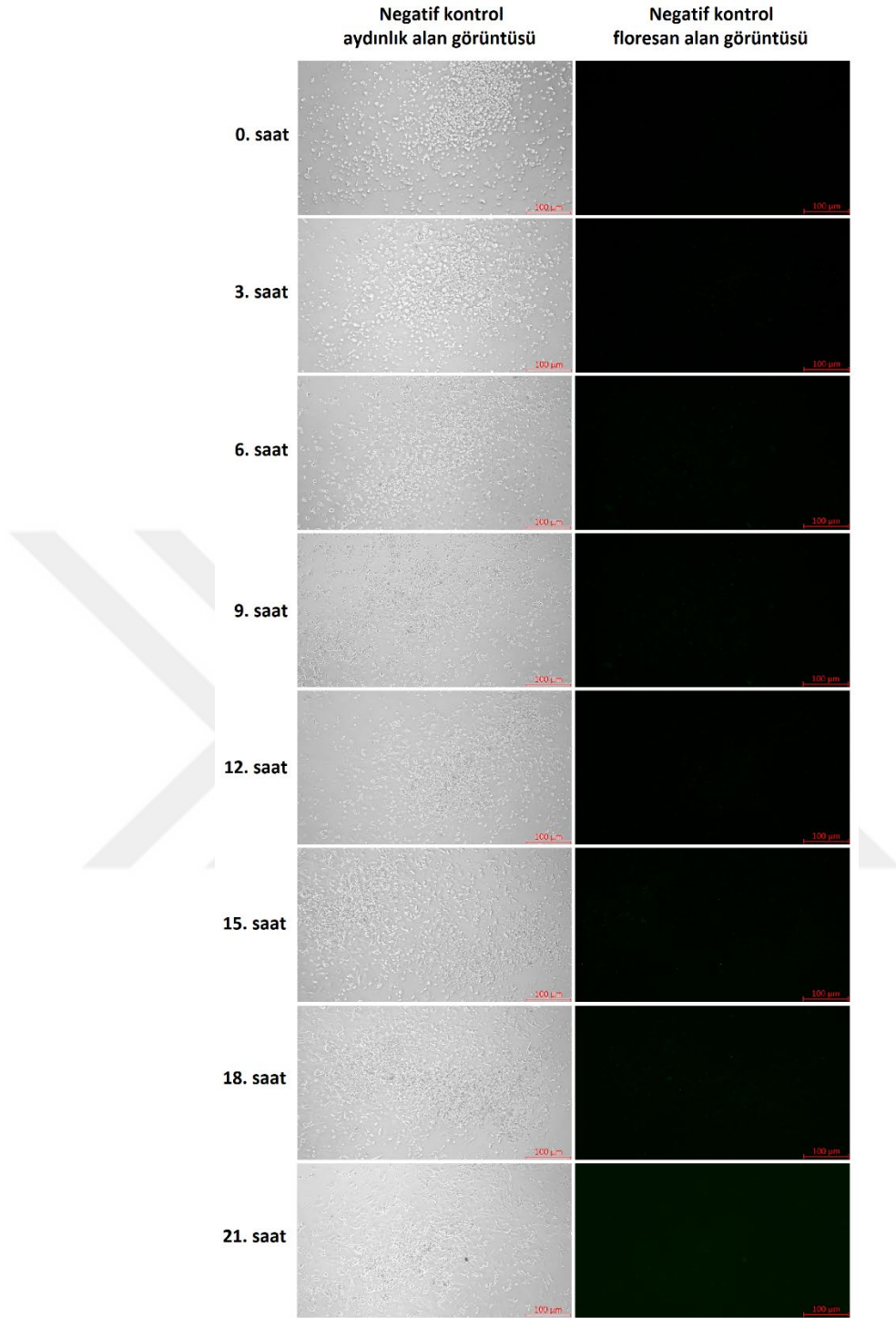


Şekil 38. ADKH'lerde farklı lentiviral gen aktarımı grupları (A) aydınlık alan ve GFP ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X Büyütme). (B) Uygulama sonunda her bir gruba ait canlılık değerlerinin analizi.

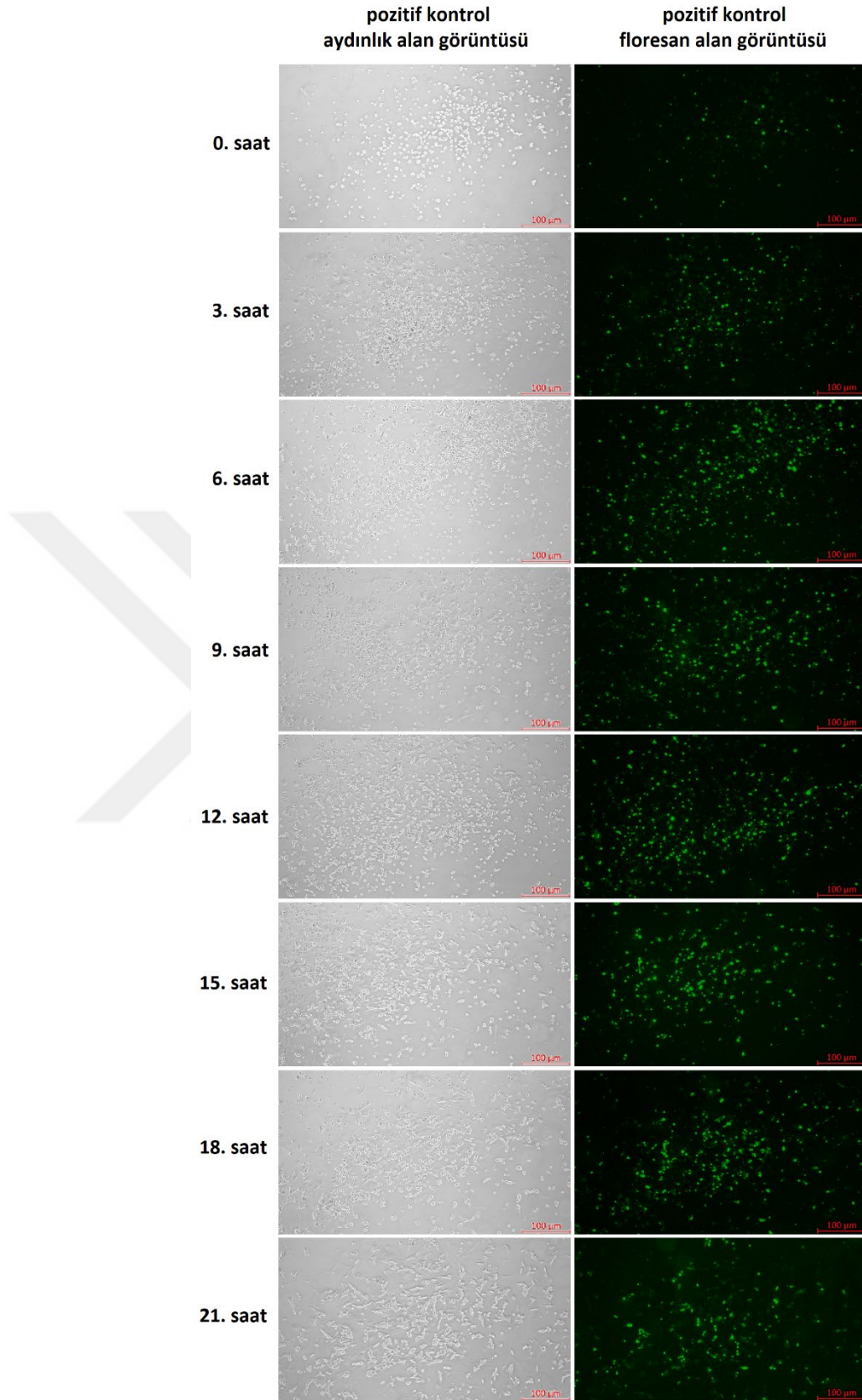
3.1.11. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği ADKH’lerde Tutunma Sürecinin Morfolojik Analizi

Bu deneyde, ADKH’lerde ICAM1 ve E-kaderin genlerinin aşırı ifadesi, hücrelerin yeniden yüzeye tutunma süreçlerine etkisini değerlendirmek amaçlandı. Bunun için hücrelerin yeni ekildikleri hücre kültür kaplarındaki gözlerde mikroskopik analizleri gerçekleştirildi.

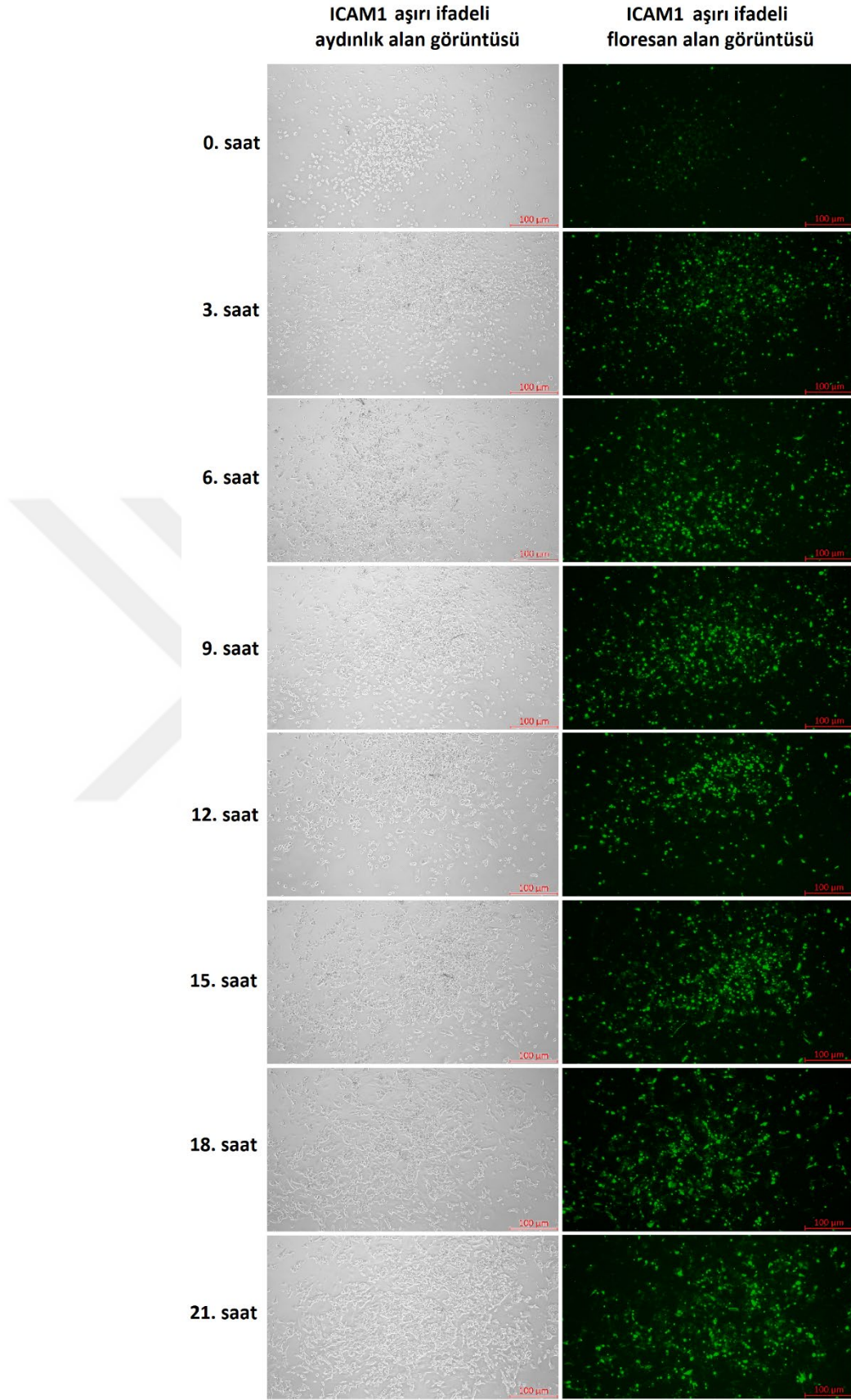
Yapılan analizler doğrultusunda negatif kontrol ve NT pozitif kontrol gruplarında, özellikle 3. ve 6. saat görüntülerinde, hücreler genellikle yuvarlaklaşmış, yayılma göstermemiş, bazı kuyucuklarda hücreler dağılmış olarak izlendi (Şekil 39,40). Bu durum, StemPro™ Accutase™ sonrası yüzeye yeniden tutunmanın daha geç gerçekleştiğini göstermektedir. ICAM1 (Şekil 41) ve E-kaderin (Şekil 42) aşırı ifade grubunda ise, 6. saatten itibaren belirgin şekilde daha fazla sayıda yayılmış, tutunmuş hücre olduğu gözlemlendi. 12. saat ve sonrasında ise hücre morfolojisinin daha tipik yayılmış hal aldığı görüldü. Bu durum, ilgili adezyon moleküllerinin yüzey tutunmasını hızlandırıcı etkisine işaret etmektedir. En dikkat çekici bulgu ise ICAM1 + E-kaderin (Şekil 43) birlikte aşırı ifadesi yapılan grup ile ilişkilidir. Bu grupta, 3. saatten itibaren bile önemli ölçüde tutunma ve yayılma gözlemlendi; 9. saatten sonra ise hücrelerin morfolojileri diğer gruplara kıyasla daha iyi organize olduğu, daha yaygın bir adezyon sergilediği belirlenmiştir. Bu durum, iki adezyon geninin birlikte ekspresyonunun sinerjistik etkisine işaret etmektedir. 21. saat analizinde, ICAM1, E-kaderin ve her iki genin birlikte aşırı ifade edildiği hücre gruplarında, negatif ve NT pozitif kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek hücre sayısı ve gelişmiş yüzey yayılımı olduğu gözlemlendi. Özellikle ICAM1 + E-kaderin genlerinin birlikte aşırı ifade olduğu grupta hücrelerin belirgin şekilde organize olduğu, geniş yüzeye yayıldığı ve yoğunluklarının yüksek olduğu görüldü. Bu bulgular, ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifadesinin hücre adezyonunu artırarak, yüzeye tutunmayı hızlandırdığı ve muhtemelen hücre proliferasyonunu da desteklediğini düşündürmektedir. Ayrıca, floresan görüntüler sayesinde GFP sinyali doğrultusunda gen aktarımının başarıyla gerçekleştiği görülmekte, NT grubunun da pozitif kontrol amacıyla anlamlı şekilde vektör içeriği taşıdığı ancak hedefe yönelik adezyon etkisi göstermediği teyit edilmektedir.



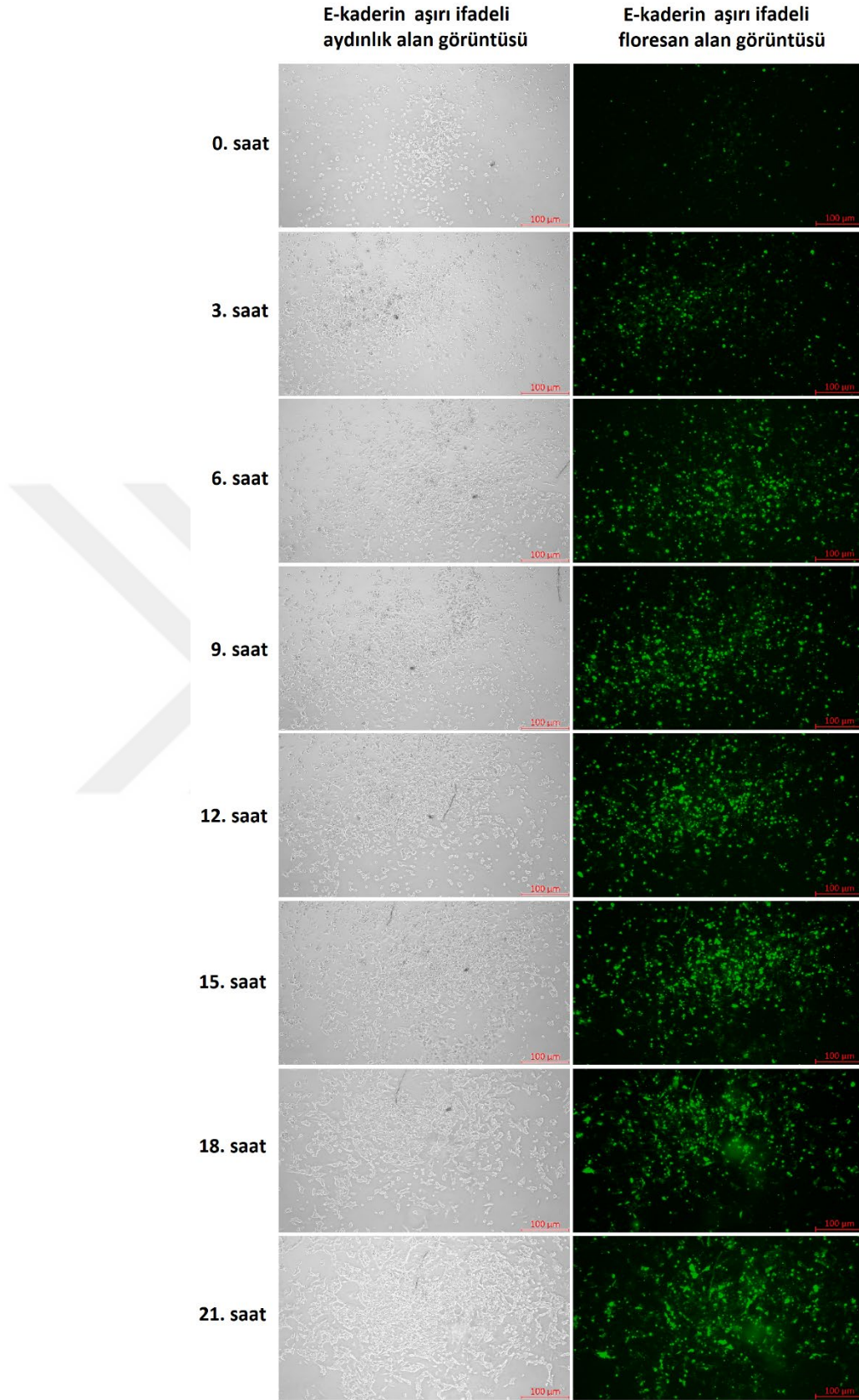
Şekil 39. ADKH’lerde negatif kontrol grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme).



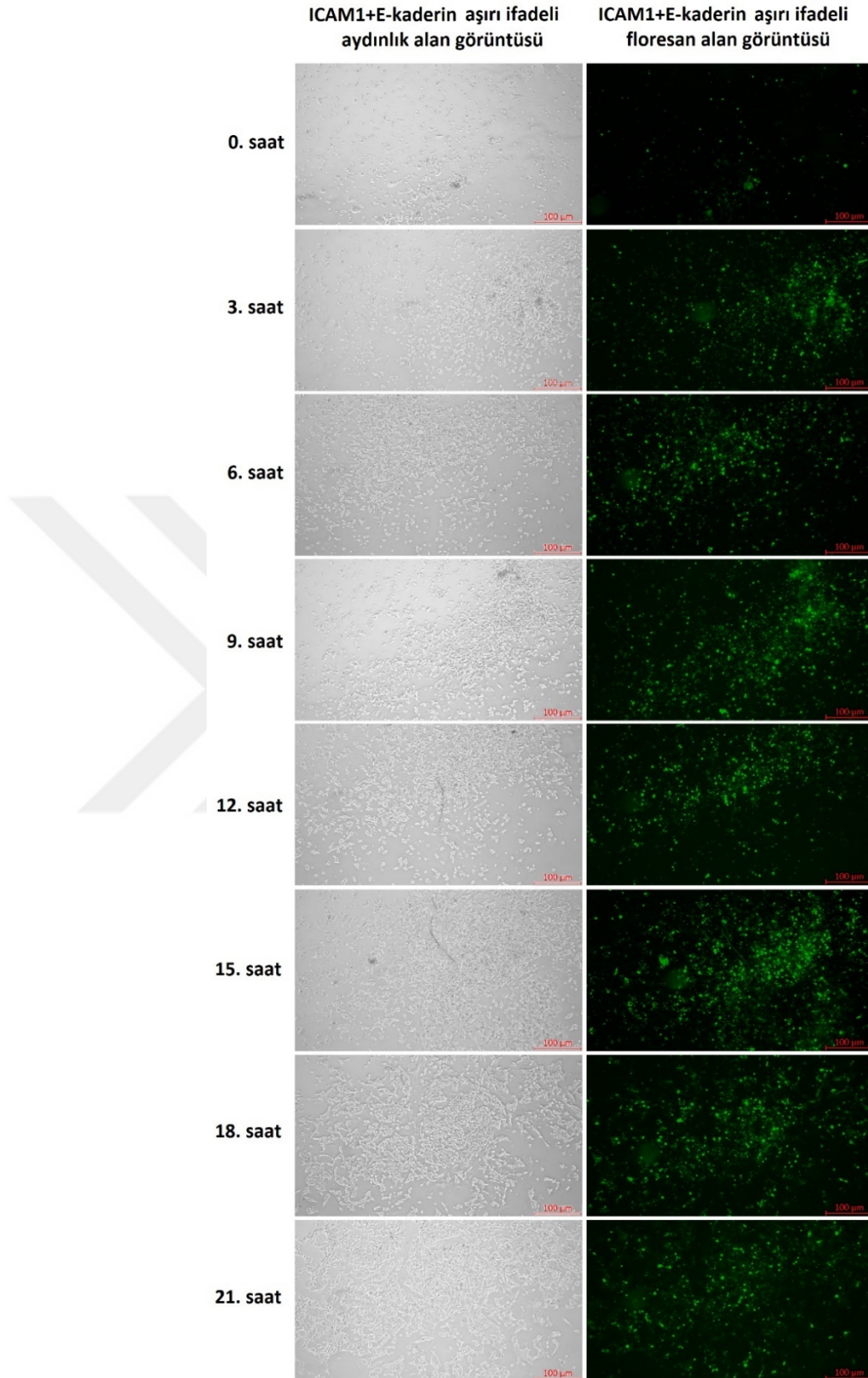
Şekil 40. ADKH’lerde NT pozitif kontrol grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).



Şekil 41. ADKH’lerde ICAM1 aşırı ifade grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme).



Şekil 42. ADKH’lerde E-kaderin aşırı ifade grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme).



Şekil 43. ADKH’lerde ICAM1+E-kaderin aşırı ifade grubunun, yüzey tutunma dinamiklerinin zamana bağlı ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme).

3.1.12. E-kaderin ve ICAM-1 Genlerinin Aşırı İfade Edildiği Adipoz Doku Kaynaklı Hücrelerin In Vitro Yara İyileşme Modelinde Etkinliğinin İncelenmesi

Şekil 44'de verilen yüzdesel yara kapanma verileri, genetik olarak modifiye edilmemiş ve edilmiş ADKH'lerin in vitro yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini göstermektedir. Çalışmada ICAM1 ve E-kaderin genlerinin ADKH'lerde aşırı ifade edilmesiyle, bu hücrelerin yara bölgesine tutunma ve kolektif hücre göçü kabiliyetlerinin artırılması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu yaklaşımın yara iyileşme kinetiği üzerinde anlamlı etkileri olduğunu göstermektedir.

En dikkat çekici bulgu, ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edildiği grubun, 24. saat itibarıyla %100 yara kapanması sağlamış ve bu fark istatistiksel olarak kontrollere göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Bu durum, her iki adezyon molekülünün sinerjistik etkisinin hücrelerin substrat ve komşu hücrelerle olan etkileşimini maksimum düzeyde artırarak, hücre göçünü ve organizasyonunu hızlandırdığını düşündürmektedir. E-kaderin, epitel hücreleri arasında homotipik bağlantıları sağlayarak kolektif hücre hareketine öncülük ederken, ICAM1 ise hücrelerin ECM ile temasını güçlendiren bir adezyon molekülü olarak bu süreci desteklemektedir. Dolayısıyla bu iki molekülün birlikte ekspresyonu hem hücreler arası koordinasyonu hem de substrata bağlı göç yeteneğini optimize etmiştir.

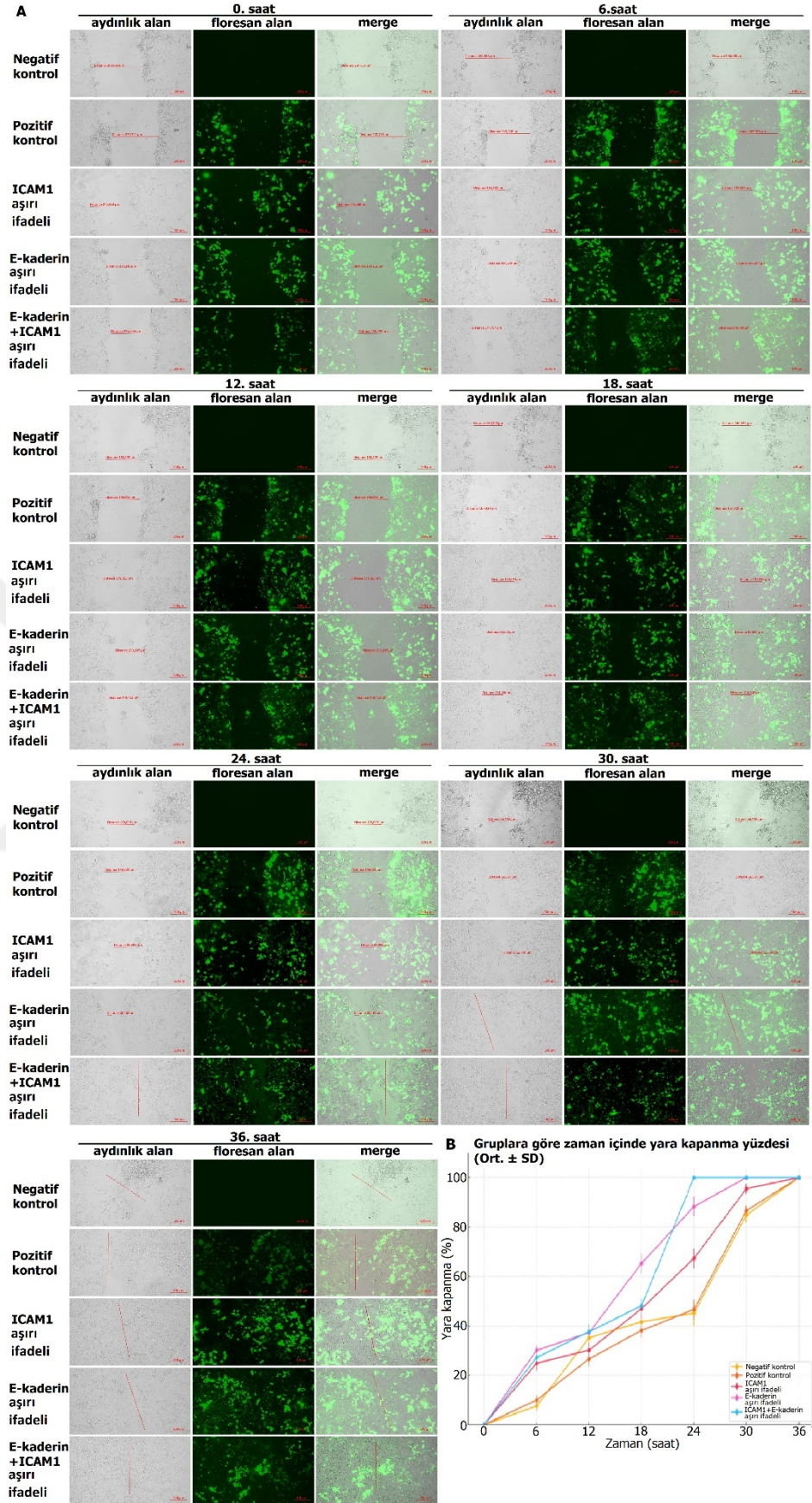
E-kaderin'in tek başına aşırı ifade edildiği grup da 30. saate kadar %100 yara kapanmasına ulaşmış ve bu fark istatistiksel olarak kontrollere göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Bu bulgu, epitel hücre göçünün kolektif doğasında E-kaderin'in merkezi bir role sahip olduğunu göstermektedir. E-kaderin aracılı hücre-hücre adezyonları, öncü hücrelerin yönlendirilmesi ve izleyen hücrelerin koordine hareketi açısından kritik öneme sahiptir. ICAM1'in tek başına aşırı ifade edildiği grup ise 30. saatte tam yara kapanma seviyesine yaklaşmışsa da tam kapanma 36. saate doğru gerçekleşmiştir. Bununla birlikte 30. saatte bu grubun yara kapanma seviyesi kontrollere göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu durum, ICAM1'in substrata tutunmayı ve hücre stabilitesini artırmasına rağmen, kolektif hücre göçü mekanizmasını E-kaderin kadar güçlü şekilde desteklemediğini düşündürmektedir.

Negatif ve pozitif kontrol gruplarında gözlenen yara kapanma süreci ise anlamlı şekilde daha yavaş seyretmiştir. Pozitif kontrol grubunda (lentiviral transdüksiyonlu ADKH), yara kapanma süreci negatif kontrol grubuna benzer bir

hızda ilerlemiş, her iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Bu gruplarda ADKH'lerde adezyon moleküllerinde genetik bir düzenleme yapılmamıştır. Pozitif kontrol grubunda lentiviral reverse transdüksiyonun etkisini gözlemlemek amacıyla kullanılan vektör kaynaklı yükün, yara kapanma hızına anlamlı bir katkı sağlamadığı görülmüştür. Bu bulgu, hücrelerin genetik modifikasyonun kendisi kadar, hedeflenen moleküler yolların modülasyonunun yara iyileşmesi üzerinde daha belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, bu bulgular ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifadesinin ADKH'lerinin yara mikroçevresiyle etkileşimini artırarak erken ve etkin bir hücresel migrasyon ve doku onarımı süreci başlattığını ortaya koymaktadır.





Şekil 44. ADKH gruplarının yara iyileşmesi sürecindeki etkilerini gösteren ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X Büyütme). (A) Her bir grup için

hücrelerin eklenmesini takiben 0, 6, 12, 18, 24, 30 ve 36.saat ters faz kontrast floresan mikroskop kullanılarak elde edilen görüntüler (10X Büyütme). **(B)** Farklı genetik modifikasyonlara sahip ADKH'lerinin ekildiği yara modeli gruplarında zaman içerisinde yara kapanma yüzdesi (ortalama $\pm$ SD, n=3).

3.1.13. Fare Yara Modeli Oluşturulması ve E-kaderin ve ICAM-1 İfade Seviyesi Artırılmış ADKH'lerin Oluşturulan Yara Bölgesine İmplantasyonu

İn vivo modelde uygulanan tam kat deri defekti protokolü, tüm hayvanlarda başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve deneysel gruplar arası karşılaştırmaya olanak sağlayacak şekilde homojen yara alanları oluşturulmuştur. 6 adet tam kat deri yarası oluşturulan erkek Albino BALB/c farelerinin 1. yara bölgesi herhangi bir tedavi uygulaması ya da ADKH implantasyonu yapılmadan bırakıldı. 2. yara bölgesine herhangi bir gen modifikasyonu uygulanmamış negatif kontrol ADKH'ler implante edildi. 3. yara bölgesine herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen sgRNA ve dCas9 kompleksinin viral transdüksiyon ile aktarıldığı sham ADKH'leri implante edildi. 4. yara bölgesine ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi, 5. yara bölgesine E-kaderin RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi ve 6. yara bölgesine ise ICAM1 ve E-Kaderin RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi ve böylece bir fare üzerinde 6 farklı yara grubu elde edilmiş oldu. Yara kontraksiyonunu önlemeye yönelik silikon simit uygulaması sayesinde, yara sınırları tüm zaman noktalarında stabil kalmış ve doğrudan reepitelizasyon süreçlerinin izlenebilmesine olanak sağlamıştır (Şekil 45).



Şekil 45. Fare sırtında oluşturulan yara modeline, ADKH'lerin uygulanması sonrası görünüm.

3.1.15. E-kaderin ve ICAM-1 İfade Seviyesi Artırılmış ADKH'lerin Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin Histolojik ve İmmunofloresan Olarak Değerlendirilmesi

E-kaderin ve ICAM-1 ifade seviye düzeyleri artırılmış ADKH'lerin, yara iyileşme süreci üzerindeki etkileri histolojik ve IF analizlerle değerlendirilmiştir. Bu adezyon moleküllerinin artışının, hücrelerin yara bölgesine tutunma kapasitesi ve doku onarımına katkısı; epitelizasyon, inflamatuvar yanıt ve rejeneratif etkileri kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

3.1.15.1. Hematoksilen-Eozin Boyama ile Elde Edilen Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Hematoksilen-Eozin boyama analizleri sonucunda yara bölgesinde oluşan doku katmanları ve epitelizasyon seviyesi zaman içerisinde belirgin değişiklik göstermiştir (Şekil 46).

3. gün sonundaki incelemelerde, “Sadece yara” grubunda yara alanında inflamatuvar hücre infiltrasyonu belirgin olup, epitel dokunun yeniden yapılanmasına dair herhangi bir belirtiye rastlanmamıştır. Yara bölgesi genellikle fibrinöz eksüda ve hücresel debris ile dolu olup, dermal yapı henüz organize olmamıştır. Negatif kontrol ve sham gruplarında dermis yapısının daha organize hale geldiği, epidermisin ise stratum spinosum seviyesine kadar geliştiği ve buna bağlı olarak epidermis tabakasının sadece yara grubuna göre anlamlı (Tablo 24) bir şekilde kapanmaya başladığı belirlenmiştir. Bu dönemde ADKH uygulanmış gruplarda ise özellikle ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifade edilen gruplarda daha homojen granülasyon dokusu izlenmiş, epidermisin stratum spinosum seviyesine kadar geliştiği ve buna bağlı olarak epidermis tabakasının sadece yara grubuna göre anlamlı ($p<0.0001$) bir şekilde kapanmaya başladığı belirlenmiştir. Ayrıca, ICAM1 ve/veya E-kaderin aşırı ifade edilen ADKH gruplarında ise, epidermal yeniden yapılanma daha ileri düzeyde olup, epidermisin stratum spinosum seviyesine kadar geliştiği ve buna bağlı olarak epidermis tabakasının sadece yara grubuna göre anlamlı ($p<0.0001$) bir şekilde kapanmaya başladığı belirlenmiştir. Aynı zamanda dermal komponentlerde yoğun fibroblast aktivitesi ve kolajen liflerinin daha düzgün dizildiği bir stromal yapı dikkat çekmektedir. Bu bulgular, epitelizasyonun hızlandığını ve dokular arası organizasyonun güçlendiğini göstermektedir.

7. gün değerlendirmelerinde, neredeyse tüm gruplarda dermis ve epidermisin üç ana katmanı (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) belirgin Şekilde oluşmuştur. “Sadece yara” grubunda bu katmanlar yeni oluşmaya baŐlamıŐken, ADKH uygulanan gruplarda bu yapıların daha kalın ve düzenli olduğu gözlenmiŐ olup epidermal tabaka “Sadece yara” grubuna göre anlamlı bir Şekilde kapanmıştır (Tablo 25). Özellikle E-kaderin ve ICAM1+E-kaderin aşırı ifade gruplarda epidermal katmanlar düzgün bir Şekilde organize olmuş, epidermal-dermal bileŐke net bir biçimde ayrıŐmıŐtır. Dermiste ise kolajen liflerinin daha yoğun ve paralel dizili olduğu stromal yeniden yapılanma gzlemlenmiŐtır.

15. gün sonunda, histolojik olarak yara bölgesinin olgunlaşma fazına geçtiği gzlemlenmiŐtır. “Sadece yara” grubunda 15. gün ile karŐılaŐtırıldıęında, epidermis ve dermisin tamamlanmış olduğu, ancak epidermal katmanların daha düzensiz olduğu grlmŐtır. ADKH uygulanan tüm gruplarda ise epidermal tabakaların kalınlığı korunmuŐ ve stratum corneum dahil olmak üzere olgun bir epidermal yapı izlenmiş ve 15. günde de epidermis tabakası tam kapanmayan “Sadece yara” grubuna göre anlamlı bir farklılık belirlenmiŐtır (Tablo 26). Dermis bölgesinde ise fibroblast aktivitesi azalmıŐ, olgun kolajen lifleri daha organize bir yapı kazanmıştır. ICAM1 ve E-kaderin’in birlikte aşırı ifade edildiği grupta ise epidermis ve dermisin en düzgün ve en matür formda olduğu belirlenmiŐtır.

21. gün sonu analizlerinde yara bölgesindeki doku organizasyonu olgunlaşma fazına girmiŐtır. “Sadece yara” grubunda epidermis tabakalarının (stratum basale, stratum spinosum ve stratum granulosum) tamamen oluştuğu ancak bu katmanların düzensiz ve daha ince olduğu grlmŐtır. Dermis bölgesinde ise yer yer düzensiz kolajen lifleri ve kısmi fibroblast yoğunluğu mevcuttur; bu durum iyileşmenin tamamlanmakta olduğunu ancak bazı bölgelerde hala yeniden yapılanmanın sürdüğünü göstermektedir. 21. gün sonunda gruplar arasında epidermis tabakasının kapanma durumu bakımından anlamlı bir farklılık belirlenmemiŐtır (Tablo 27).

Buna karşın, negatif kontrol ve sham gruplarında epidermis daha düzenli ve kalın bir yapı sergilemiş, stratum corneum dahil olmak üzere tüm epidermal katmanlar ayırt edilebilir hle gelmiŐtır. Dermis ise daha yoğun organize kolajen yapısıyla desteklenmiŐ, fibroblast sayısı azalmıŐ ve stromal yapı matür form kazanmıştır. ICAM1 aşırı ifade grubunda epidermal yapı oldukça düzenli, tüm katmanlarıyla seçilebilen ve özellikle dermal–epidermal birleŐimin net olduğu bir görünüm

kazanmıştır. Dermisteki bağ dokusu elemanları daha kompakt ve paralel dizilimlidir. E-kaderin aşırı ifade grubunda ise epitelizasyonun en üst düzeye ulaştığı, epidermisin kalın ve düzenli katmanlardan oluştuğu, stratum corneum'un keratinize olduğu izlenmiştir. Bu grupta dermal olgunlaşma da oldukça ileri seviyededir; fibroblast aktivitesi minimal, kolajen lifleri ise iyi organize olmuştur.

ICAM1 + E-kaderin aşırı ifade grubunda ise yara bölgesinin hem epidermis hem de dermis açısından en olgun doku mimarisine ulaştığı gözlemlenmiştir. Epidermis; kalın, düzgün ve tüm katmanları (stratum basale, spinosum, granulosum, lucidum ve corneum) ile tam olarak yapılandırılmıştır. Dermis ise yoğun kolajen içeriği, düşük hücresellik ve paralel lif düzeniyle tam bir yeniden yapılanma görüntüsü sunmuştur. Bu grup, histolojik olarak doku stabilizasyonunun ve iyileşmenin en üst düzeyde olduğu grup olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 24. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyaması ile zamana bağlı elde edilen 3. güne ait epitelial tabaka kapanma verilerinin gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.

Gruplar			Anlamlılık (p) değeri
Sadece yara grubuna göre	→	Negatif kontrol	,030
	→	Sham	,050
	→	ICAM1 aşırı ifade	,000
	→	E-kaderin aşırı ifade	,000
	→	ICAM1+E-kaderin aşırı ifade	,000

Tablo 25. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyaması ile zamana bağlı elde edilen 7. güne ait epitelial tabaka kapanma verilerinin gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.

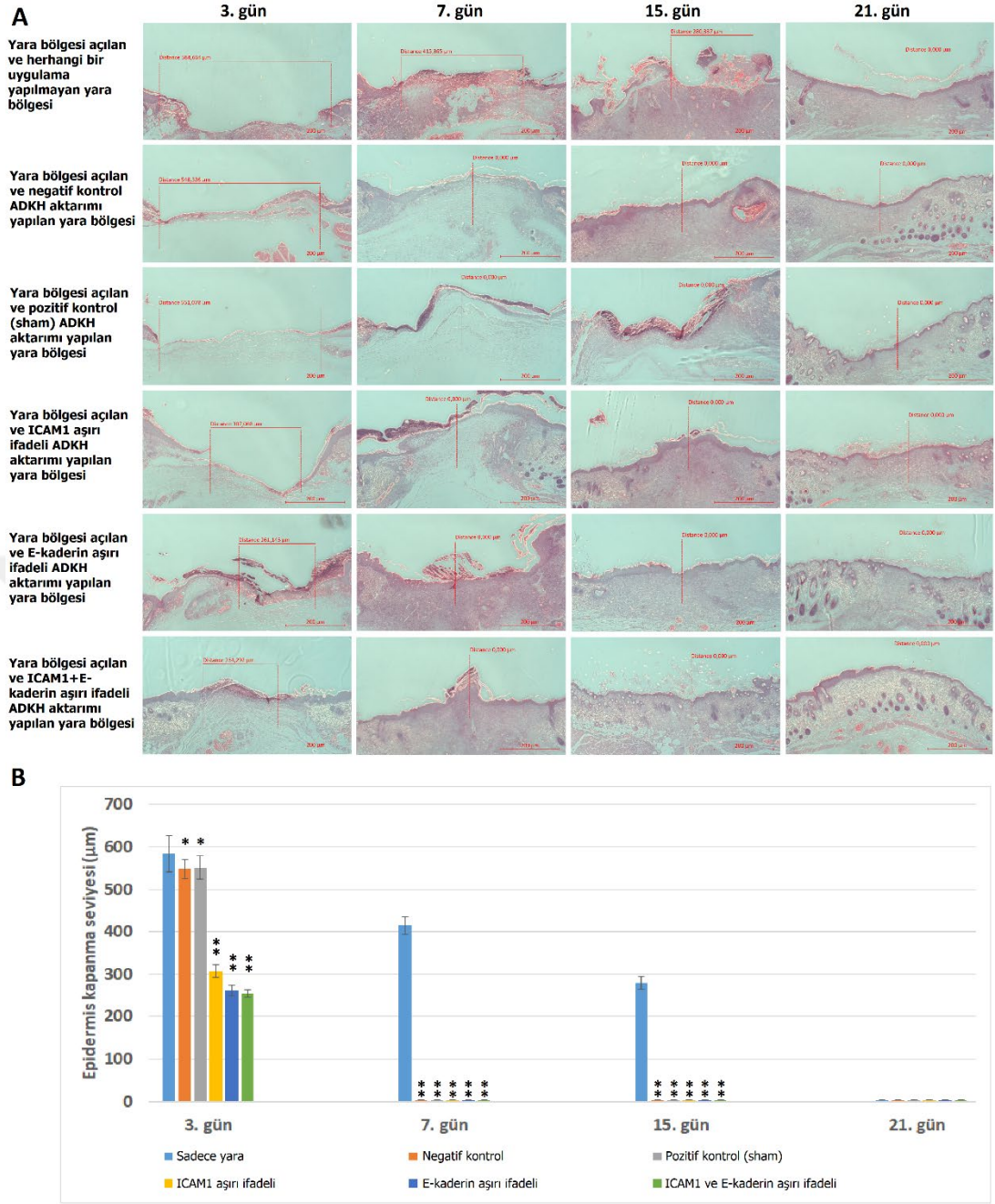
Gruplar			Anlamlılık (p) değeri
Sadece yara grubuna göre	→	Negatif kontrol	,000
	→	Sham	,000
	→	ICAM1 aşırı ifade	,000
	→	E-kaderin aşırı ifade	,000
	→	ICAM1+E-kaderin aşırı ifade	,000

Tablo 26. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyaması ile zamana bağlı elde edilen 15. güne ait epitelial tabaka kapanma verilerinin gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.

Gruplar			Anlamlılık (<i>p</i>) değeri
Sadece yara grubuna göre	→	Negatif kontrol	,000
	→	Sham	,000
	→	ICAM1 aşırı ifade	,000
	→	E-kaderin aşırı ifade	,000
	→	ICAM1+E-kaderin aşırı ifade	,000

Tablo 27. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyaması ile zamana bağlı elde edilen 21. güne ait epitelial tabaka kapanma verilerinin gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeleri.

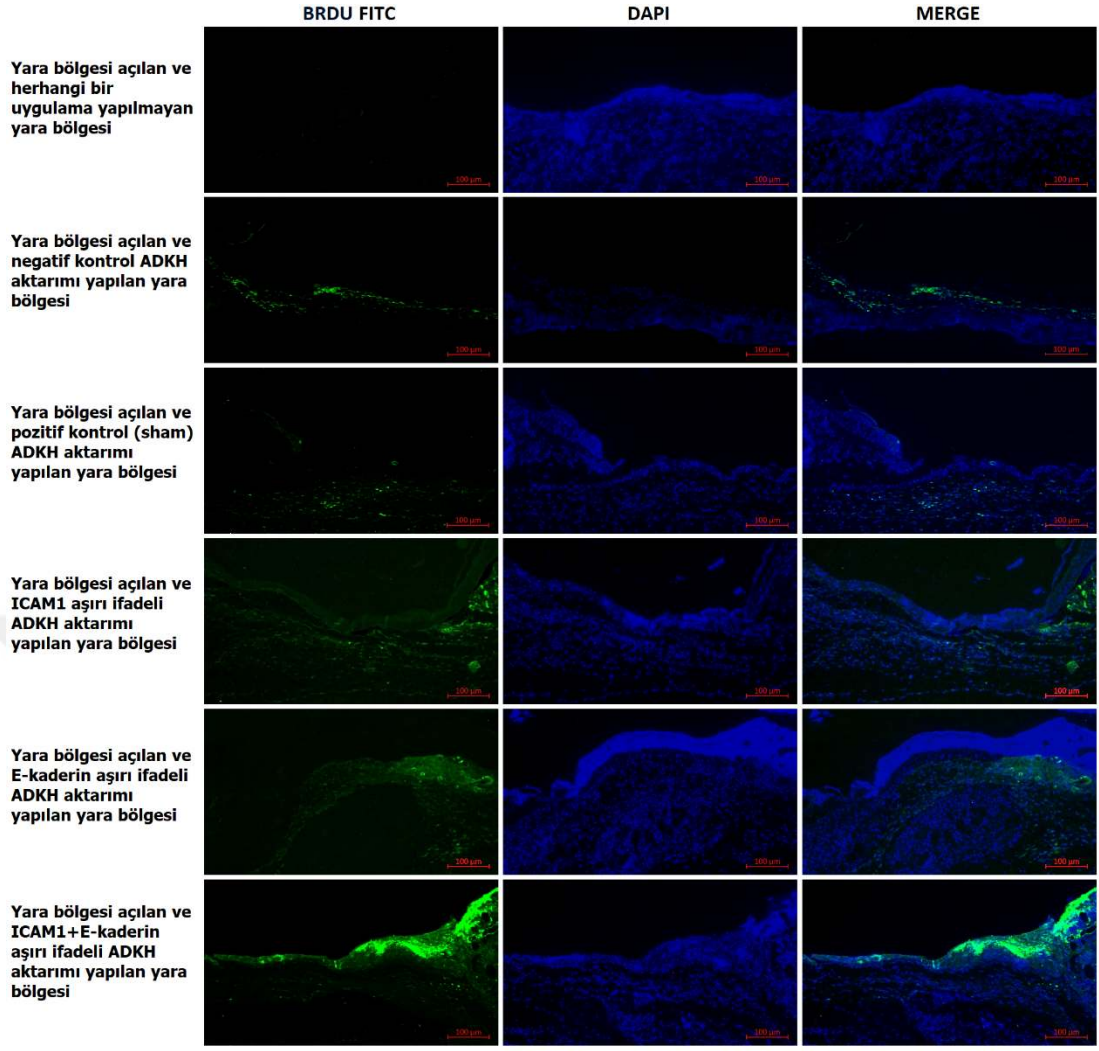
Gruplar			Anlamlılık (<i>p</i>) değeri
Sadece yara grubuna göre	→	Negatif kontrol	1,000
	→	Sham	1,000
	→	ICAM1 aşırı ifade	1,000
	→	E-kaderin aşırı ifade	1,000
	→	ICAM1+E-kaderin aşırı ifade	1,000



Şekil 46. Genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin implante edildiği in vivo yara bölgelerindeki H&E boyama görüntüleri ve epiteliyal kapanmanın zamana bağlı değerlendirilmesi. (A) H&E boyama sonrası 4x büyütmede elde edilen ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri. (B) Zaman serisine dayalı grafik, epiteliyal kapanma seviyelerinin mikrometre cinsinden kantitatif analizi (ortalama $\pm$ SD, n=3). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, sadece yara açılan kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (*p < 0.05; **p < 0.0001).

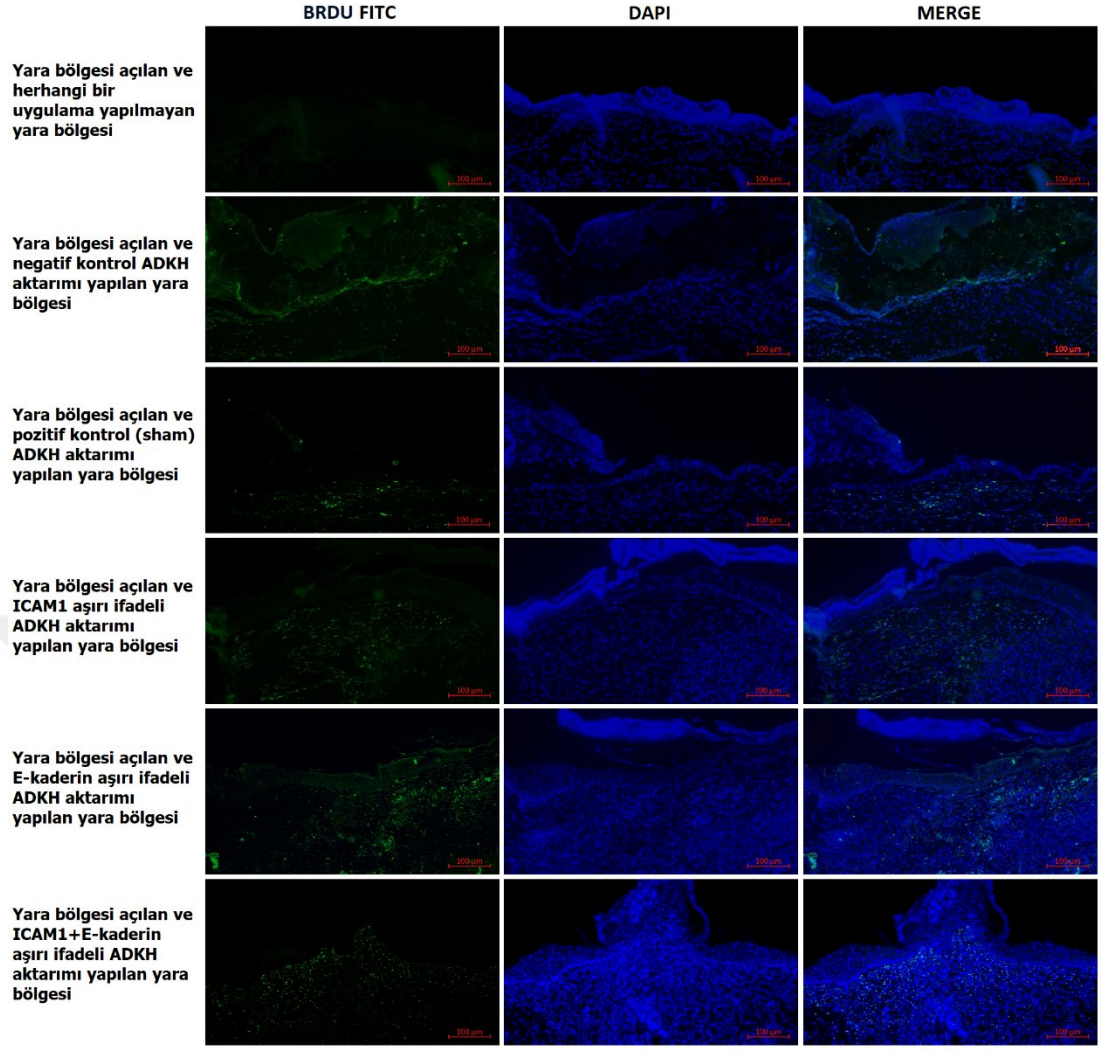
3.1.15.2. Fare Yara Bölgelerine İmplant Edilen BrdU İşaretli ADKH'lerin Zaman Serisine Dayalı Değerlendirmesi

Yara bölgelerine implante edilen negatif kontrol, sham, ICAM1 aşırı ifade, E-kaderin aşırı ifade, ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin yara bölgesindeki yerleşimlerinin belirlenmesi amacıyla fareler üzerinde oluşturulan tam kat yara bölgelerine implante edilmeden önce BrdU ile işaretlenmişlerdir. Bu sayede, implante edilen ADKH'lerin yara bölgesindeki zamana bağlı yerleşim değişimleri başarılı bir şekilde gözlemlenmiştir. BrdU işaretli ADKH'lerin yara bölgesine implantından 3 gün sonra yapılan IF analizlerinde, herhangi bir uygulama yapılmayıp sadece yara açılan grup haricinde diğer tüm gruplarda BrdU-pozitif ADKH'ler yeni oluşan dermal tabakada tespit edilmiştir. Bununla birlikte, BrdU-pozitif ADKH sayısının genetik modifikasyona uğratılmış, özellikle ICAM1 ve E-kaderin genleri birlikte aşırı ifade olan gruplarda daha fazla sayıda oldukları Şekil 47'de görüldüğü üzere anlaşılmaktadır.



Şekil 47. 3. gün sonunda yara bölgesindeki BrdU işaretli ADKH'lere ait IF görüntüleri (10X büyütme).

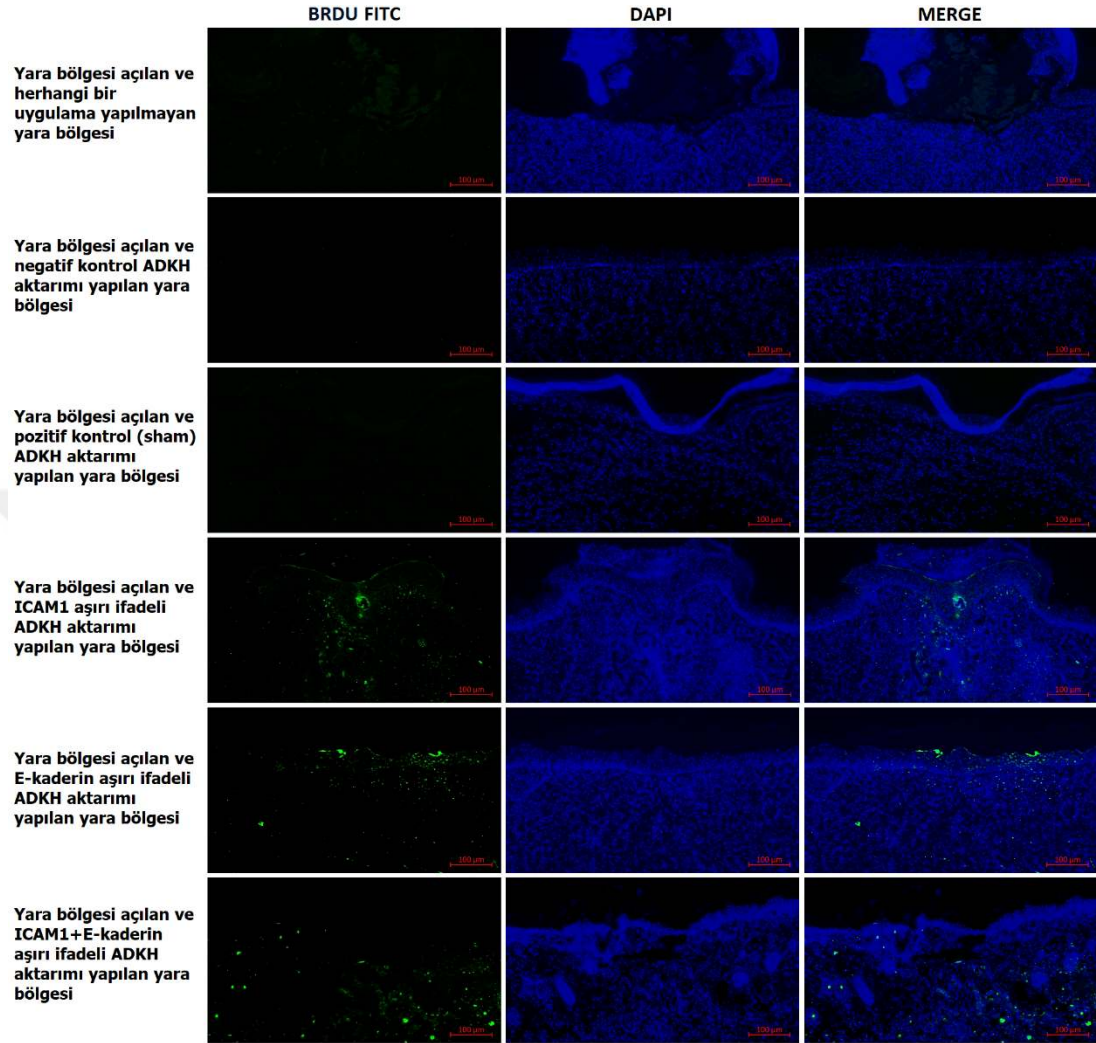
BrdU işaretli ADKH'lerin yara bölgesine implantından 7 gün sonra yapılan IF analizlerinde, negatif kontrol, sham, ICAM1 aşırı ifade, E-kaderin aşırı ifade, ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerinin verildiği grupların hepsinde BrdU-pozitif ADKH varlığı hem dermal hem de epidermis tabakasında tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 3. gün analizlerinde olduğu gibi 7. gün analizlerinde de BrdU-pozitif ADKH sayısının genetik modifikasyona uğratılmış, özellikle ICAM1 ve E-kaderin genleri birlikte aşırı ifade olan gruplarda daha fazla sayıda oldukları Şekil 48'de görülmektedir.



Şekil 48. 7. günde fare yara bölgelerine implante edilen ADKH'lerin farklı gruplardaki zamana bağlı BrdU-pozitifliklerinin değerlendirilmesi (10X büyütme).

BrdU işaretli ADKH'lerin yara bölgesine implantasyonundan 15 gün sonra yapılan IF analizlerinde, Şekil 49'da görüldüğü üzere negatif kontrol ve sham ADKH'lerinin verildiği yara bölgelerinde herhangi bir BrdU-pozitif ADKH varlığı hem dermal hem de epidermis tabakasında tespit edilememiştir. Bununla birlikte, ICAM1 aşırı ifade, E-kaderin aşırı ifade, ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerinin verildiği yara bölgelerinin hepsinde BrdU-pozitif ADKH varlığı hem dermal hem de epidermis tabakasında tespit edilmiştir. Özellikle ICAM-1 ve E-kaderin aşırı ifade edilen ADKH'lerin uygulandığı yara bölgelerinde, bu hücrelerin başlangıçta sahip oldukları yüksek tutunma yeteneklerine bağlı olarak yara iyileşmesinin hızlandığı ve 15. günde yeni yağ bezlerinin oluşmaya başladığı, H&E boyamalarıyla açıkça gözlemlenmiştir. İlginç bir bulgu olarak, bu yeni oluşan yağ bezlerinde BrdU-pozitif hücrelerin varlığı da tespit edilmiştir. Bu durum, bazı ADKH'lerin yağ bezi

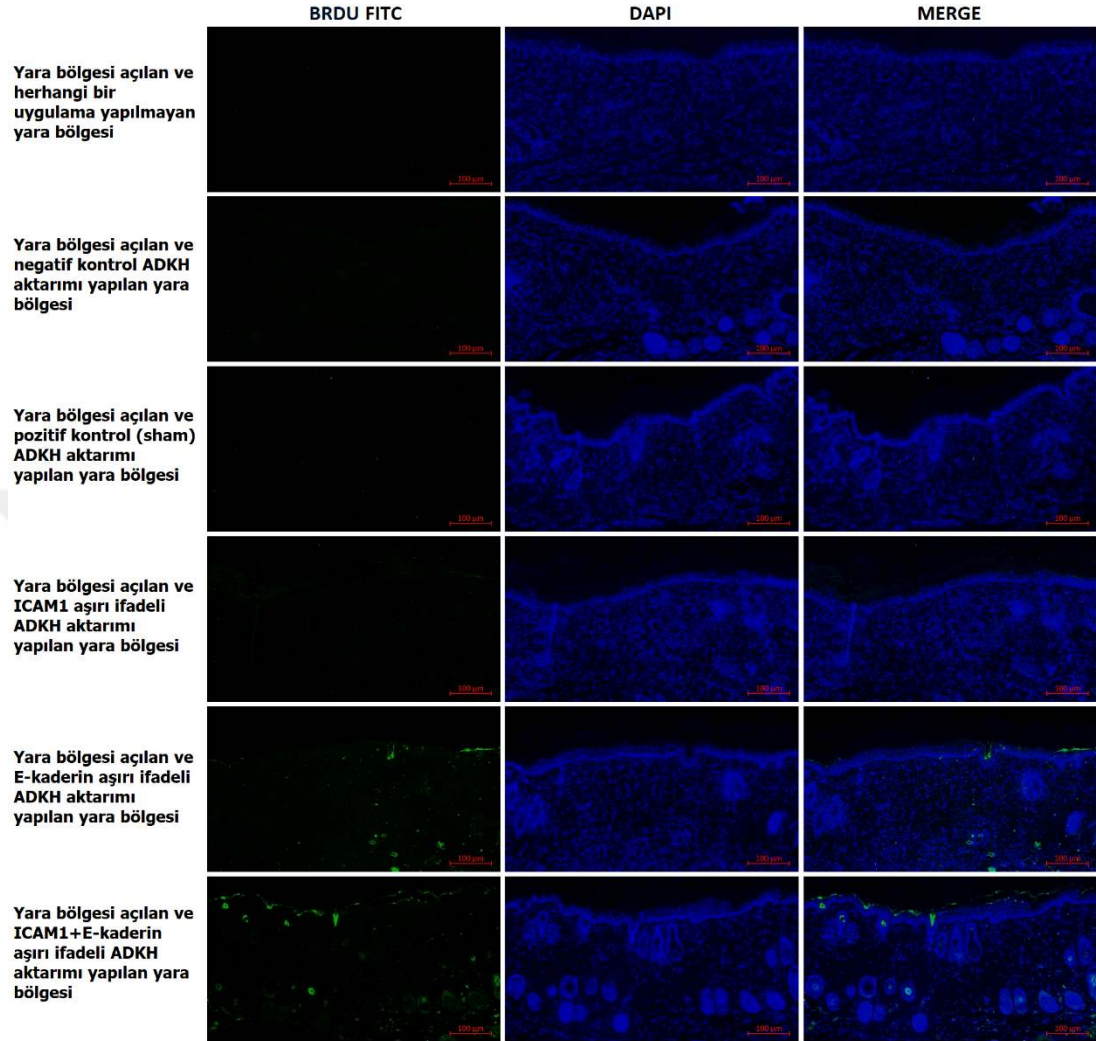
hücrelerine dönüşerek yağ bezi hücre fenotipini kazanmış olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 49. 15. günde fare yara bölgelerine implante edilen ADKH’lerin farklı gruplardaki zamana bağlı BrdU-pozitifliklerinin değerlendirilmesi (10X büyütme).

BrdU işaretli ADKH’lerin yara bölgesine implantından 21 gün sonra yapılan IF analizlerinde, şekil 50’de görüldüğü üzere negatif kontrol, sham ve ICAM1 aşırı ifade ADKH’lerinin verildiği yara bölgelerinde herhangi bir BrdU-pozitif ADKH varlığı hem dermal hem de epidermis tabakasında tespit edilememiştir. Bununla birlikte, E-kaderin aşırı ifade ve ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifade ADKH’lerinin verildiği yara bölgelerinin hepsinde BrdU-pozitif ADKH varlığı hem dermal hem de epidermis tabakasında tespit edilmiştir. Özellikle ICAM-1 ve E-kaderin aşırı ifade edilen ADKH’lerin uygulandığı yara bölgelerindeki yağ bezi hücrelerinin çoğunluğunda BrdU-pozitif hücrelerin varlığı da tespit edilmiştir. Bu durum,

ADKH'lerin cilt rejenerasyon sürecinde epidermal hücreler ve yağ bezi hücrelerine de dönüşebileceğini güçlü bir şekilde ileri sürmektedir.



Şekil 50. 21. günde fare yara bölgelerine implante edilen ADKH'lerin farklı gruplardaki zamana bağlı BrdU-pozitifliklerinin değerlendirilmesi (10X büyütme).

3.1.15.3. E-kaderin ve ICAM-1 Aşırı İfadeli ADKH'lerin Yara İyileşmesine Olan Etkilerinin İmmüno Floresan Olarak Değerlendirilmesi

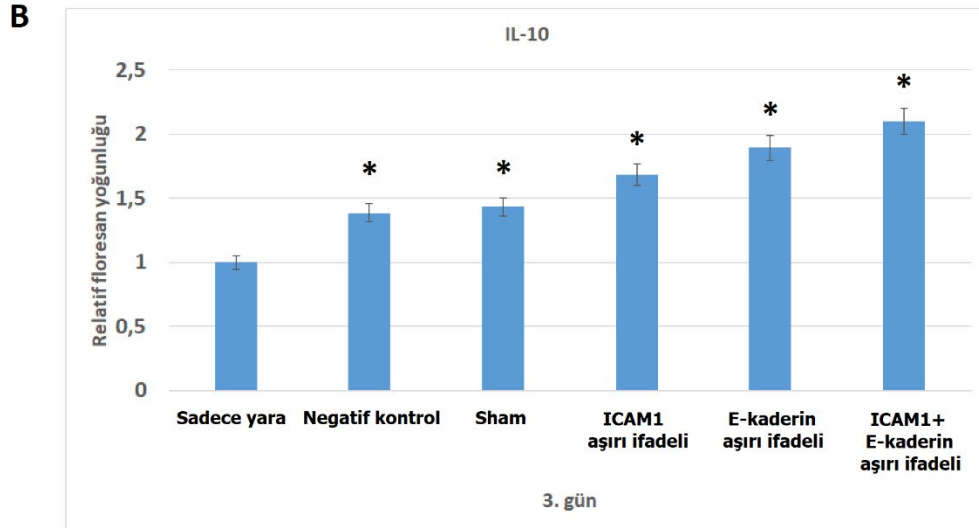
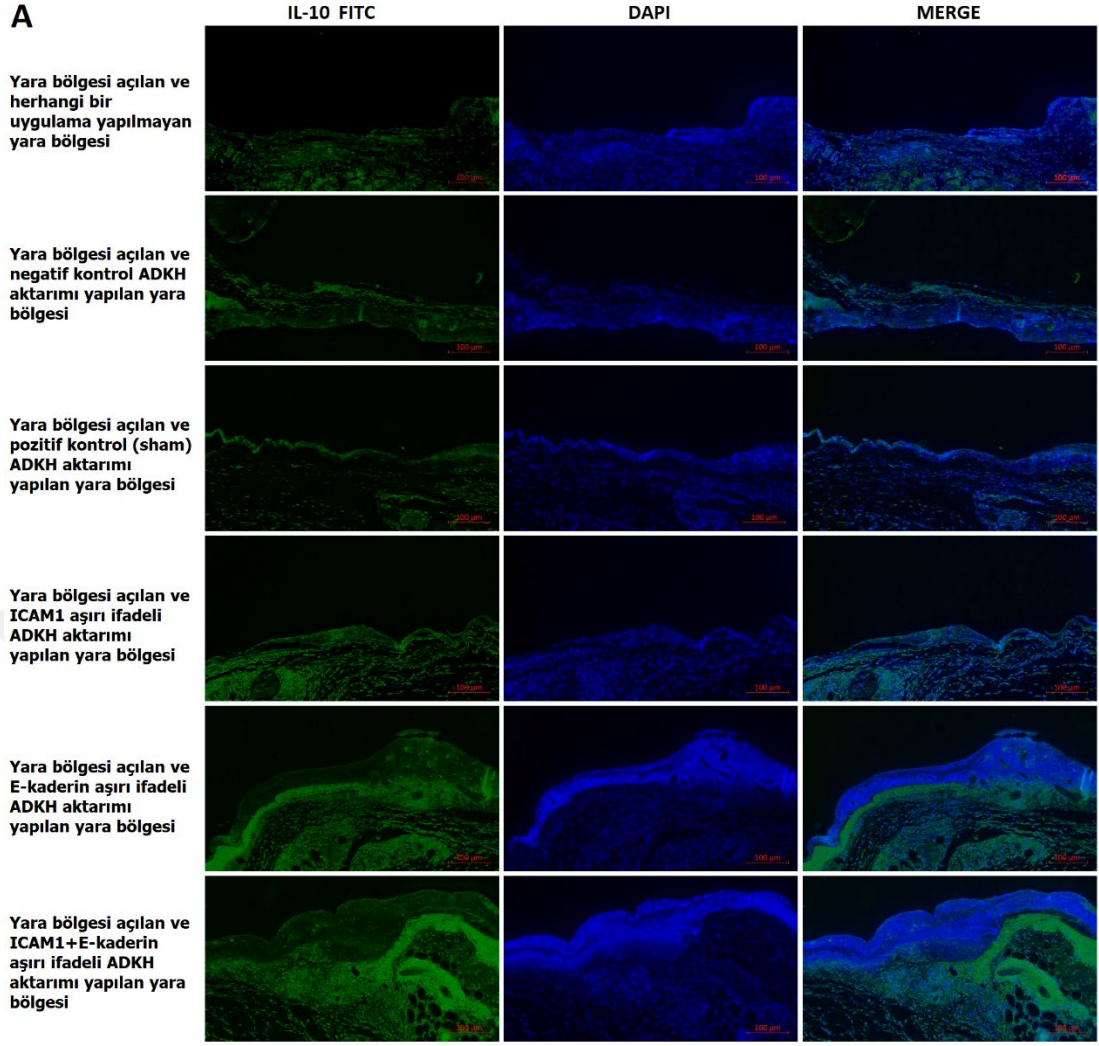
Bu çalışmada, E-kaderin ve ICAM-1 ifade seviyeleri artırılmış ADKH'lerin yara iyileşmesi sürecine olan etkileri IF boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir. Yara bölgesinde immün yanıt ve doku yeniden yapılanmasının göstergeleri olarak IL-10, MMP-2 ve TNF- α ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. IL-10'un anti-inflamatuar etkisi, MMP-2'nin doku yeniden modellemedeki rolü ve TNF- α 'nın pro-inflamatuar yanıtı düzenlemesi dikkate alınarak yapılan bu değerlendirme, ADKH'lerin yara mikroçevresindeki immün modülasyon kapasitesini ortaya koymayı amaçlamaktadır.

Elde edilen veriler, E-kaderin ve ICAM-1 ifade seviyelerinin artışının yanısıra yara iyileşmesinde önemli rol oynayan sitokin ve enzim düzeyleri üzerindeki etkilerini görsel ve kantitatif olarak ortaya koymuştur.

IL-10, anti-inflamatuvar bir sitokin olup yara iyileşmesi sürecinde immün modülasyon, inflamasyonun baskılanması ve doku onarımının desteklenmesinde kilit rol oynar. IL-10'un yara bölgesindeki yüksek ekspresyonu, genellikle daha az inflamasyon ve daha hızlı rejenerasyon ile ilişkilidir. Dolayısıyla, bu çalışmada, 6 adet tam kat deri yarası oluşturulan erkek Albino BALB/c farelerinin 1. yara bölgesi herhangi bir tedavi uygulaması ya da ADKH implantasyonu yapılmadan bırakıldı, 2. yara bölgesine herhangi bir gen modifikasyonu uygulanmamış negatif kontrol ADKH'ler implante edildi, 3. yara bölgesine herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen sgRNA ve dCas9 kompleksinin viral transdüksiyon ile aktarıldığı sham ADKH'leri implante edildi, 4. yara bölgesine ICAM1 gen ifadesi artırılmış ADKH'ler implante edildi, 5. yara bölgesine E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH'ler implante edildi ve 6. yara bölgesine ise ICAM1 ve E-Kaderin gen ifadesi artmış ADKH'ler implante edildi ve böylece bir fare üzerinde 6 farklı yara grubu elde edilmiş oldu. Daha sonra ise bu 6. farklı gruba ait yara bölgeleri 3., 7., 15. ve 21. günlerde IF yöntemiyle ile IL-10 antikoruna ile analiz edilerek kantitatif IL-10 ekspresyon verileri elde edildi.

3. gün sonunda, 1. gruba ait yara bölgesinin provizyonel matriks bölgesinde IL-10 ekspresyon düzeyinde diğer gruplara göre artış sınırlı seviyede kaldığı görülmüştür (Şekil 51). Elde edilen bu değer, yaranın kendi doğal süreci içerisinde anti-inflamatuvar sitokin üretiminin sınırlı olduğunu, dışsal hücrel müdahaleler olmadan bağışıklık regülasyonunun yetersiz kaldığını göstermektedir. Diğer tüm gruplardaki IL-10 floresan sinyal yoğunluğu ise bu normal kontrol grubu referans alınarak normalize edilmiştir. Negatif kontrol ADKH'lerinin uygulandığı 2. gruba ait yara bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu herhangi bir uygulama yapılmayan sadece yara açılan kontrol grubuna (sadece yara) göre %38 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermesi, ADKH hücrelerinin yara mikroçevresine dahil olduğunda immün yanıtı düzenleyici bir rol oynadığını göstermektedir. Sham ADKH'lerinin uygulandığı 3. gruba ait yara bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre %43 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. Ancak, 2. ve 3. grupların arasında IL-10 ekspresyonu bakımından anlamlı ($p=0.858$) bir farklılık görülmemiştir. Bu durum

lentiviral transdüksiyon ya da CRISPR/dCas9 sisteminin hücrelere aktarım işleminin kendisinin IL-10 ekspresyonuna doğrudan bir etkisi olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla sonraki gruptaki ekspresyon değişikliklerinin vektörün içeriğine bağlı genetik modifikasyondan kaynaklandığı güvenle söylenebilir. ICAM1 gen ifadesi artırılmış ADKH'lerin uygulandığı 4. gruba ait yara bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre %68 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. Bu grupta ICAM1 geninin lentiviral sistemle aşırı ifade edilmesi sonucunda ADKH hücrelerinin yara bölgesinde tutunma kapasiteleri artırılmıştır. Bu artışa paralel olarak IL-10 floresan sinyal yoğunluğunun referansa göre %68 oranında artmış olması, bu hücrelerin yara bölgesinde daha stabil ve fonksiyonel bir biçimde varlık gösterdiğini göstermektedir. ICAM1'in hücre-hücre etkileşimlerini kuvvetlendirmesi sayesinde bu hücrelerin immun mikroçevreye daha uzun süreli ve etkili parakrin sinyaller gönderdiği düşünülmektedir. E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH'lerin uygulandığı 5. gruba ait yara bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre %89 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. E-kaderin kaynaklı artan hücresel etkileşimler, yara mikroçevresine daha düzenli bir hücre yerleşimi sağlamış ve bu da daha etkili bir parakrin sinyalizasyonla sonuçlanmıştır. Bu grup, bireysel olarak en yüksek IL-10 artışı sağlayan gen modifikasyonu olarak öne çıkmıştır. ICAM1 ve E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH'lerin uygulandığı 6. gruba ait yara bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre %110 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. Sonuç olarak, 3. gün için elde edilen verilerde, ADKH hücrelerinin yara bölgesinde tutunmalarını artıracak genetik modifikasyonların, IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu da anlamlı şekilde artırdığını ortaya koymaktadır.



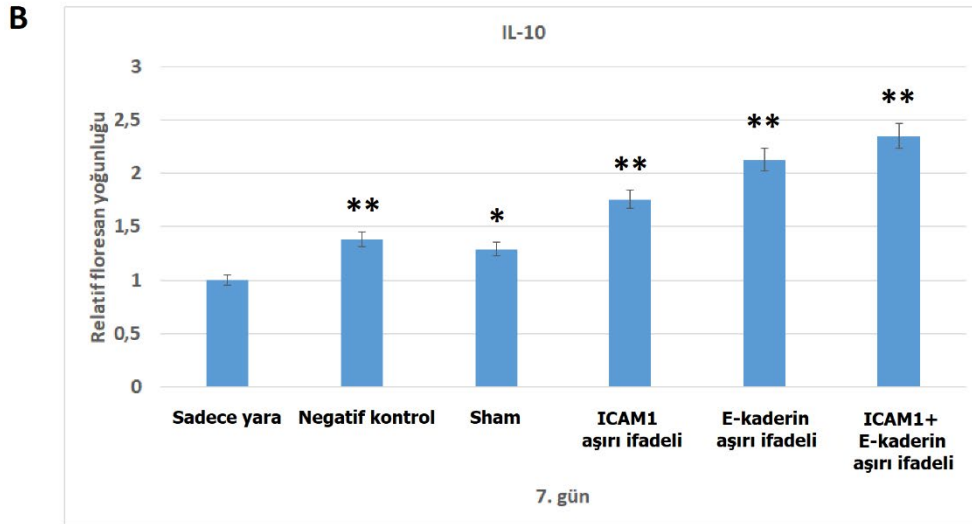
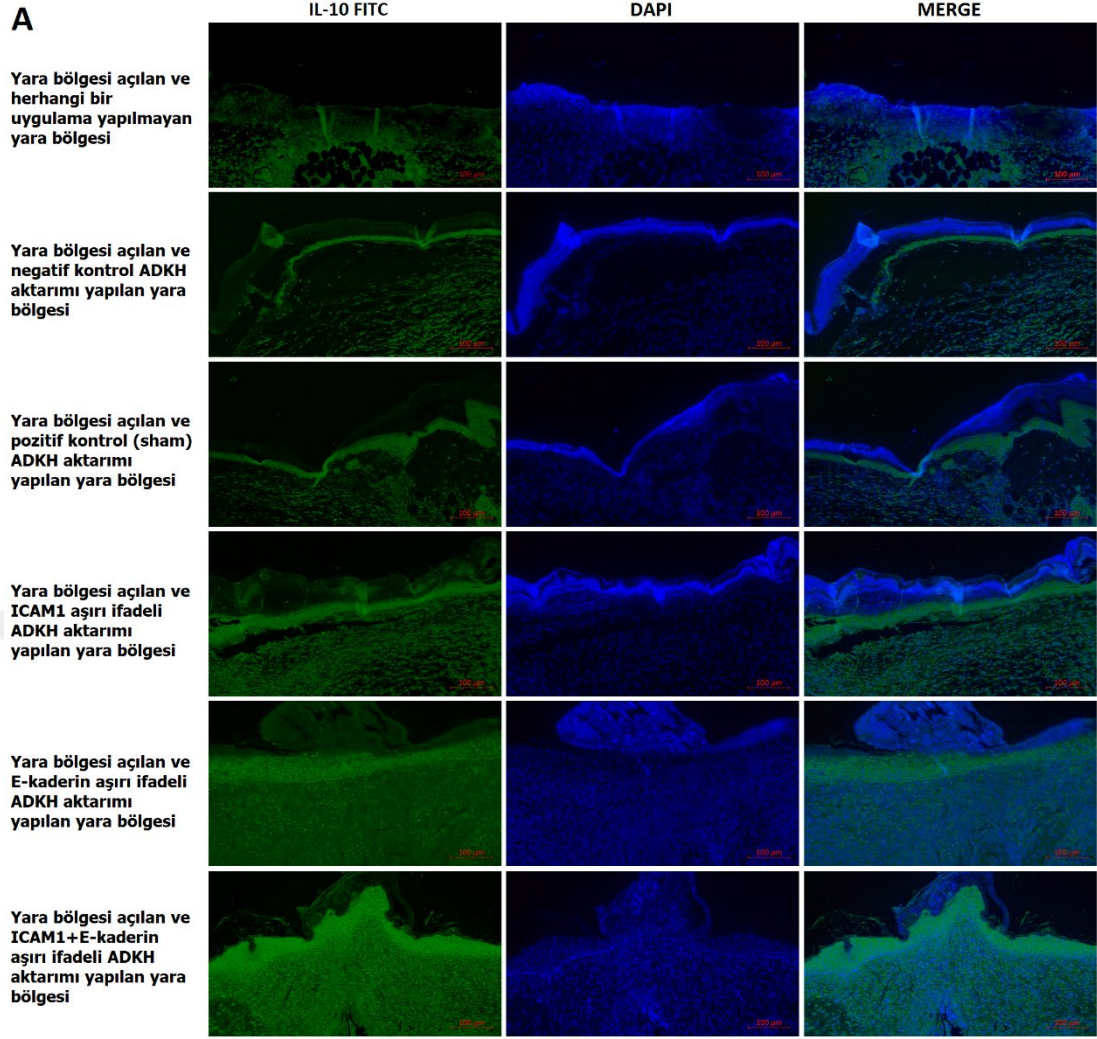
Şekil 51. 3. gün sonunda yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların IL-10 antikoru ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, IF ile IL-10 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.0001$).

7. gün sonunda, 1. gruba ait yara bölgesinde epidermis tabakası oluşmamış ve provizyonel matriks bölgesinde IL-10 ekspresyon düzeyinde diğer gruplara göre artış yine sınırlı seviyede kaldığı görülmüştür (Şekil 52). Elde edilen bu değer, yaranın kendi doğal iyileşme süreci içerisinde IL-10 üretiminin sınırlı olduğunu, dışsal hücrel müdahaleler olmadan anti-inflamatuvar yanıtın zayıf kaldığını göstermektedir. Diğer tüm gruplardaki IL-10 floresan sinyal yoğunluğu ise bu normal kontrol grubu referans alınarak orantılanmıştır. Negatif kontrol ADKH’lerinin uygulandığı 2. gruba ait yara bölgesinin dermis ve epidermis tabakasında IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 3. gün verisiyle benzer şekilde %38 oranında anlamlı bir artış ($p < 0.0001$) göstermiştir. Bu durum, ADKH hücrelerinin yara mikroçevresine dahil olduğunda kalıcı bir anti-inflamatuvar yanıt oluşturabildiğini ve bu etkinin 7. güne kadar sürdüğünü göstermektedir. Sham ADKH’lerinin uygulandığı 3. gruba ait yara bölgesinin dermis ve epidermis tabakasında IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre %28 oranında anlamlı bir artış ($p = 0.001$) göstermiştir. Fakat, 2. ve 3. grupların arasında IL-10 ekspresyonu bakımından anlamlı ($p = 0.366$) bir farklılık görülmemiştir. ICAM1 gen ifadesi artırılmış ADKH’lerin uygulandığı 4. gruba ait yara bölgesinin dermis ve epidermis tabakasında IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 3. günde %68 artış göstermişken, 7. günde bu oran yine anlamlı ($p < 0.0001$) bir şekilde %75’e yükselmiştir. Bu artışın devam etmesi, ICAM1’in sadece adezyon değil, aynı zamanda hücrelerin mikroçevreyle etkileşim süresini uzatarak IL-10 gibi parakrin faktörlerin sekresyonunu sürdürdüğünü göstermektedir. E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH’lerin uygulandığı 5. gruba ait yara bölgesinin dermis ve epidermis tabakasında IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 3. günde %68 artış göstermişken, 7. günde bu oran yine anlamlı ($p < 0.0001$) bir şekilde %112’ye yükselmiştir. Bu sürekli ve artan IL-10 üretimi, E-kaderin’in ADKH’lerin yara dokusunda kalıcılığını güçlendirdiğini ve immünomodülatör etkilerini sürdürdüğünü desteklemektedir. ICAM1 ve E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH’lerin uygulandığı 6. gruba ait yara bölgesinin dermis ve

epidermis tabakasında IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 3. günde %110 artış göstermişken, 7. günde bu oran yine anlamlı ($p<0.0001$) bir şekilde %135'e yükselmiştir. Bu durum, ICAM1 ve E-kaderin'in sinerjistik etkisiyle hücrelerin yara mikroçevresine yüksek düzeyde adapte olduğunu ve bu hücrelerin bölgeye daha yoğun IL-10 salgılandığını göstermektedir. 7. gün verileri, 3. gün verilerine kıyasla IL-10 ekspresyonunda artışın sürdüğünü ve en yüksek düzeyin ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edildiği grupta gözlendiğini ortaya koymaktadır. ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte kullanımı, ADKH hücrelerinin yara bölgesinde uzun süre kalmasına ve maksimum immün yanıt regülasyonu sağlamasına imkan verdiği belirlenmiştir.



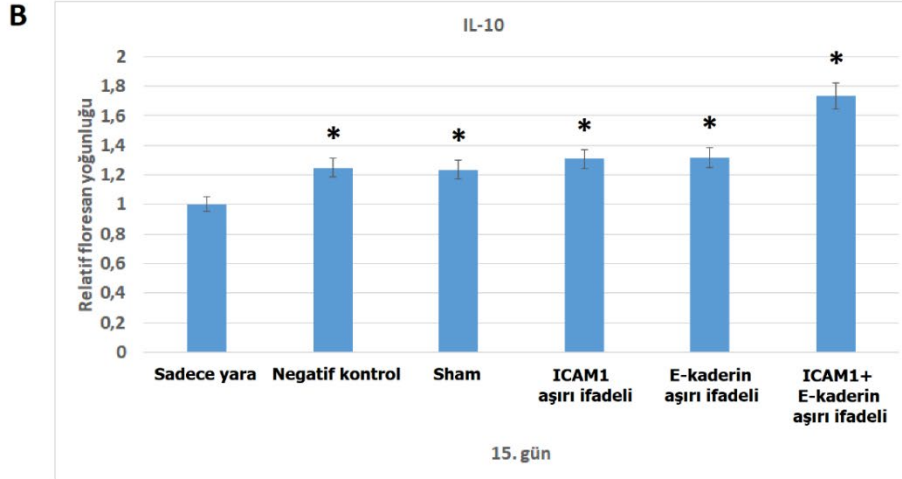
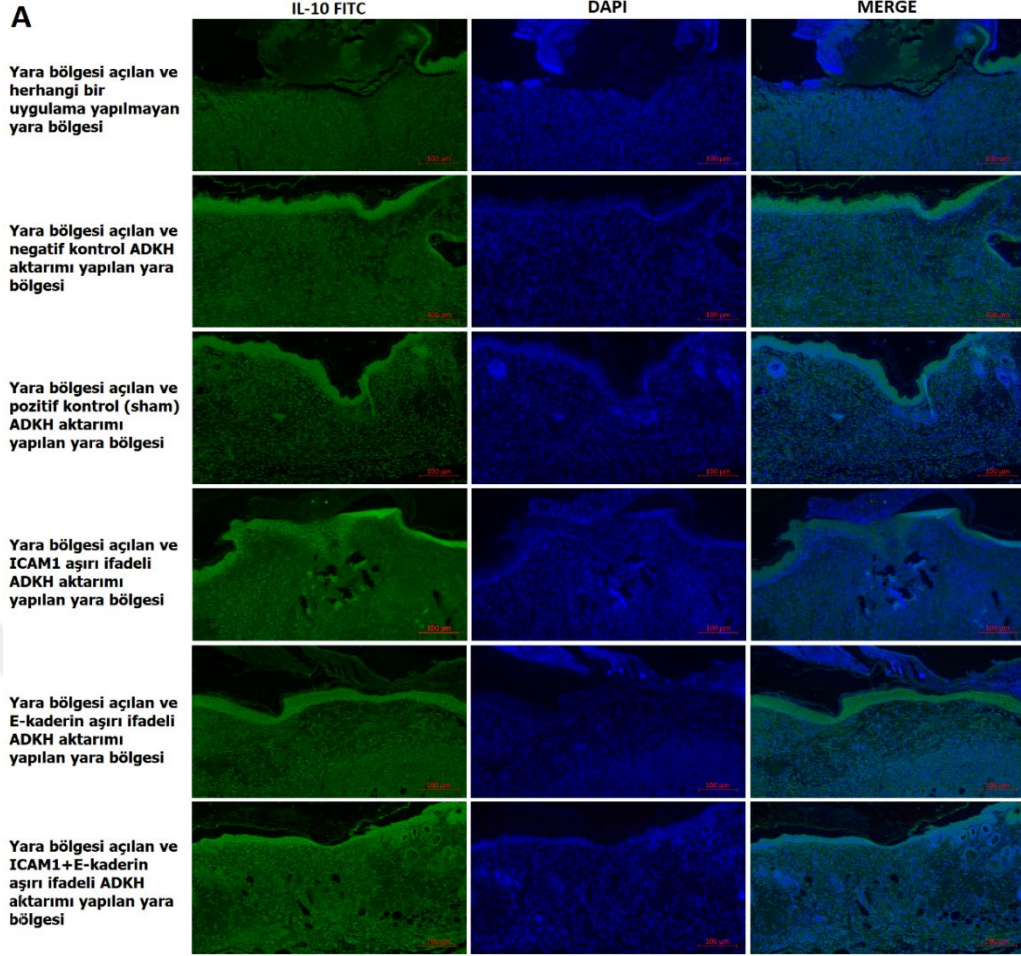


Şekil 52. 7. gün sonunda yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların IL-10 antikoru ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, kantitatif immüno Floresan ile IL-10 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p \leq 0.001$, ** $p < 0.0001$).

15. gün sonunda, 1. gruba ait yara bölgesinde önceki günlerde de olduğu gibi belirlenen IL-10 seviyesi doğal iyileşme süreci içerisinde dermal tabakada diğer gruplara kıyasla sınırlı bir anti-inflamatuvar yanıt geliştiği görülmektedir (Şekil 53). Diğer tüm gruplardaki IL-10 floresan sinyal yoğunluğu ise bu normal kontrol grubu referans alınarak orantılanmıştır. Negatif kontrol ADKH’lerinin uygulandığı 2. gruba ait yara bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 15. gün sonunda %24 oranında anlamlı ($p < 0.0001$) bir artış göstermiştir. Ancak bu oran, 3. (%38) ve 7. (%38) gün sonuçlarına kıyasla belirgin şekilde düşmüştür. Aynı zamanda bu grubun yara bölgesinde epidermisin 3 katman (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) ile dermisin yapısal bütünlüğünün yeniden oluştuğu ve IL-10 ekspresyonunun ise hem epidermis bölgesinde hem de dermis bölgesinde benzer seviyede gerçekleştiği gözlenmiştir. Sham ADKH’lerinin uygulandığı 3. gruba ait yara dermis bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 15. gün sonunda %23 oranında anlamlı ($p < 0.0001$) bir artış göstermiştir. Bu oran, 3. (%43) ve 7. (%28) günlerde elde edilen sonuçlara kıyasla belirgin şekilde düşmüştür. Şekil 53’de görüldüğü gibi Sham ADKH’lerinin uygulandığı 3. gruba ait yara bölgesinde 2. gruba benzer şekilde 15. günde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuştur. Dermis ve epidermis bölgesindeki IL-10 ekspresyonu benzer seviyede gerçekleşmiştir. Fakat, 2. ve 3. grupların arasında IL-10 ekspresyonu bakımından 15. günde anlamlı ($p = 0.987$) bir farklılık görülmemiştir. ICAM1 gen ifadesi artırılmış ADKH’lerin uygulandığı 4. gruba ait yara dermis bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 15. gün sonunda %30 oranında anlamlı ($p < 0.0001$) bir artış göstermiştir. Bunun dışında, 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermis katmanlarında IL-10 benzer seviyede eksprese olmuştur. E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH’lerin uygulandığı 5. gruba ait yara dermis bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 15. gün sonunda %32 oranında anlamlı ($p < 0.0001$) bir artış

göstermiştir. Ayrıca, 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin yapısal olarak yeniden organize olarak epidermise ait stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum katmanlarının düzenli bir şekilde olduğu gözlenmiştir. IL-10 ekspresyonu seviyeleri hem epidermis bölgesinde hem de dermis bölgesinde birbirine yakın düzeylerde gerçekleşmiştir. ICAM1 ve E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH'lerin uygulandığı 6. gruba ait yara dermis bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 15. gün sonunda %73 oranında anlamlı ($p<0.0001$) bir artış göstermiştir. Bu grup, 3. (%110) ve 7. (%135) gün sonuçlarının ardından, 15. günde %73'lük IL-10 ekspresyon artışı ile halen en yüksek ekspresyon düzeyine sahip grup olmuştur. Zaman içinde düşüş yaşansa da diğer gruplara göre anlamlı fark devam etmektedir ($p<0.0001$). Ayrıca, 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin yapısal bütünlüğü yeniden sağlanmıştır. Epidermise ait 3 katman oluşmuş ve IL-10 ekspresyonu hem bu katmanlarda hem de dermis bölgesinde benzer seviyede olmuştur. 15. gün sonuçları, özellikle ICAM1 ve E-kaderin genlerinin ADKH'lerde birlikte aşırı ifade edildiğinde immün yanıtı daha uzun süre düzenlediğini, IL-10 sekresyonunu daha kalıcı ve yüksek düzeyde sürdürdüğünü ve böylece iyileşmenin ilerleyen dönemlerinde bile pro-inflamatuvar süreci baskılamaya devam ettiğini göstermektedir.

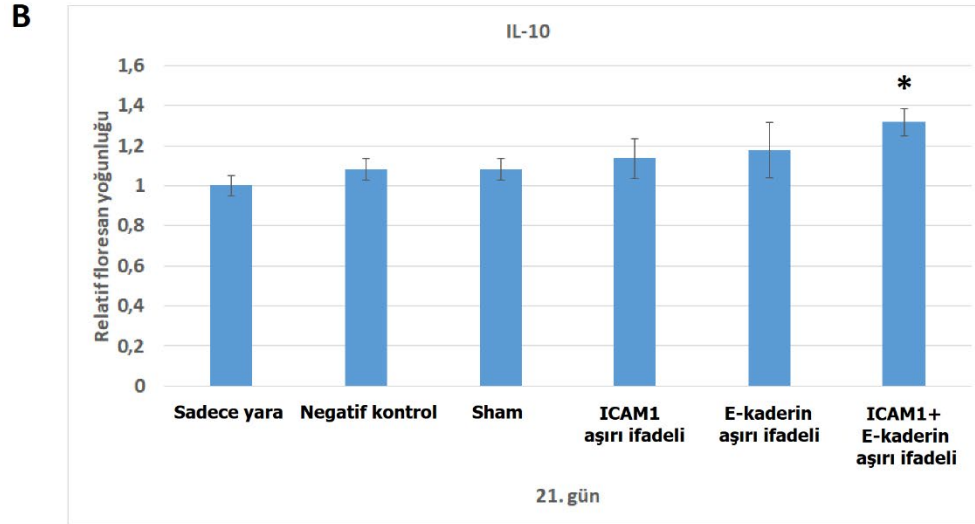
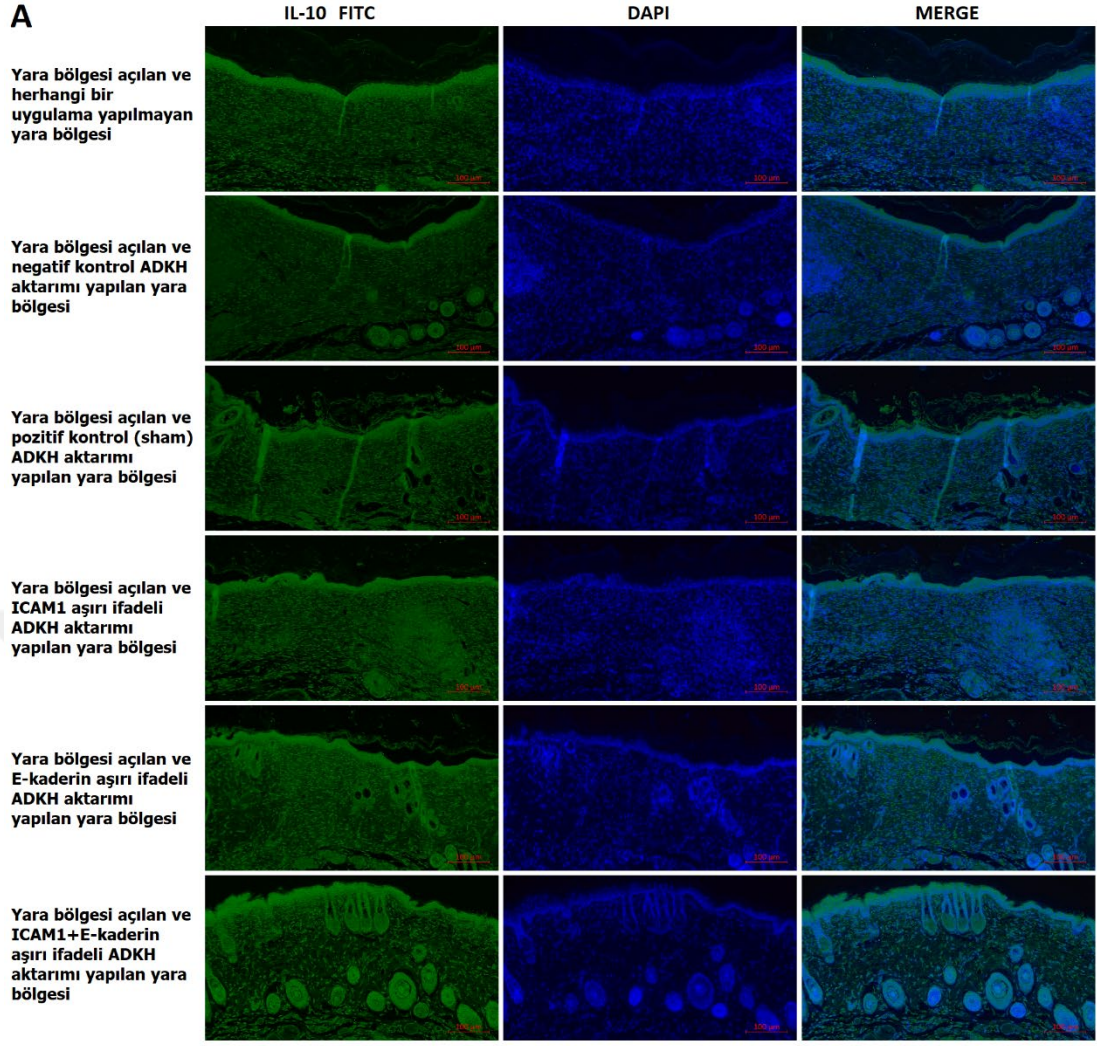


Şekil 53. 15. gün sonunda yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların IL-10 antikoru ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif analizi. Veriler, immüno Floresan (IF) ile IL-10 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna

göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.0001$).

21. gün, yara iyileşmesinin yeniden şekillenme fazı olup, inflamasyonun çözüldüğü ve immün hücrelerin büyük ölçüde ortamdan çekildiği, epidermisin katmanlarının ve dermisin yapısal bütünlüğünün gerçekleştiği evredir. Dolayısıyla 21. gün sonunda, 1. gruba ait yara bölgesinde belirlenen IL-10 seviyesi kendi içinde 15. güne göre doğal olarak düşüş göstermiştir. Diğer grupların 15. gününde tamamlanmış olan dermis ve epidermisin 3 katmanı (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) bu grupta 21. günde tamamlanmıştır. Diğer tüm gruplardaki IL-10 floresan sinyal yoğunluğu ise bu normal kontrol grubu referans alınarak orantılanmıştır (Şekil 54). Negatif kontrol ADKH'lerinin uygulandığı 2. gruba ait yara dermis ve epidermis bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu 21. gün sonunda sadece yara grubuna göre sadece %8 artmıştır ($p=0.841$). Önceki günlerde (%38-%24 artış) gözlenen IL-10 sekresyonu zamanla fizyolojik olarak baskılanmış ve etkisi kaybolmuştur. Sham ADKH'lerinin uygulandığı 3. gruba ait yara dermis ve epidermis bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu 21. gün sonunda sadece yara grubuna göre sadece %8 artmıştır ($p=0.837$). ICAM1 gen ifadesi artırılmış ADKH'lerin uygulandığı 4. gruba ait yara bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu 21. gün sonunda sadece yara grubuna göre sadece %13 artmıştır ($p=0.758$). E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH'lerin uygulandığı 5. gruba ait yara bölgesinin dermis ve epidermis tabakalarındaki IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu 21. gün sonunda sadece yara grubuna göre sadece %17 artmıştır ($p=0.182$). Yine de bu artış, yeniden şekillenme döneminde bile düşük seviyeli immün dengeyi koruyabilecek potansiyele işaret edebilmektedir. ICAM1 ve E-kaderin gen ifadesi artırılmış ADKH'lerin uygulandığı 6. gruba ait yara bölgesinin IL-10 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu 21. gün sonunda sadece yara grubuna göre %32 düzeyinde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.0001$). Bu grup, IL-10'un fizyolojik olarak düşmesi beklenen bir zamanda bile anti-inflamatuvar etkisini sürdürebilen tek gruptur. Bu durum, ICAM1+E-kaderin genetik modifikasyonlarının yara bölgesine uygulanan ADKH'lerin uzun süreli fonksiyonel varlıklarını ve tedavi edici etkilerini koruyabildiğini gösterir. Özellikle, bu grupta IL-10 ekspresyonunun geç fazda dahi yüksek seviyelerde olması anti-inflamatuvar ortamı desteklediğini ve iyileşmenin fibrotik değil rejeneratif ilerlemesine katkı sağladığını

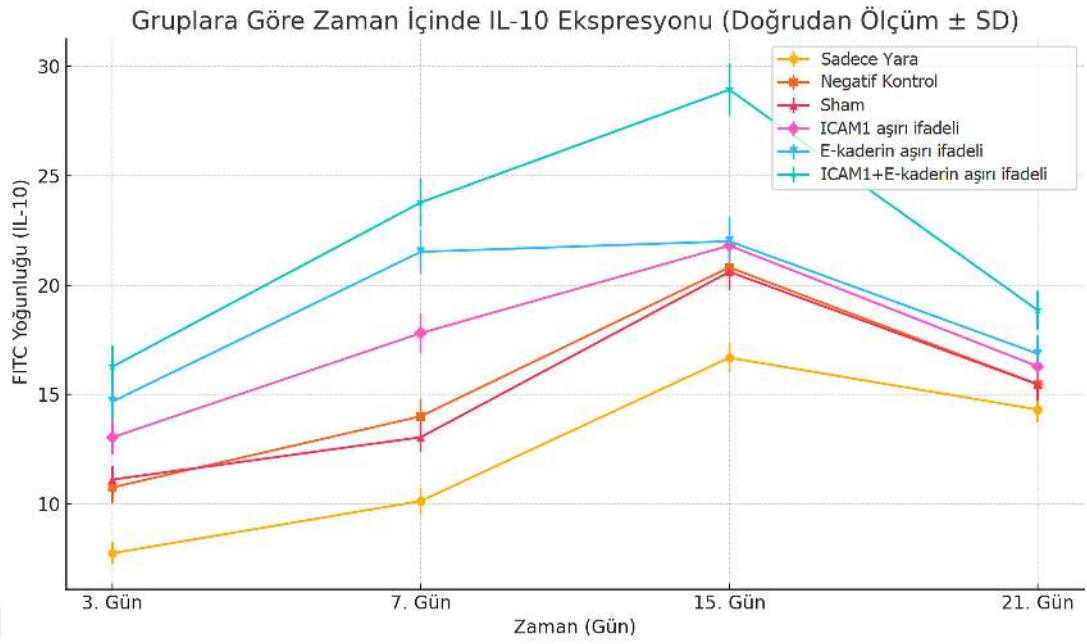
düşündürmektedir. Bu sonuç, ADKH'lerin daha fazla miktarda ve uzun süreli tutunması ile parakrin etkilerin doğrudan ilişkili olduğunu destekler niteliktedir. Ayrıca IL-10 yeniden şekillenme aşamasında anti-inflamatuvar etkisiyle yara bölgesindeki hücrelerin apoptozunu ve doku dengelemesini destekler. Sonuç olarak, IL-10 ekspresyonu, 21. gün gibi geç bir fazda düşüş eğiliminde olsa da, kontrol ADKH'leri ve genetik modifikasyonlu gruplarda sadece yara oluşturulan kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek kalmıştır. En güçlü IL-10 ekspresyon seviyesi ise, çift modifikasyon uygulanan ICAM1+E-kaderin grubunda gözlenmiştir. Bu, sadece hücre uygulamasının değil, hücrelerin hedeflenen genetik modifikasyonlarla desteklenmesinin, yara bölgesinde uzun süreli anti-inflamatuvar ortamın korunmasında kritik rol oynadığını göstermektedir.



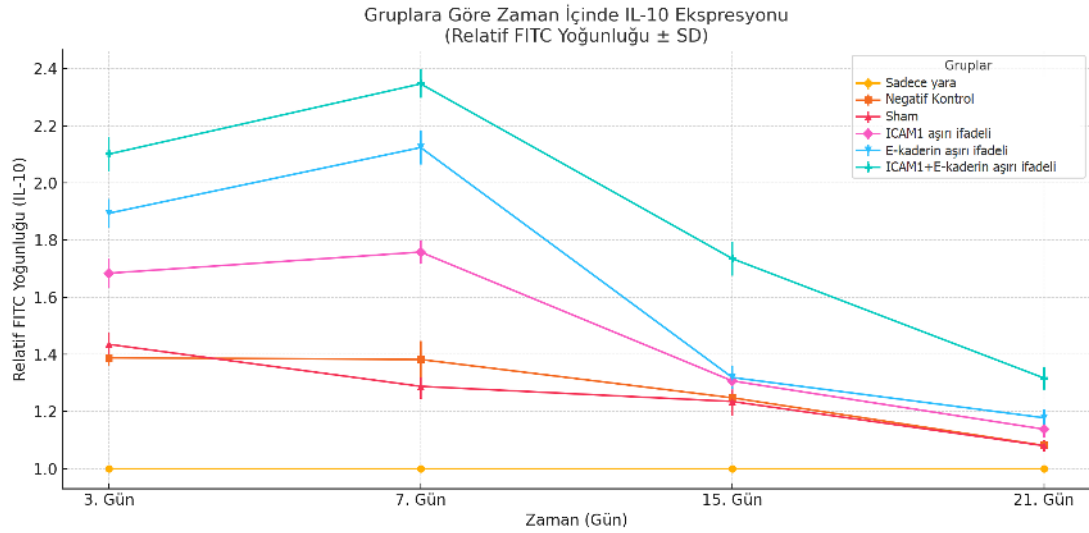
Şekil 54. 21. gün sonunda yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların IL-10 antikoru ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri. (10X büyütme) **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif analizi.

Veriler, IF ile IL-10 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.0001$).

Farklı genetik modifikasyonlara sahip ADKH’lerin yara bölgesine uygulanması sonrasında IL-10 ekspresyonundaki değişimler 3., 7., 15. ve 21. günlerde relatif FITC yoğunluğu üzerinden karşılaştırmalı olarak (Şekil 55) ve aynı zamanda sadece yara bölgesine göre normalize edilerek (Şekil 56) sunulmuştur. Erken dönem olan 3. ve 7. günlerde, özellikle ICAM1 ve E-kaderin birlikte aşırı ifade edilen ADKH’lerin verildiği yara bölgesinde IL-10 seviyelerinde belirgin artış göstermiştir. Bu durum, hücrelerin yara bölgesine daha iyi tutunmasını sağlayarak anti-inflamatuvar parakrin etkilerini güçlendirdiğini düşündürmektedir. 15. günde tüm gruplarda IL-10 düzeylerinde fizyolojik olarak azalma eğilimi başlasa da, ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifade edilen grup hâlâ anlamlı düzeyde ekspresyon sergilemiş ve geç fazda da aktif kaldığını göstermiştir. 21. gün ise IL-10 ekspresyonunun yara iyileşmesinin yeniden şekillenme fazına geçmesiyle birlikte genel olarak düştüğü bir evre olmuştur. Ancak ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifade hücrelerin uygulandığı grupta IL-10 düzeyleri halen diğer gruplara kıyasla yüksek seyretmiş, bu da modifiye hücrelerin uzun süreli tutunma yetenekleri sayesinde immün mikroçevreyi regüle etmeye devam ettiğini göstermektedir. Bu veriler genel olarak, genetik olarak modifiye edilen ADKH’lerin IL-10 düzeylerini zaman içinde daha stabil ve yüksek tutabildiğini ve yara iyileşmesinde parakrin etkinliklerini hem erken hem de geç fazlarda sürdürebildiğini ortaya koymaktadır (Şekil 55, 56).



Şekil 55. Gruplara göre zaman içinde IL-10 ekspresyon düzeylerinin normalize edilmemiş değerleri (FITC yoğunluğu $\pm$ SD). Her bir grup için IL-10 düzeyleri 3., 7., 15. ve 21. günlerde doğrudan FITC floresan yoğunluğunun $n=6$ tekrar ölçümleriyle belirlenmiştir. ADKH'ler, yara bölgesine aşağıdaki farklı gruplar halinde uygulanmıştır: Herhangi bir uygulama yapılmamış Sadece yara (negatif referans kontrol), Modifiye edilmemiş ADKH (Negatif kontrol), sgNT + dCas9puro ile transdüklenmiş ADKH (Sham), ICAM1 aşırı ifade ADKH, E-kaderin aşırı ifade ADKH, ICAM1 ve E-kaderin birlikte aşırı ifade ADKH. Ölçümler, IL-10 antikoru ile yapılan FITC işaretlemeleri üzerinden elde edilmiştir. Grafik üzerinde her grup farklı bir sembolle temsil edilmiştir; hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.



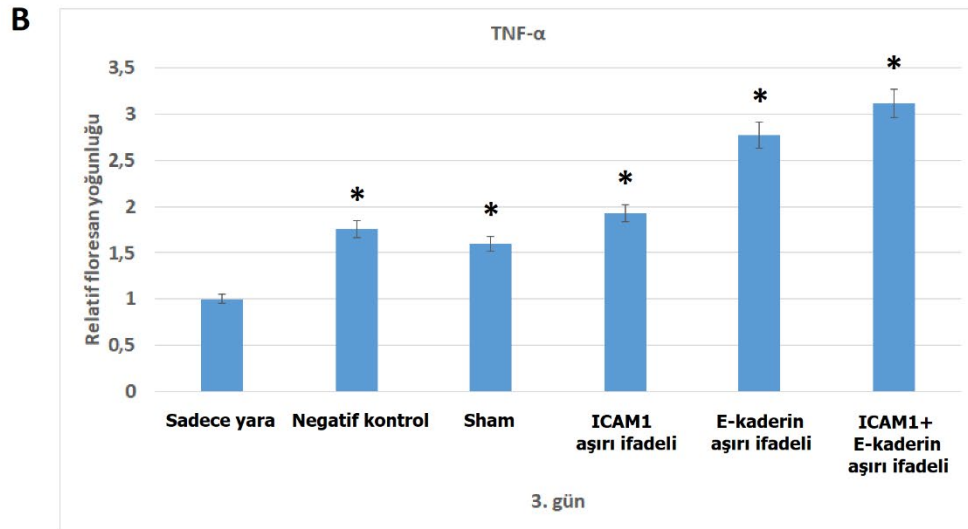
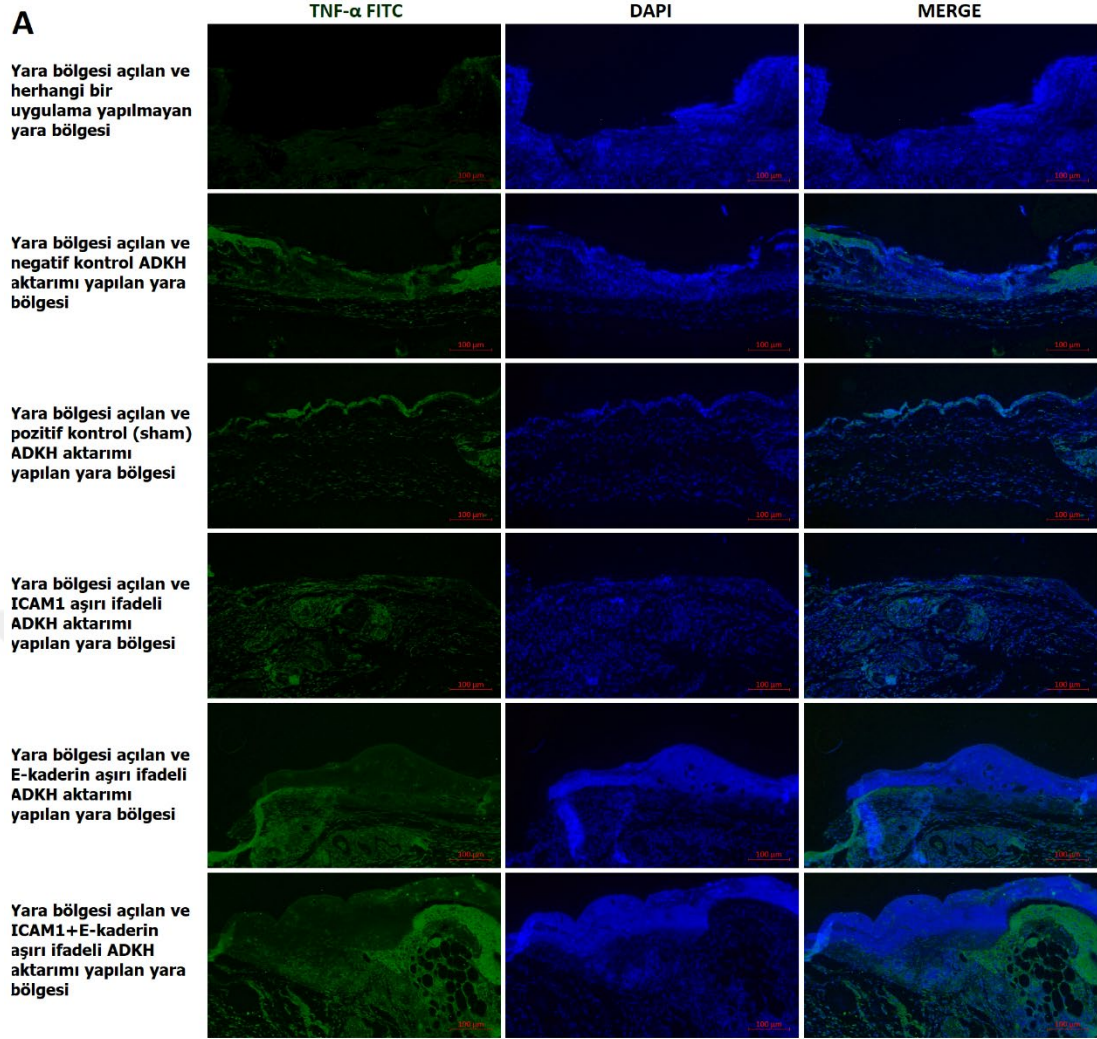
Şekil 56. Farklı genetik modifikasyonlara sahip ADKH'lerin yara bölgesindeki IL-10 ekspresyonuna etkisi (3., 7., 15. ve 21. günlerde Relatif FITC yoğunluğu $\pm$ SD). ADKH'ler, yara bölgesine aşağıdaki farklı gruplar halinde uygulanmıştır: Herhangi bir uygulama yapılmamış Sadece yara (negatif referans kontrol), Modifiye edilmemiş ADKH (Negatif kontrol), sgNT + dCas9puro ile transdüklenmiş ADKH (Sham), ICAM1 aşırı ifade ADKH, E-kaderin aşırı ifade ADKH, ICAM1 ve E-kaderin çift aşırı ifade ADKH. Veriler, IF ile IL-10 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (n=6). Noktalar her bir zaman noktasındaki ortalama değeri temsil ederken, hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.

Bu çalışmada yara iyileşmesi sürecinde pro-inflamatuvar yanıtın önemli bir belirleyicisi olan TNF- α sitokin düzeyleri, farklı gruplara ait yara dokularında dört ayrı değerlendirme zamanında (3., 7., 15. ve 21. günlerde) değerlendirilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmada, 6 adet tam kat deri yarası oluşturulan erkek Albino BALB/c farelerinin 1. yara bölgesi herhangi bir tedavi uygulaması ya da ADKH implantasyonu yapılmadan bırakıldı, 2. yara bölgesine herhangi bir gen modifikasyonu uygulanmamış negatif kontrol ADKH'ler implante edildi, 3. yara bölgesine herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen sgRNA ve dCas9 kompleksinin viral transdüksiyon ile aktarıldığı sham ADKH'leri implante edildi, 4. yara bölgesine ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi, 5. yara bölgesine E-kaderin RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi ve 6. yara bölgesine ise ICAM1 ve E-Kaderin RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi ve böylece bir fare üzerinde 6 farklı yara grubu elde edilmiş oldu. Daha sonra ise bu 6. farklı gruba ait yara bölgeleri 3., 7.,

15. ve 21. günlerde IF yöntemiyle ile TNF- α antikoru ile analiz edilerek kantitatif TNF- α ekspresyon verileri elde edildi. Elde edilen bulgular, ADKH'lerin yara bölgesine implantasyonu ile birlikte TNF- α ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklikler meydana getirdiğini ortaya koymuştur. Özellikle ICAM1 ve E-kaderin genlerinin aşırı ifade edildiği ADKH'lerde yara bölgesine daha etkin tutunması ile birlikte erken dönemde TNF- α düzeylerinin herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. TNF- α 'nın yara iyileşmesinin erken fazlarında inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu, vasküler geçirgenliğin artışı ve sitokin zincir reaksiyonlarının başlatılmasında görev alması nedeniyle, genetik olarak modifiye edilmiş ADKH'lerin bu fazda oluşturduğu etkiler, hücresel düzeyde immün mikroçevrenin yeniden şekillenmesine katkı sağlamaktadır. Bulgular, özellikle 3. ve 7. günlerde, hücrelerin ICAM1 ve/veya E-kaderin aracılığıyla mikroçevre ile temas kurması sonucu, TNF- α ekspresyonunun yükseldiğini ve bu etkinin zamana bağlı olarak 15. ve 21. günlerde azaldığını göstermektedir. Bu azalma, inflamasyonun çözülme fazına geçildiğini ve iyileşme sürecinin ilerlediğini işaret etmektedir. Genel olarak, TNF- α ekspresyon dinamikleri, genetik modifikasyonla güçlendirilmiş hücre-hücre ve hücre-doku etkileşimlerinin yara bölgesinde daha güçlü bir inflamatuvar yanıt oluşturduğunu; ancak bu etkinin zamanla kontrol altına alındığını göstermiştir. 3. ve 7. günler arasında TNF- α , akut inflamasyon fazının başlatıcısı olarak endotel geçirgenliğini artırarak immün hücrelerin yara bölgesine geçişini kolaylaştırır. Böylece, makrofaj ve nötrofil aktivasyonunu uyararak yara bölgesinde kemokin salınımını artırarak dokuya immün hücre göçünü tetikler. Bu çalışmada elde edilen bulgular, ADKH hücrelerinin yara bölgesinde TNF- α ekspresyonu ve immün mikroçevre üzerindeki etkilerini anlamada önemli bir referans sunmaktadır.

3. gün sonunda, 1. gruba ait yara bölgesinin provizyonel matriks bölgesinde TNF- α ekspresyon düzeyinde diğer gruplara göre artışın sınırlı seviyede kaldığı görülmüştür (Şekil 57). Bu grup yalnızca yaranın kendisine ait doğal inflamatuvar süreci yansıtmaktadır. TNF- α ekspresyon seviyesine göre tüm diğer gruplar normalize edilmiştir. Bu düzey, erken inflamasyon fazının başlangıcında yara bölgesindeki doğal immün hücre aktivitesini temsil etmektedir. Beklendiği üzere, bu düzey baz alınarak diğer gruplardaki değişiklikler hesaplanmıştır. 2. grup olan negatif kontrol grubunda TNF- α ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu herhangi bir uygulama

yapılmayan sadece yara açılan kontrol grubuna (sadece yara) göre %75 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. ADKH'lerin yara mikroçevresine eklenmesiyle bağışıklık hücreleriyle olan etkileşimler artmış, bu da pro-inflamatuvar TNF- α üretiminin belirgin şekilde yükselmesine neden olmuştur. Bu durum, nakledilen hücrelerin konak doku ile immünolojik temas sonucu inflamatuvar süreçleri aktive ettiğini göstermektedir. 3. grup olan pozitif kontrol sham grubunda TNF- α ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre %60 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. Fakat 2. ve 3. grupların arasında TNF- α ekspresyonu bakımından anlamlı ($p=0.724$) bir farklılık görülmemiştir. Bu durum lentiviral transdüksiyon ya da CRISPR/dCas9 sisteminin hücrelere aktarım işleminin kendisinin TNF- α ekspresyonuna doğrudan bir etkisi olmadığını göstermektedir. 4. grup ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu sadece yara grubuna kıyasla %92 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. ICAM1, lökosit adezyonunu kolaylaştıran önemli bir hücresel adezyon molekülüdür. Bu bağlamda, ICAM1 aşırı ifade ADKH hücrelerinin yara bölgesine daha iyi tutunmasını sağlamış ve bu tutunma, konak bağışıklık hücreleriyle etkileşimi kuvvetlendirmiştir. Sonuç olarak inflamatuvar yanıtın daha da arttığı gözlemlenmiştir. 5. grup E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu sadece yara grubuna kıyasla %177 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. E-kaderin, epitel hücreleri arasında hücre-hücre bağlantılarını sağlayan temel adezyon moleküllerindendir. ADKH'lerde E-kaderin aşırı ifade, bu hücrelerin hem birbirleriyle hem de konak epitel hücreleriyle bağ kurmasını kolaylaştırmış olabilir. Bu güçlü hücre-hücre teması, TNF- α üretimini önemli ölçüde tetiklemiş görünmektedir. 6. grup olan ICAM1 + E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu sadece yara grubuna kıyasla %211 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edilmesi, hücrelerin yara dokusuna maksimal tutunmasını sağlamış ve immün hücrelerle fiziksel etkileşimi en üst düzeye çıkarmıştır. Bu nedenle TNF- α ekspresyonu da tüm gruplar arasında en yüksek düzeye bu grupta ulaşmıştır. Yüksek TNF- α düzeyi, yara bölgesinde güçlü bir inflamatuvar yanıtın geliştiğini ve transplante edilen genetik modifikasyonlu hücrelerin bu süreci şiddetlendirdiğini göstermektedir.

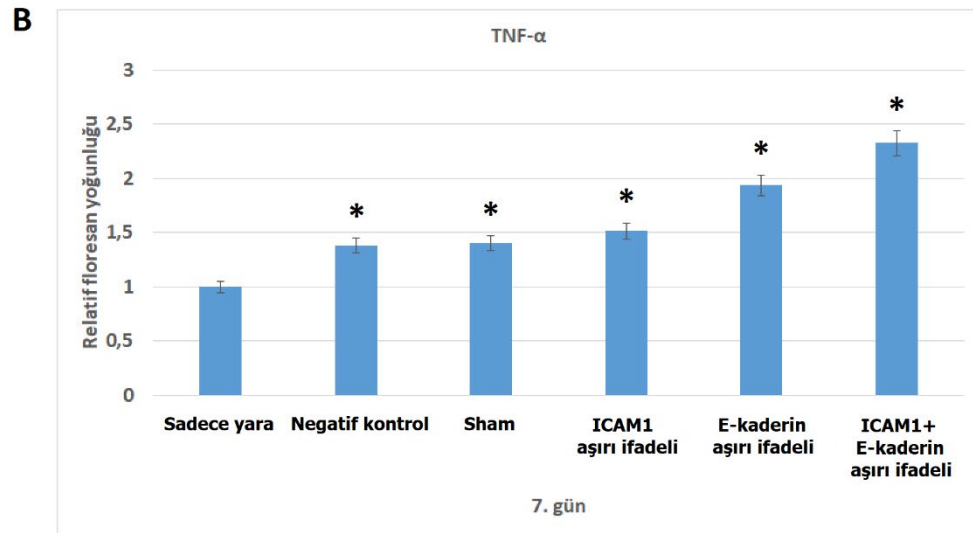
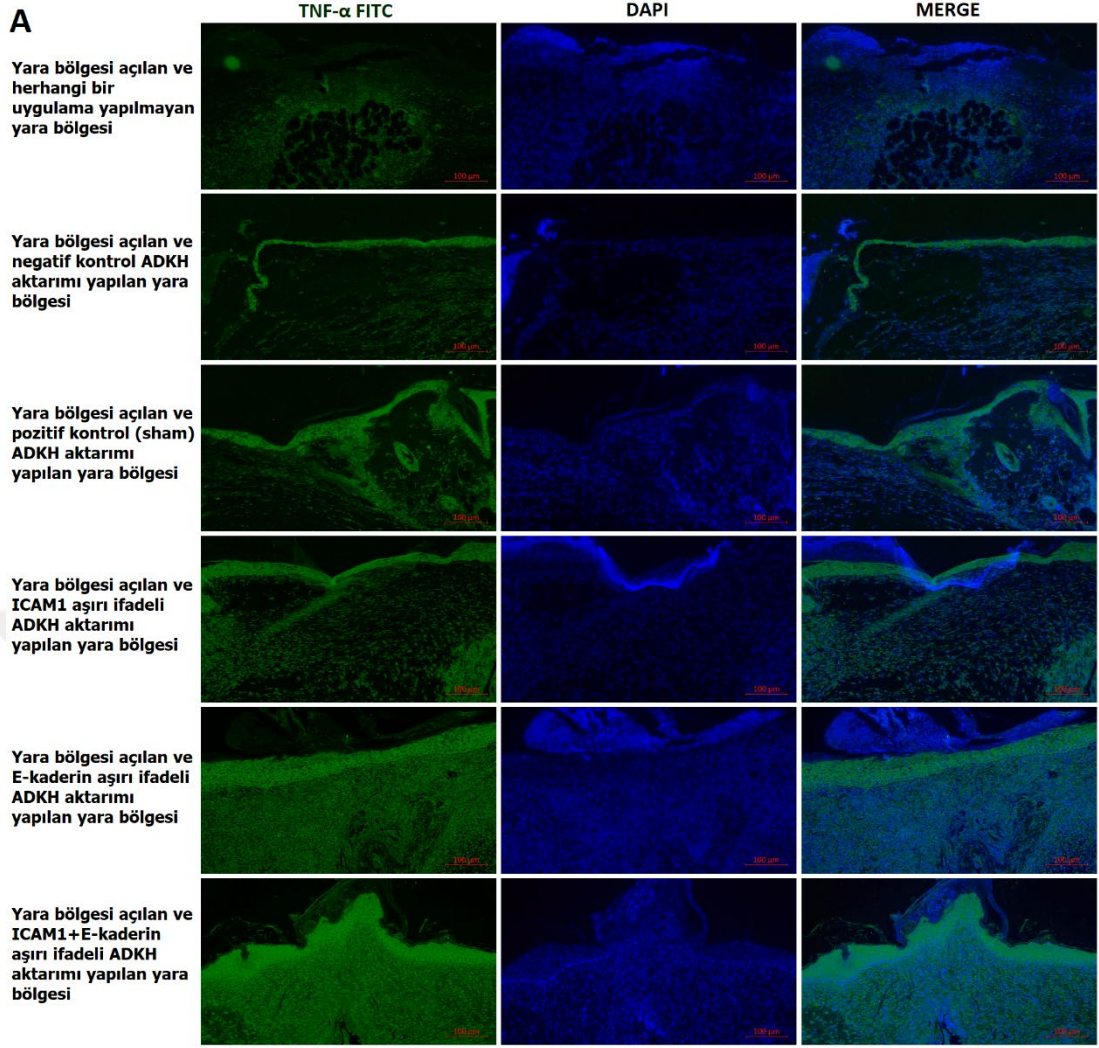


Şekil 57. 3. gün sonunda yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların TNF- α antikoru ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, kantitatif immüno floresan ile TNF- α antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.0001$).

7. gün sonunda, herhangi bir uygulama yapılmayan 1. gruba ait yara bölgesindeki TNF- α ekspresyon seviyesi aynı grubun 3. günündeki ekspresyon seviyesine göre artış göstermiştir (Şekil 58). Bu dönemde halen TNF- α ekspresyon seviyesinin yüksek olması, yaranın inflamatuvar fazının henüz aktif olduğunu ve bağışıklık hücrelerinin bölgeye göç ettiğini göstermektedir. Diğer grupların ekspresyon düzeyleri bu gruba göre normalize edilmiştir. 2. grup olan negatif kontrol grubundaki yara bölgesine ait TNF- α ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 7. günde %38 oranında anlamlı bir artış ($p < 0.0001$) göstermiştir. Şekil 58’den anlaşılabileceği üzere 7. günde bu grubun yara bölgesinde oluşumu tamamlanmış dermis bölgesindeki TNF- α ekspresyon seviyesi, stratum granulosumun henüz oluşmadığı stratum basale ve stratum spinosumun yer aldığı epidermis bölgesine kıyasla düşük kalmıştır. 3. grup olan pozitif kontrol sham grubundaki yara bölgesine ait TNF- α ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 7. günde %40 oranında anlamlı bir artış ($p < 0.0001$) göstermiştir. 2. gruba benzer şekilde bu grubun yara bölgesinde de oluşumu tamamlanmış dermis bölgesindeki TNF- α ekspresyon seviyesi, stratum granulosumun henüz oluşmadığı stratum basale ve stratum spinosumun yer aldığı epidermis bölgesine kıyasla düşük kalmıştır. Bununla birlikte, 2. ve 3. grupların arasında TNF- α ekspresyonu bakımından anlamlı ($p = 0.926$) bir farklılık görülmemiştir. 4. grup ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu sadece yara grubuna kıyasla 7. günde %51 oranında anlamlı bir artış ($p < 0.0001$) göstermiştir. 2. ve 3. gruba benzer şekilde bu grubun yara bölgesinde de oluşumu tamamlanmış dermis bölgesindeki TNF- α ekspresyon seviyesi, stratum granulosumun henüz oluşmadığı stratum basale ve stratum spinosumun yer aldığı epidermis bölgesine kıyasla düşük kalmıştır. 5. grup E-kaderin aşırı ifade ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu sadece yara grubuna göre 7. günde %93 oranında anlamlı bir artış ($p < 0.0001$) göstermiştir. Diğer gruplardan farklı olarak, bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuştur. Fakat, TNF- α ekspresyonu hem dermis

hem de epidermis bölgesinde yüksek seviyelerde kalmıştır. 6. grup olan ICAM1 + E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu sadece yara grubuna göre 7. günde %132 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. 5. grupla benzer şekilde bu grubun yara bölgesinde yüksek seviyelerde TNF- α ekspresyonuna sahip dermis ve epidermis (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) bölgeleri oluşmuştur. Bu grup, TNF- α ekspresyonu açısından 7. gün verileri içinde en yüksek değere sahiptir. ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edilmesi, hücrelerin hem bağ dokusuna hem de birbirlerine maksimum tutunmasını sağlamıştır. Bu stabilizasyon, immün hücrelerle çok daha fazla temas fırsatı doğurarak inflamatuvar sitokin olan TNF- α 'nın üretimini en üst seviyeye çıkarmıştır. Elde edilen bu bulgular, genetik olarak modifiye edilmiş ADKH hücrelerinin erken faz inflamasyonunu anlamlı düzeyde kuvvetlendirdiğini göstermektedir.

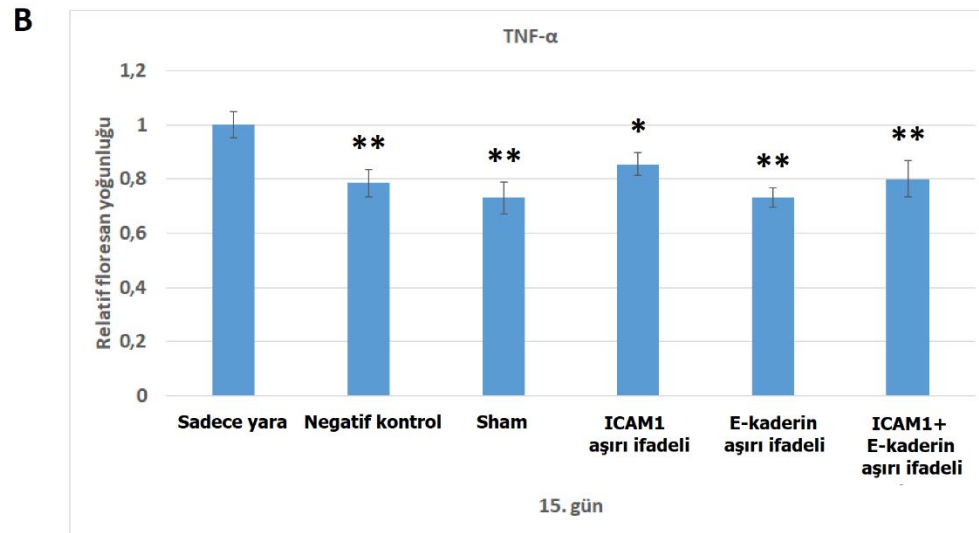
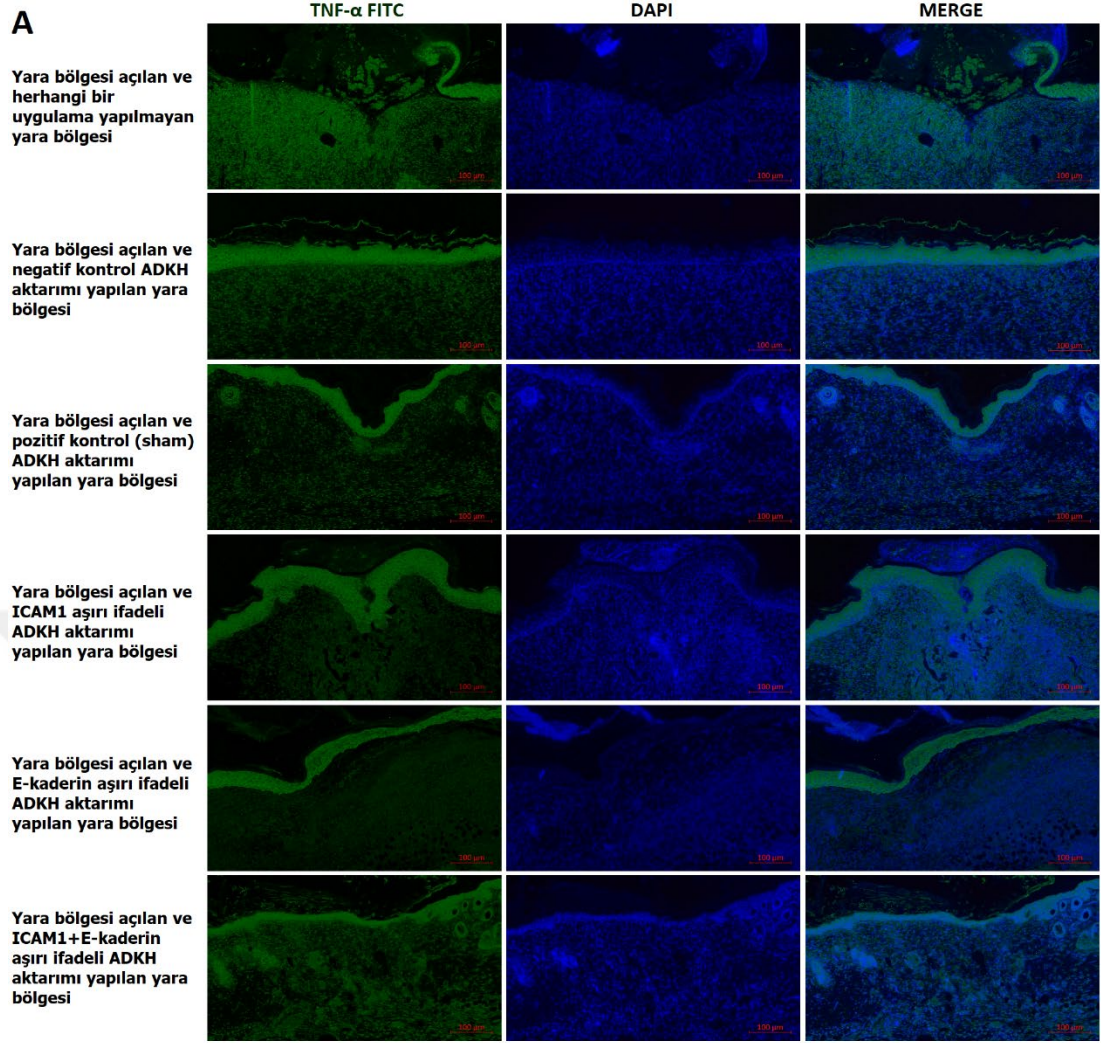


Şekil 58. 7. gün sonunda yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların TNF- α antikoruna ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, kantitatif immüno floresan ile TNF- α antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.0001$).

15. gün sonunda, herhangi bir uygulama yapılmayan 1. gruba ait yara bölgesindeki TNF- α ekspresyon seviyesi aynı grubun 7. gününe göre anlamlı ($p < 0.0001$) belirgin bir artış göstermişken, diğer gruplara göre anlamlı ($p < 0.0001$) bir şekilde yüksek seviyede kalmıştır (Şekil 59). Bu dönemde TNF- α ekspresyon seviyesinin hâlâ yüksek seviyede olması inflamasyonun yara bölgesinde geç çözülmesini göstermektedir. Diğer grupların ekspresyon düzeyleri bu gruba göre normalize edilmiştir. 15. günde 2. grup olan negatif kontrol grubundaki yara bölgesine ait TNF- α ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu 7. güne göre artış göstermiş olmasına rağmen herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna göre 15. günde %21 oranında anlamlı bir düşüş ($p < 0.0001$) göstermiştir. Şekil 59’dan da anlaşılabacağı üzere 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve TNF- α ekspresyonu epidermis bölgesinde dermis bölgesine göre daha yüksek seviyede ifade olmuştur. 15. günde 3. grup olan negatif kontrol grubundaki yara bölgesine ait TNF- α ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu 7. güne göre artış göstermiş olmasına rağmen herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna göre 15. günde %27 oranında anlamlı bir düşüş ($p < 0.0001$) göstermiştir. Şekil 59’da da görüldüğü gibi 2. grupla benzer şekilde 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve TNF- α ekspresyonu epidermis bölgesinde dermis bölgesine göre daha yüksek seviyede ifade olmuştur. Bununla birlikte, 2. ve 3. grupların TNF- α ekspresyonu 15. günde birbirleri arasında anlamlı ($p = 0.186$) bir farklılık göstermemiştir. 15. günde 4. grup ICAM1 aşırı ifade ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu 7. güne göre artış göstermiş olmasına rağmen herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna göre 15. günde %14 oranında anlamlı bir düşüş ($p = 0.001$) göstermiştir. Şekil 59’dan da anlaşılabacağı üzere 2. ve 3. grupla benzer şekilde 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve TNF- α ekspresyonu epidermis bölgesinde dermis bölgesine göre daha yüksek seviyede ifade olmuştur. 15. günde 5. grup E-kaderin aşırı ifade ADKH’lerin

uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu hem 7. güne göre düşüş göstermiş hem de herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna göre 15. günde %27 oranında anlamlı ($p<0.0001$) bir düşüş göstermiştir. Ancak bu değer, 7. gündeki pike (%93,7 artış) göre anlamlı ($p<0.0001$) bir düşüş göstermiştir. Bu durum, E-kaderin aracılığıyla ADKH'lerinin ilk etapta epitel benzeri yapıya katkı sağlayarak inflamasyonu tetiklediğini; fakat 15. güne gelindiğinde hücreyel yerleşimin tamamlanmasıyla TNF- α düzeyinin düşmeye başladığını düşündürmüştür. Hücre-hücre etkileşiminin stabilize olması, inflamatuvar uyarıların azalmasını sağlamıştır. TNF- α , düşük seviyelerde kaldığında fibroblast proliferasyonu ve anjiyogenez (yeni damar oluşumu) gibi olaylara katkı sağlar. Ayrıca, 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve 7. günden farklı olarak TNF- α ekspresyonu epidermis bölgesinde dermis bölgesine göre daha yüksek seviyede eksprese olmuştur. 15. günde 6. grup olan ICAM1 + E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonu hem 7. güne göre düşüş göstermiş hem de herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna göre 15. günde %20 oranında anlamlı bir düşüş ($p<0.0001$) göstermiştir. 7. günde en yüksek TNF- α düzeyine sahip olan bu grupta 15. günde belirgin ve de anlamlı ($p<0.0001$) bir şekilde azalmıştır. Bu bulgu, hücrelerin yara bölgesine maksimum tutunmayı 7. günde sağlamış olduğunu ve bu yüksek tutunmanın geçici inflamatuvar bir tepkime doğurduğunu göstermektedir. 15. günde ise bu hücrelerin mikroçevreyle bütünleşmesi sonrası TNF- α seviyesinin fizyolojik sınırlar içine girmeye başlamıştır. Bu durum, inflamasyonun çözülme fazına geçildiğinin moleküler bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve 7. günden farklı olarak TNF- α ekspresyonu epidermis bölgesinde dermis bölgesine göre daha yüksek seviyede eksprese olmuştur.

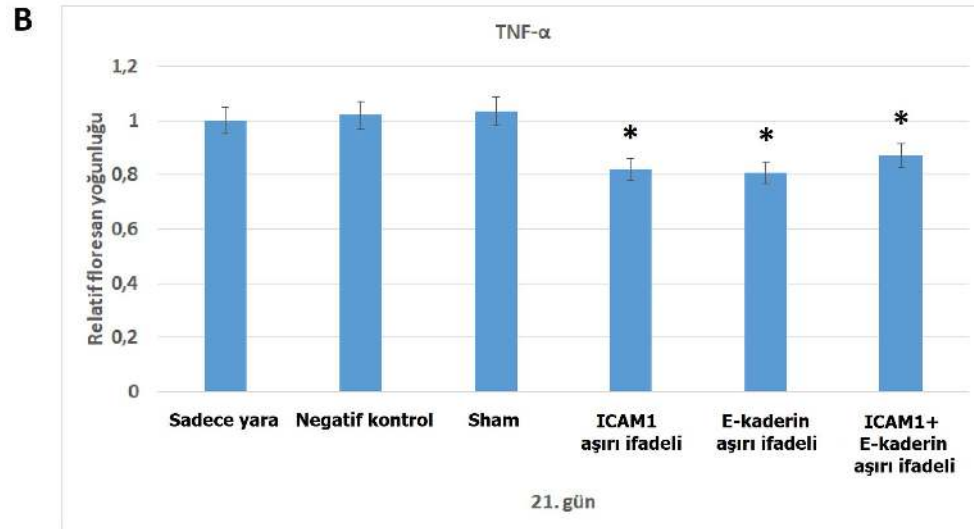
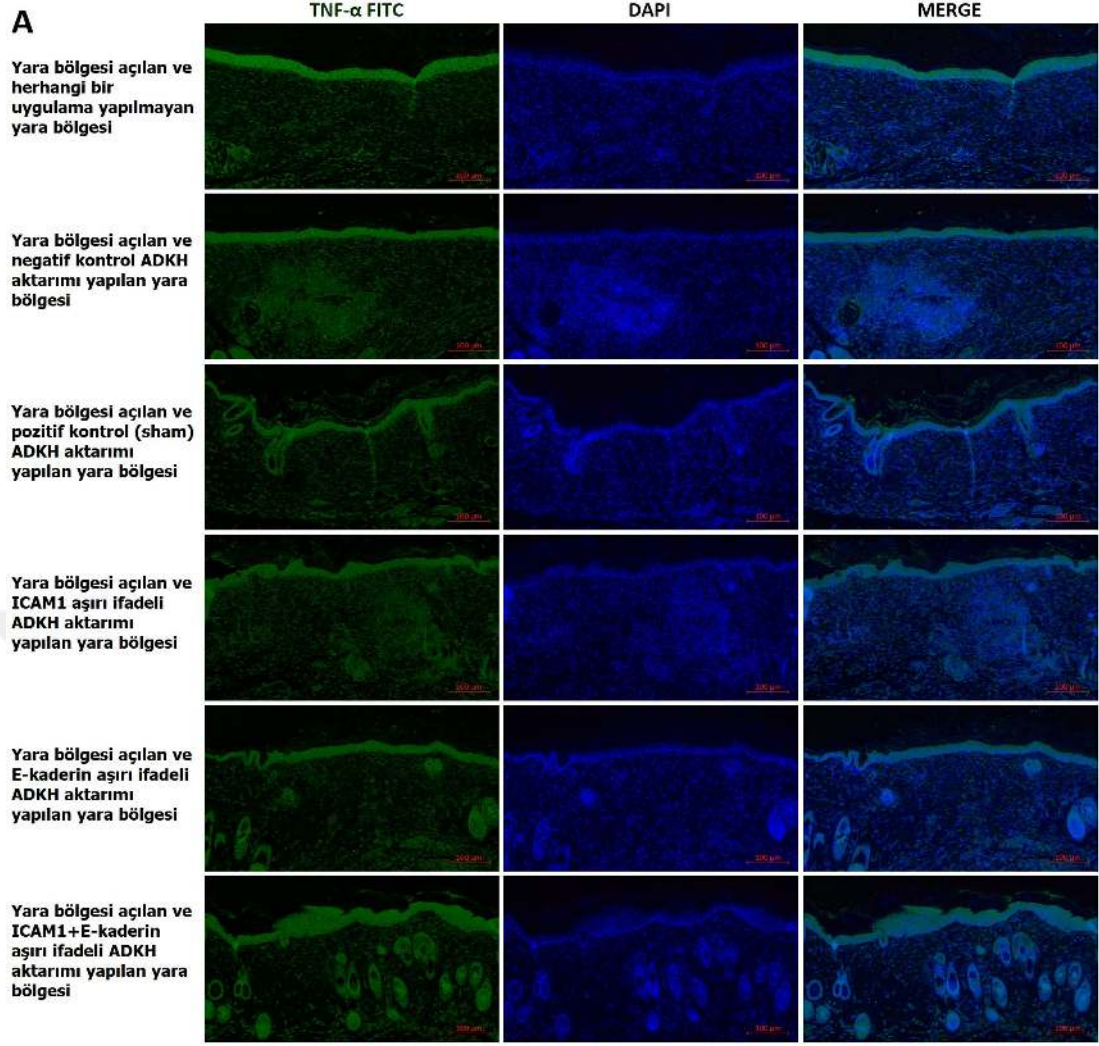


Şekil 59. 15. gün sonunda yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların TNF- α antikoruna ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, kantitatif immüno Floresan ile TNF- α antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p \leq 0.001$, ** $p < 0.0001$).

21. gün sonunda, herhangi bir uygulama yapılmayan 1. gruba ait yara bölgesinde TNF- α ekspresyon seviyesi aynı grubun 15. gününe göre düşüş göstermiştir. Şekil 60’da görüldüğü gibi 21. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve TNF- α ekspresyonu epidermis bölgesinde dermis bölgesine göre daha yüksek seviyede ifade olmuştur. Diğer grupların ekspresyon düzeyleri bu gruba göre normalize edilmiştir. 21. gün sonunda 2. grup olan negatif kontrol grubundaki yara bölgesine ait TNF- α ekspresyon seviyesinde 15. güne göre düşüş belirlenmiştir. Fakat, meydana gelen bu düşüş sonucu elde edilen TNF- α ekspresyon değeri herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna ait TNF- α ekspresyon değeri ile yakın değerde olmuştur ($p=0.999$). 21. gün sonunda 3. grup olan negatif kontrol grubundaki yara bölgesine ait TNF- α ekspresyon seviyesinde 15. güne göre düşüş belirlenmiştir. Fakat, meydana gelen bu düşüş sonucu elde edilen TNF- α ekspresyon değeri herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna ait TNF- α ekspresyon değeri ile yakın değerde olmuştur ($p=0.999$). 21. gün sonunda 4. grup ICAM1 aşırı ifade ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesine ait TNF- α ekspresyon seviyesinde 15. güne göre düşüş belirlenmiş ve meydana gelen düşüş herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna göre %18 oranında anlamlı ($p=0.001$) bir düşüş olmuştur. Bu düşüş, inflamasyonun çözülme sürecine girdiğini, ancak ICAM1’in artırdığı hücre-hücre etkileşimlerinin immün sistemle dengeleyici bir sinyal sağladığını göstermektedir. TNF- α seviyesinin azalması, iyileşmenin proliferatif ve yeniden yapılanma fazına geçtiğinin bir göstergesidir. 21. gün sonunda 5. grup E-kaderin aşırı ifade ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesine ait TNF- α ekspresyon seviyesinde 15. güne göre düşüş belirlenmiş ve meydana gelen düşüş herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna göre %19 oranında anlamlı ($p=0.001$) bir düşüş olmuştur. E-kaderin’in, epitel hücreler arası bağları güçlendirmesi sayesinde ADKH hücrelerinin yara bölgesinde daha stabil bir yapı oluşturduğu düşünülmektedir. Bu stabilizasyon TNF- α üretimini baskılamış ve inflamatuvar sürecin çözülmesine katkıda bulunmuştur. Bu bulgu, E-kaderin’in immün

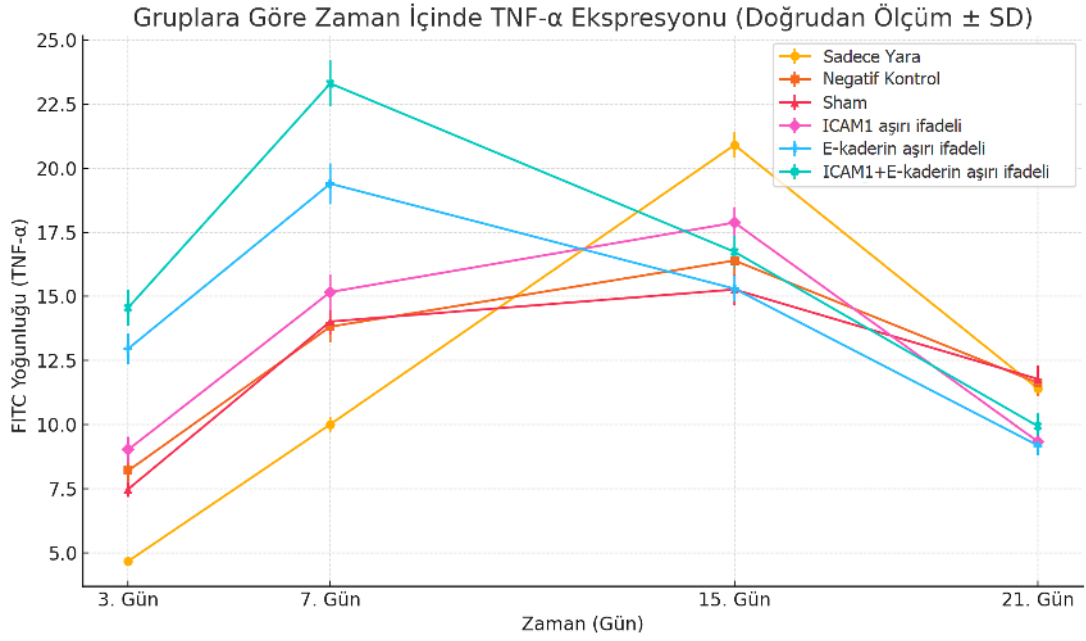
modülasyon açısından önemli bir etken olduğunu düşündürmüştür. 21. gün sonunda 6. grup olan ICAM1 + E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesine ait TNF- α ekspresyon seviyesinde 15. güne göre düşüş belirlenmiş ve meydana gelen düşüş herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna göre %13 oranında anlamlı ($p=0.006$) bir düşüş olmuştur. Bu grup, 7. günde en yüksek TNF- α düzeyini göstermesine rağmen 21. günde de anlamlı bir düşüş yaşamış ve bu düşüşün, yara iyileşme sürecinde inflamasyonun daha erken evrede çözülüp yeniden şekillenme fazını başlattığını ve modifiye hücrelerin dokuda etkili bir doku düzenlenmesi sağladığını göstermiştir. Yani bu grupta ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edilmesi, hücrelerin yara dokusuna maksimum tutunmasını ve organizasyonunu sağlamış; bu da pro-inflamatuvar TNF- α düzeyinin diğer gruplara göre 3. ve 7. günlerde daha yüksek seviyede eksprese olmasını sağlamıştır.



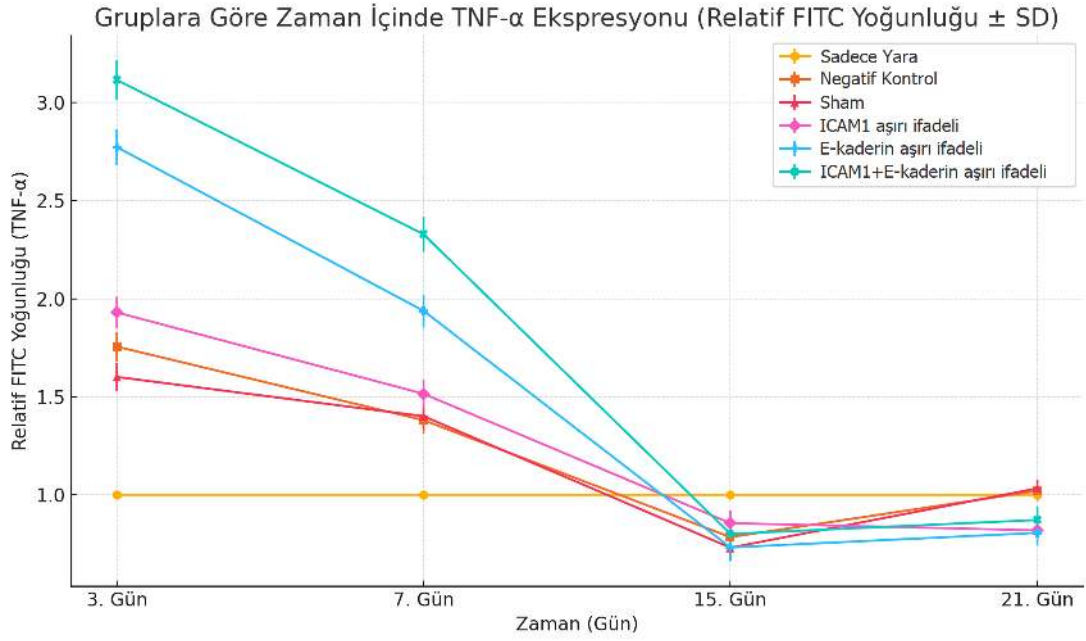
Şekil 60. 21. gün sonunda yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların TNF- α antikoru ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, kantitatif immüno floresan ile TNF- α antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.01$).

Gruplara göre zaman içinde TNF- α ekspresyonuna ait normalize edilmemiş (Şekil 61) ve normalize edilmiş (Şekil 62) şekilde incelendiğinde, inflamatuvar yanıtın zamansal dinamiklerinin genetik modifikasyonlu ADKH hücrelerinin etkisiyle nasıl şekillendiği açıkça görülmektedir. TNF- α , yara iyileşmesinin erken evrelerinde pro-inflamatuvar bir sitokin olarak önemli bir rol oynar; bu doğrultuda özellikle 3. ve 7. günlerde tüm gruplarda belirgin bir artış gözlemlenmiştir. 3. gün verilerinde E-kaderin ve ICAM1+E-kaderin aşırı ifade ADKH’lerinin verildiği gruplarda TNF- α düzeylerinin diğer gruplara kıyasla daha yüksek olması, bu hücrelerin yara mikroçevresine güçlü tutunarak immün hücrelerle etkileşimi artırdığını ve böylece akut inflamatuvar yanıtı şiddetlendirdiğini göstermektedir. 7. gün verileri ise bu bulguyu desteklemekte, özellikle çift gen modifikasyonlu grubun TNF- α seviyesinin en yüksek noktaya ulaştığı görülmektedir. Bu, yara bölgesinde hücrelerin aktive ettiği immün sistemin tam kapasiteyle çalıştığını ve doku temizliği ile yeniden şekillenme için hazırlık sürecinin yoğunlaştığını ortaya koymaktadır. Ancak 15. gün itibarıyla TNF- α düzeylerinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmektedir; bu azalma, inflamatuvar fazın tamamlanmakta olduğuna ve yara iyileşmesinin proliferatif faza geçtiğine işaret eder. 21. gün verileri bu eğilimi doğrular nitelikte olup, genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin verildiği gruplarda TNF- α ekspresyonunun yalnızca yara grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. TNF- α ekspresyonundaki bu düşüş, bu hücrelerin inflamatuvar süreci düzenleyerek aşırı immün yanıtı baskılayıcı etkilerini ve doku homeostazına katkılarını göstermektedir. Sonuç olarak, genetik olarak modifiye edilen ADKH’leri –özellikle ICAM1 ve E-kaderin birlikte aşırı ifade edildiğinde– erken dönemde inflamasyonu optimize ederken, geç dönemde TNF- α düzeylerini kontrollü biçimde baskılamış; bu da iyileşmenin dengeli bir şekilde ilerlediğini ve yeniden şekillenme fazının daha etkin yürütüldüğünü ortaya koymuştur. Bu grafiksel eğilim, genetik mühendislik yoluyla modifiye edilen hücrelerin yara iyileşme biyolojisinde zamana bağlı olarak nasıl farklı etkiler oluşturduğunu açıkça ortaya koyan güçlü bir bulgudur.



Şekil 61. Gruplara göre zaman içinde TNF- α ekspresyon düzeylerinin normalize edilmemiş değerleri (FITC yoğunluğu $\pm$ SD). Her bir grup için TNF- α düzeyleri 3., 7., 15. ve 21. günlerde doğrudan FITC floresan yoğunluğunun n=6 tekrar ölçümleriyle belirlenmiştir. ADKH'ler, yara bölgesine aşağıdaki farklı gruplar halinde uygulanmıştır: Herhangi bir uygulama yapılmamış Sadece yara (negatif referans kontrol), Modifiye edilmemiş ADKH (Negatif kontrol), sgNT + dCas9puro ile transdüklenmiş ADKH (Sham), ICAM1 aşırı ifade ADKH, E-kaderin aşırı ifade ADKH, ICAM1 ve E-kaderin çift aşırı ifade ADKH. Ölçümler, TNF- α antikoru ile yapılan FITC işaretlemeleri üzerinden elde edilmiştir. Grafik üzerinde her grup farklı bir sembolle temsil edilmiştir; hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.

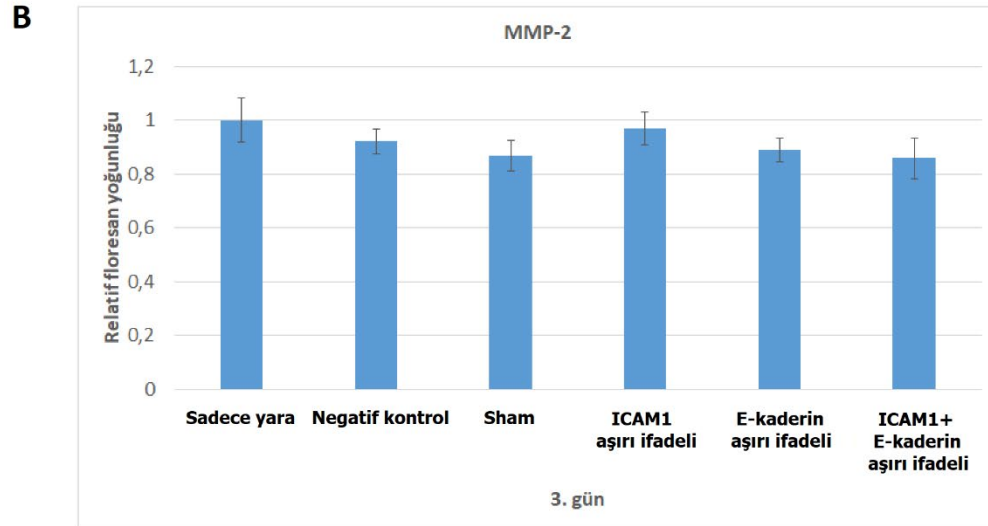
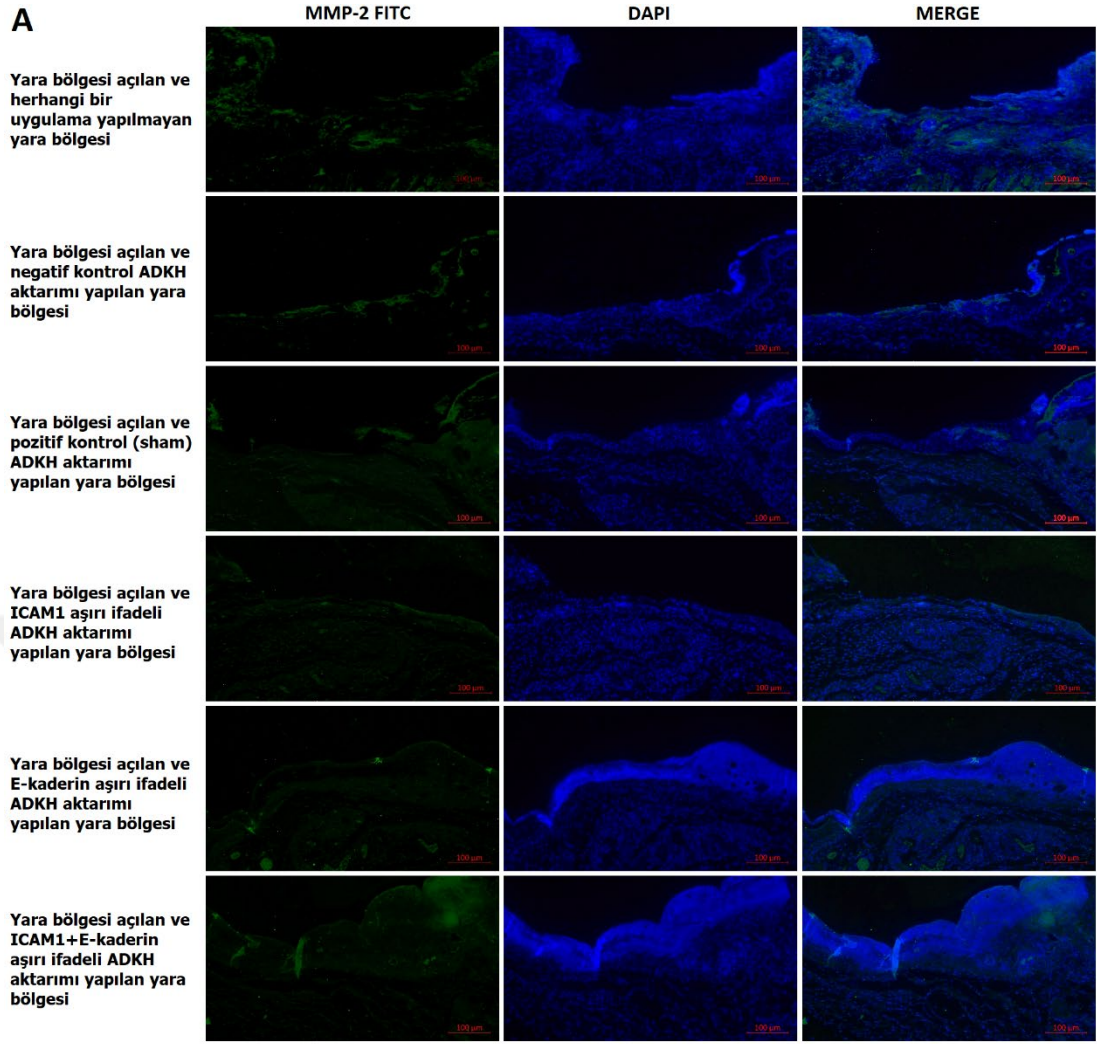


Şekil 62. Farklı genetik modifikasyonlara sahip ADKH'lerin yara bölgesindeki TNF- α ekspresyonuna etkisi (3., 7., 15. ve 21. günlerde Relatif FITC yoğunluğu $\pm$ SD). ADKH'ler, yara bölgesine aşağıdaki farklı gruplar halinde uygulanmıştır: Herhangi bir uygulama yapılmamış Sadece yara (negatif referans kontrol), Modifiye edilmemiş ADKH (Negatif kontrol), sgNT + dCas9puro ile transdüklenmiş ADKH (Sham), ICAM1 aşırı ifade ADKH, E-kaderin aşırı ifade ADKH, ICAM1 ve E-kaderin çift aşırı ifade ADKH. Veriler, IF ile TNF- α antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, "Sadece yara" grubuna göre normalize edilmiştir (n=6). Noktalar her bir zaman noktasındaki ortalama değeri temsil ederken, hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir

Bu çalışmada yara iyileşmesinde ECM'in yeniden şekillenmesi ve geçici "provizyonel matriks"in yıkımı açısından kritik öneme sahip olan MMP-2 düzeyleri, farklı gruplara ait yara dokularında dört ayrı zaman noktasında (3., 7., 15. ve 21. günlerde) değerlendirilmiştir. ECM'nin yeniden şekillenmesi ve geçici "provizyonel matriks"in yıkım fazında MMP-2'nin ekspresyonu, granülasyon dokusunun yeniden modellenmesi ve hücre göçü için gereklidir. Ayrıca, bu gene ait ekspresyon değerleri yara dokusundaki doğal fibroblast aktivitesi ve endojen onarım yanıtının bir göstergesidir. Dolayısıyla, bu çalışmada, 6 adet tam kat deri yarası oluşturulan erkek Albino BALB/c farelerinin 1. yara bölgesi herhangi bir tedavi uygulaması ya da ADKH implantasyonu yapılmadan bırakıldı, 2. yara bölgesine herhangi bir gen modifikasyonu uygulanmamış negatif kontrol ADKH'ler implante edildi, 3. yara

bölgesine herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen sgRNA ve dCas9 kompleksinin viral transdüksiyon ile aktarıldığı sham ADKH'leri implante edildi, 4. yara bölgesine ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi, 5. yara bölgesine E-kaderin RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi ve 6. yara bölgesine ise ICAM1 ve E-Kaderin RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'ler implante edildi ve böylece bir fare üzerinde 6 farklı yara grubu elde edilmiş oldu. Daha sonra ise bu 6. farklı gruba ait yara bölgeleri 3., 7., 15. ve 21. günlerde IF yöntemiyle ile MMP-2 antikoru ile analiz edilerek kantitatif MMP-2 ekspresyon verileri elde edildi. Elde edilen bulgular, ADKH'lerin yara bölgesine implantasyonu ile birlikte MMP-2 ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişiklikler meydana getirdiğini ortaya koymuştur.

3. gün sonunda elde edilen MMP-2 ekspresyon düzeyleri, herhangi bir uygulama yapılmayan yara grubuna (1. grup) göre normalize edildiğinde, diğer gruplarda sırasıyla %7,8 (2. grup), %13,2 (3. grup), %3,1 (4. grup), %11,0 (5. grup) ve %14,1 (6. grup) oranlarında bir azalma göstermiştir (Şekil 63). Bu oranlar her ne kadar MMP-2 düzeylerinde hafif bir düşüş eğilimi olduğunu gösterse de, yapılan istatistiksel analizlerde bu farklılıkların anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bu sonuç, genetik olarak modifiye edilmiş veya edilmemiş ADKH'lerinin yara mikroçevresine eklenmesinin MMP-2 ekspresyonu üzerinde erken fazda (3. gün) belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca bu bulgu, MMP-2'nin erken dönemdeki regülasyonunun büyük ölçüde yaranın doğal immünolojik cevabına bağlı olduğunu ve yara bölgesine ADKH aktarımının bu süreç üzerinde sınırlı bir değişiklik yarattığını düşündürmektedir.

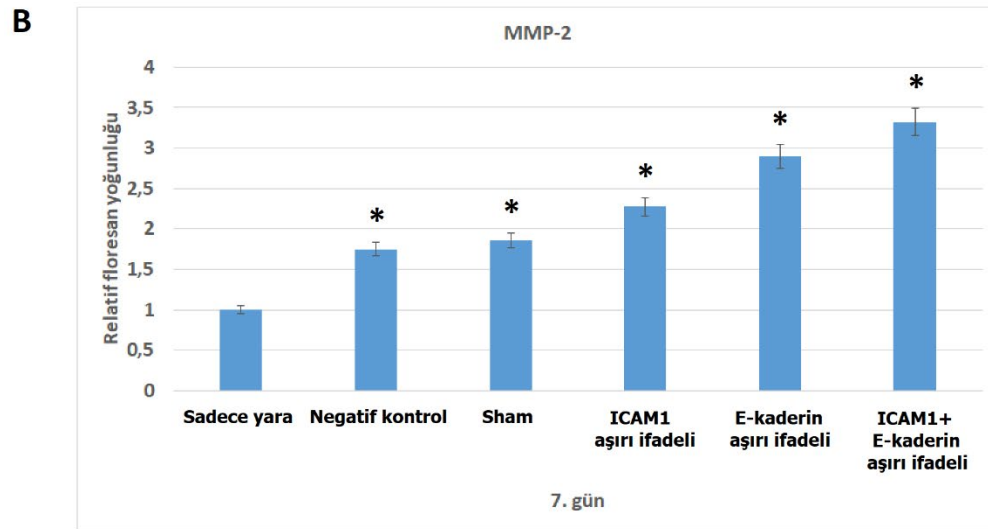
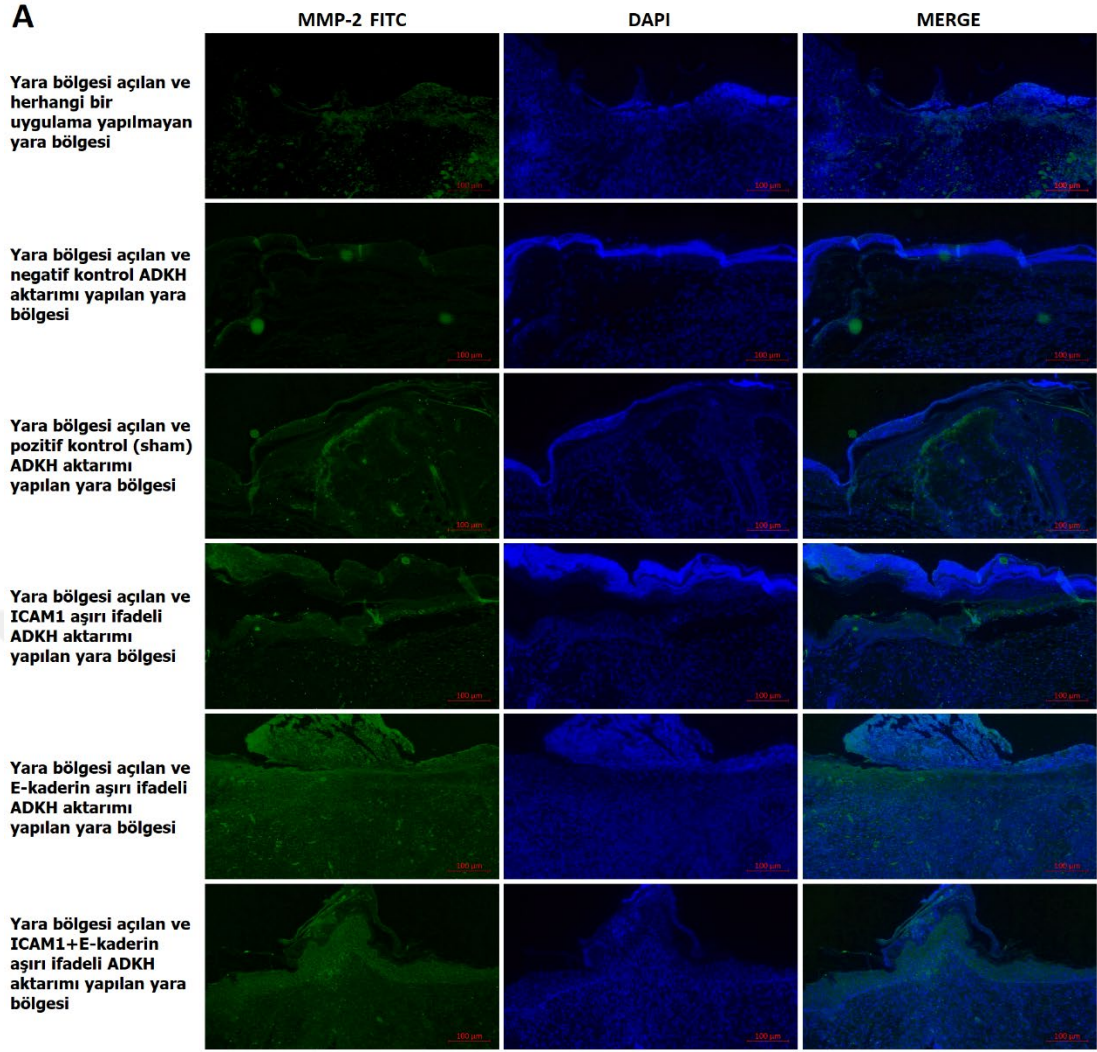


Şekil 63. 3. gün sonunda yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların MMP-2 antikoruna boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, kantitatif immüno floresan ile MMP-2 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6).

7. gün sonunda, herhangi bir uygulama yapılmayan 1. gruba ait yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyon seviyesi aynı grubun 3. gündeki ekspresyon seviyesine göre düşük bir artış göstermiştir (Şekil 64). Diğer grupların ekspresyon düzeyleri bu gruba göre normalize edilmiştir. 2. grup olan negatif kontrol grubundaki yara bölgesine ait MMP-2 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu herhangi bir uygulama yapılmayan sadece yara açılan kontrol grubuna (sadece yara) göre 7. günde %75 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. Şekil 64’den de anlaşılacağı üzere 7. günde bu grubun yara bölgesinde oluşumu tamamlanmış dermis bölgesindeki MMP-2 ekspresyon seviyesi, stratum granulosumun henüz oluşmadığı stratum basale ve stratum spinosumun yer aldığı epidermis bölgesi ile benzer seviyede kaldığı belirlenmiştir. ADKH’lerin eklenmesiyle yara mikroçevresindeki stromal yapı ile etkileşim artmış ve bu da MMP-2 sekresyonunu yükseltmiştir. Bu bulgu, mezenkimal kökenli ADKH’lerin matriks düzenlenmesinde aktif rol oynadığını göstermektedir. 3. grup olan pozitif kontrol sham grubundaki yara bölgesine ait MMP-2 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 7. günde %85 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. 2. grupla benzer şekilde bu grubun yara bölgesinde de oluşumu tamamlanmış dermis bölgesindeki MMP-2 ekspresyon seviyesi, stratum granulosumun henüz oluşmadığı stratum basale ve stratum spinosumun yer aldığı epidermis bölgesi ile benzer seviyede kaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, 2. ve 3. grupların arasında MMP-2 ekspresyonu bakımından anlamlı ($p=0.972$) bir farklılık görülmemiştir. 4. grup ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna kıyasla 7. günde %127 oranında anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. Bu grubun yara bölgesinde oluşumu tamamlanmış dermis bölgesindeki MMP-2 ekspresyon seviyesinin ve stratum granulosumun henüz oluşmadığı stratum basale ve stratum spinosumun yer aldığı epidermis bölgesi ile benzer seviyede belirlenmiştir. ICAM1 ekspresyonu, hücrelerin konak dokuya sıkı şekilde tutunmasını sağlamış; bu durum, stromal matrikse entegre olan hücrelerin daha fazla MMP-2 üretmesine yol açmıştır. 5. grup E-kaderin aşırı ifade ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna göre 7. günde %189 oranında belirgin anlamlı bir artış ($p<0.0001$) göstermiştir. Diğer

gruplardan farklı olarak, bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuştur. Fakat, MMP-2 ekspresyonu hem dermis hem de epidermis bölgesinde birbirine benzer seviyelerde kalmıştır. E-kaderin aşırı ifadesi, hücre-hücre adezyonunu kuvvetlendirerek kollektif hücre migrasyonunu desteklemiş ve bu etkileşimler provizyonel matriks üzerindeki yıkıcı etkileri artırmış ve böylece geçici matriksin yerini alacak olan olgun doku matriksinin oluşumunu hızlandırmıştır. 6. grup olan ICAM1 + E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna göre 7. günde %232 artış ile tüm gruplar arasında en yüksek anlamlı ekspresyon değeri olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). 5. grupla benzer şekilde bu grubun yara bölgesinde yüksek seviyelerde MMP-2 ekspresyonuna sahip dermis ve epiderm (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) bölgeleri oluşmuştur. ICAM1 ve E-kaderin'in birlikte aşırı ifade edilmesi, hem hücre-matriks hem de hücre-hücre etkileşimlerini maksimuma çıkarmış; bu durum transplante edilen hücrelerin yara bölgesine hem daha güçlü tutunmasına hem de matrikste aktif rol almasına neden olmuştur. Artan MMP-2 üretimi, yara bölgesindeki ECM yeniden şekillenme sürecini hızlandırmış ve iyileşmeyi desteklemiştir.

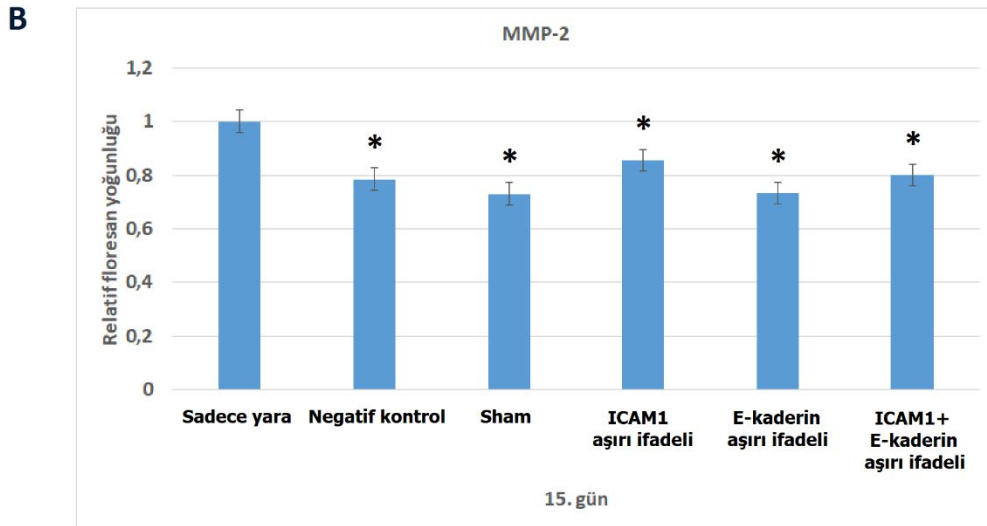
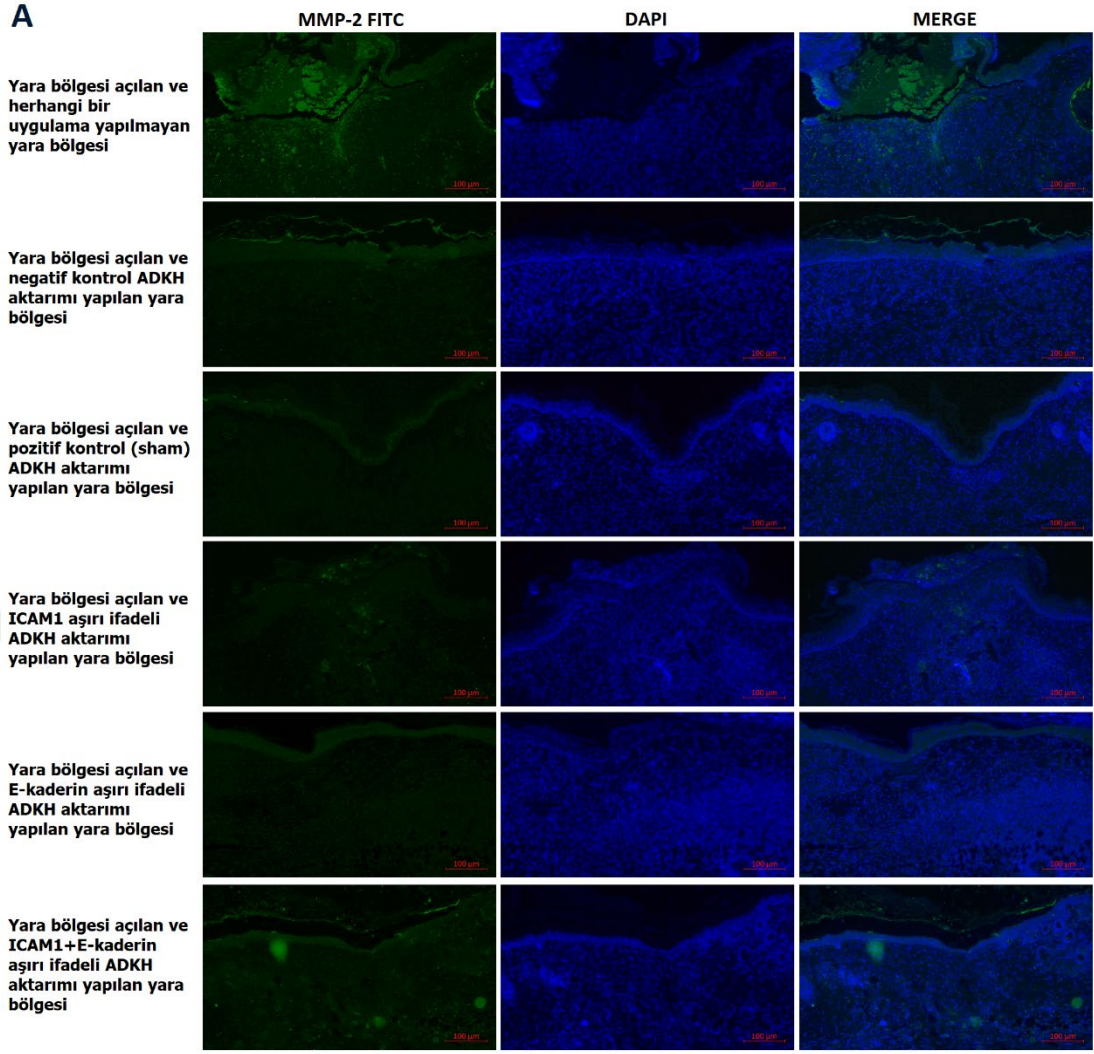


Şekil 64. 7. gün sonunda yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların MMP-2 antikoru ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, kantitatif immüno Floresan ile MMP-2 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.0001$).

15. gün sonunda, herhangi bir uygulama yapılmayan 1. gruba ait yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyon seviyesi aynı grubun 7. gündeki ekspresyon seviyesine göre anlamlı ($p < 0.0001$) belirgin bir artış göstermiştir (Şekil 65). 15. gün, doku yeniden yapılanma sürecinin önemli bir dönüm noktası olup, MMP-2 ekspresyonunun hâlâ yüksek seyretmesi, yaranın yeniden şekillenme aşamasında olduğunu göstermektedir. Ayrıca Şekil 65’de de görüldüğü gibi özellikle yara bölgesi üzerinde bulunan yara kabuğunda MMP-2 ekspresyonu bariz bir şekilde görülmektedir. Diğer grupların ekspresyon düzeyleri ise bu gruba göre normalize edilmiştir. 2. grup olan negatif kontrol grubundaki yara bölgesine ait MMP-2 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 15. günde %22 oranında anlamlı bir düşüş ($p < 0.0001$) göstermiştir. 15. günde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve her iki bölgede de benzer seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. ADKH’ler yara bölgesine yerleştikten sonra erken dönemde MMP-2 ekspresyonunu artırarak provizyonel matriksin yıkımını ve olgun ekstrasellüler matriksin oluşumunu sağlamış ve 15. gün itibarıyla bu üretim doğal olarak gerilemiştir. 3. grup olan pozitif kontrol sham grubundaki yara bölgesine ait MMP-2 ekspresyonuna ait floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 15. günde %27 oranında anlamlı bir düşüş ($p < 0.0001$) göstermiştir. 2. gruba benzer şekilde bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve her iki bölgede de benzer seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, 2. ve 3. grupların arasında MMP-2 ekspresyonu bakımından anlamlı ($p = 0.852$) bir farklılık görülmemiştir. Bu durum, lentiviral modifikasyonun MMP-2 üretimi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir. ADKH’ler modifikasyondan bağımsız olarak yara bölgesine adapte olmuş, yeniden şekillenme sürecine katkı sağladıktan sonra, stabilizasyona geçişle birlikte MMP-2 seviyeleri düşmüştür. 4. grup ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna kıyasla 15. günde %15 oranında anlamlı bir düşüş ($p < 0.0001$) göstermiştir. Bu grubun

yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve her iki bölgede de benzer seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. ICAM1 aşırı ifadesi, hücrelerin yara bölgesine daha iyi tutunmasını sağlamış ve erken fazda MMP-2 ekspresyonunu tetiklemiştir. 5. grup E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna göre 15. günde %27 oranında belirgin anlamlı bir düşüş ($p<0.0001$) göstermiştir. Bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve her iki bölgede de benzer seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. E-kaderin'in hücre-hücre bağlarını güçlendirmesi, ADKH'lerin yara dokusuna daha etkili tutunmasını sağlamış; bu durum erken fazda MMP-2 aktivitesine yol açmıştır. Ancak yine, 15. gün civarında bu aktivitenin azalması normal bir fizyolojik sonuçtur ve doku bütünlüğünün sağlandığını gösterir. 6. grup olan ICAM1 + E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna göre 15. günde %20 oranında belirgin anlamlı bir düşüş ($p<0.0001$) göstermiştir. Bu grubun yara bölgesinde dermis ve epidermisin 3 katmanında (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) oluşmuş ve her iki bölgede de benzer seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. İki adezyon molekülünün birlikte aşırı ifadesi sayesinde ADKH'ler yara dokusunda yüksek stabilite kazanmıştır. Bu gruptaki MMP-2 ekspresyonunun düşüşü, dokuya optimal şekilde entegre olan hücrelerin yeniden şekillenme sürecini erken dönemde tamamladığını ve artık proteolitik aktiviteyi azaltarak iyileşmenin geç fazına geçtiklerini göstermektedir. ADKH'lerin transplante edildiği gruplarda gözlemlenen MMP-2 ekspresyon düşüşü, özellikle ADKH'lerin kök hücre davranışları ile ilişkilidir. Kök hücrelerin erken dönemde (ör. 7. gün) MMP-2 aracılığıyla ECM yıkımı ve hücre göçüne katkı sağladığı, ancak 15. günden itibaren ekspresyonu düşürdüğü bilinmektedir. Bu biyolojik regülasyon, yara bölgesinde aşırı doku yıkımını engelleyerek matriks stabilizasyonu ve epidermal yeniden şekillenme sürecini desteklemektedir

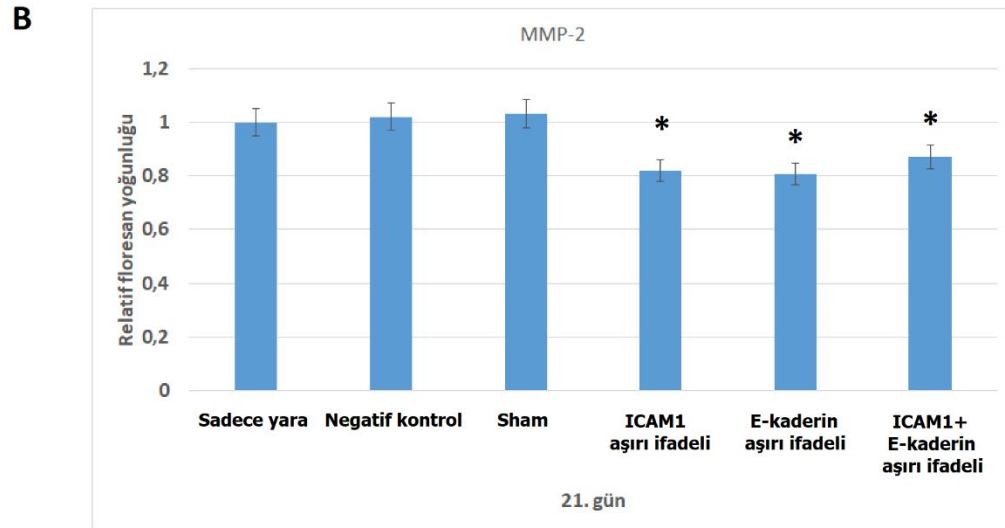
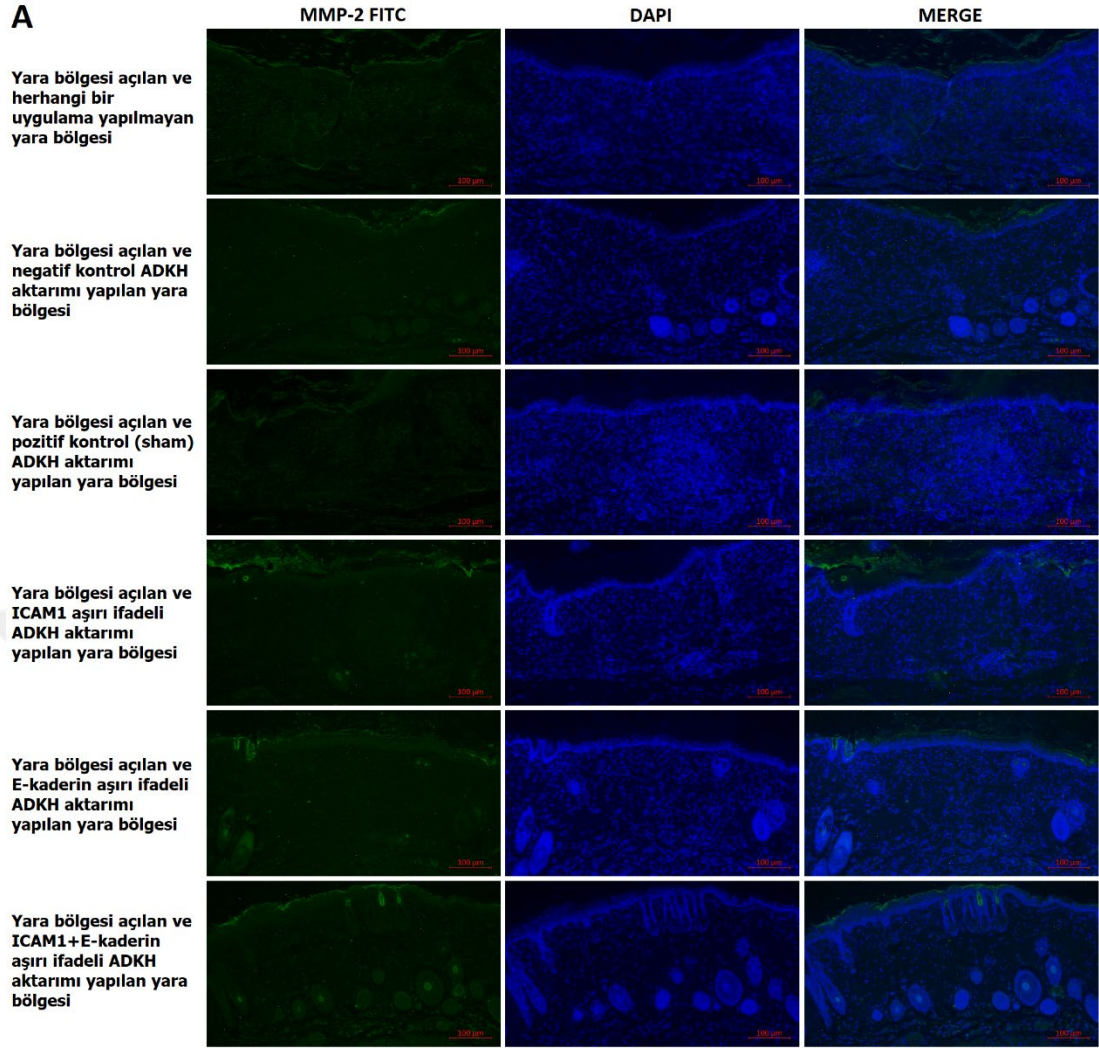


Şekil 65. 15. gün sonunda yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların MMP-2 antikoru ile boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

analizi. Veriler, kantitatif immüno Floresan ile MMP-2 antikorunu kullanılarak elde edilen FITC Floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.0001$).

21. gün sonunda, herhangi bir uygulama yapılmayan 1. gruba ait yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyon seviyesi aynı grubun 15. günündeki ekspresyon seviyesine göre anlamlı ($p < 0.0001$) belirgin bir düşüş göstermiştir (Şekil 66). 21. gün sonunda doku iyileşme sürecinin sonlanma evresine yaklaşıldığı ve yeniden şekillenme fazının tamamlanmaya başladığı görülür. Diğer grupların 15. gününde tamamlanmış olan dermis ve epidermin 3 katmanı (stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum) bu grupta 21. günde tamamlanmış ve MMP-2 ekspresyonunun her iki bölgede de benzer seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. Diğer grupların ekspresyon düzeyleri ise bu gruba göre normalize edilmiştir. 2. grup olan negatif kontrol grubundaki yara bölgesine ait MMP-2 ekspresyonuna ait Floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 21. günde %2 oranında bir artış ($p = 0.996$) göstermiştir. Artış oldukça sınırlı olmakla birlikte, ADKH’lerin erken fazda ECM dönüşümüne katkı sunduğu, ancak 21. gün sonunda bu aktivitenin fizyolojik olarak azalarak yeniden şekillenme sürecini erken başlattığını ancak geç dönemde baskılanan MMP-2 ekspresyonu ile matriks stabilizasyonuna geçiş yaptıklarını göstermektedir. 3. grup olan pozitif kontrol sham grubundaki yara bölgesine ait MMP-2 ekspresyonuna ait Floresan sinyal yoğunluğu sadece yara grubuna göre 21. günde %3 oranında bir artış ($p = 0.990$) göstermiştir. Bununla birlikte, 2. ve 3. grupların arasında 21. gün MMP-2 ekspresyonu bakımından anlamlı ($p = 0.992$) bir farklılık görülmemiştir. 4. grup ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna kıyasla 21. günde %18 oranında anlamlı bir düşüş ($p < 0.0001$) göstermiştir. ICAM1 ekspresyonunun ADKH’lerde artırılması, hücrelerin yara mikroçevresine daha iyi tutunmasını sağlamış; bu da erken fazda daha güçlü bir ECM yeniden şekillenme aktivitesini tetiklemiştir. Ancak 21. gün sonunda MMP-2 düzeyindeki düşüş, bu hücrelerin matriks reorganizasyonunu erken tamamladığını ve artık olgun ECM yapısının korunduğunu göstermektedir. 5. grup E-kaderin aşırı ifade ADKH’lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna göre 21. günde %20 oranında belirgin anlamlı bir düşüş ($p < 0.0001$) göstermiştir. E-kaderin, hücreler arası adezyonun artmasına neden olarak

ADKH'lerin doku içinde stabil kalmasını sağlamıştır. Bu durum, erken dönemde aktif bir yeniden şekillenme süreci başlatarak MMP-2 salınımını artırmış; ancak geç dönemde bu aktivite doğal bir şekilde baskılanarak doku olgunlaşması sağlanmıştır. 6. grup olan ICAM1 + E-kaderin aşırı ifade ADKH'lerin uygulandığı yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonu sadece yara grubuna göre 21. günde %13 oranında belirgin anlamlı bir düşüş ($p<0.0001$) göstermiştir. Her iki adezyon geninin birlikte aşırı ifade edilmesi, hücrelerin yara dokusunda yüksek stabilite ile kalmasını ve ECM ile daha etkili etkileşime girmesini sağlamıştır. Bu gruptaki erken dönemde yüksek MMP-2 ekspresyonu, doku yeniden şekillenme sürecini hızlandırmış; 21. gün sonunda ise azalan MMP-2 düzeyi, olgun ECM yapısının başarıyla kurulduğunu göstermiştir. 21. gün sonunda, tüm gruplarda MMP-2 düzeylerinde genel bir azalma eğilimi gözlenmiştir. Bu durum, erken fazda aktive olan doku yenilenmesi sürecinin, geç fazda yerini doku stabilizasyonuna bıraktığını doğrulamaktadır. ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifade edilen ADKH'ler ile yapılan uygulamalar, yeniden şekillenme sürecini hızlandırarak MMP-2'nin fizyolojik zamanlamaya uygun şekilde baskılanmasını sağlamış; böylece matür ECM oluşumu desteklenmiştir. Bu sonuçlar, ADKH'lerin genetik olarak modifiye edilmesinin, yalnızca tutunmayı artırmakla kalmayıp, doku onarımının zamanlamasını da etkileyebileceğini göstermektedir.

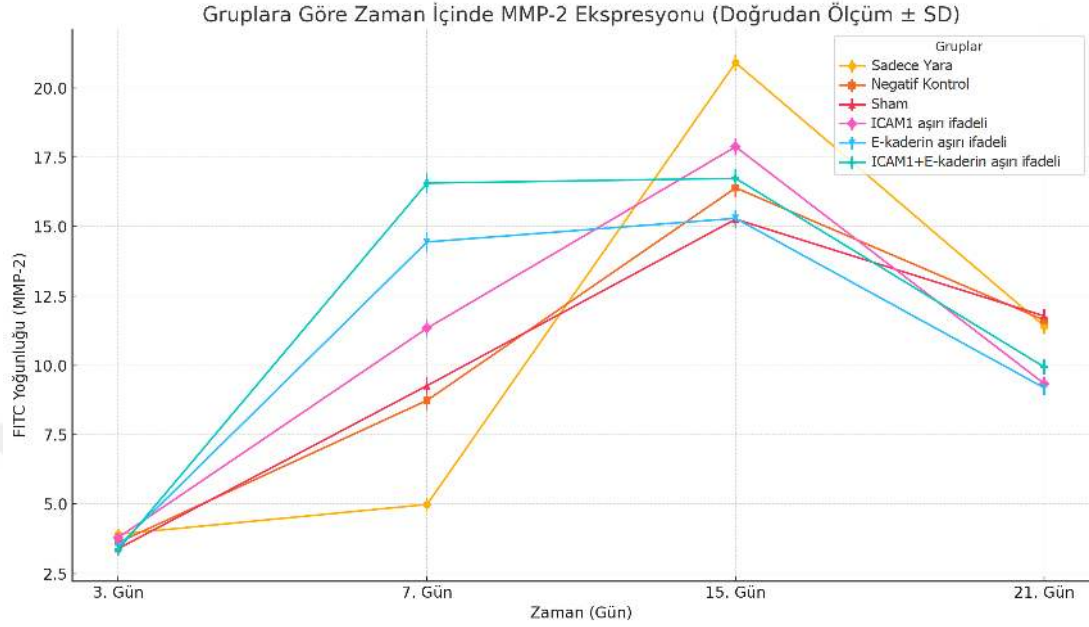


Şekil 66. 21. gün sonunda yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna ait IF görüntüleri ve kantitatif analiz verileri. **(A)** Yara bölgesinden alınan dokuların MMP-2 antikoruna boyanarak elde edilmiş ters faz kontrast floresan mikroskop görüntüleri (10X büyütme). **(B)** Aynı dokulara ait FITC floresan sinyal yoğunluklarının kantitatif

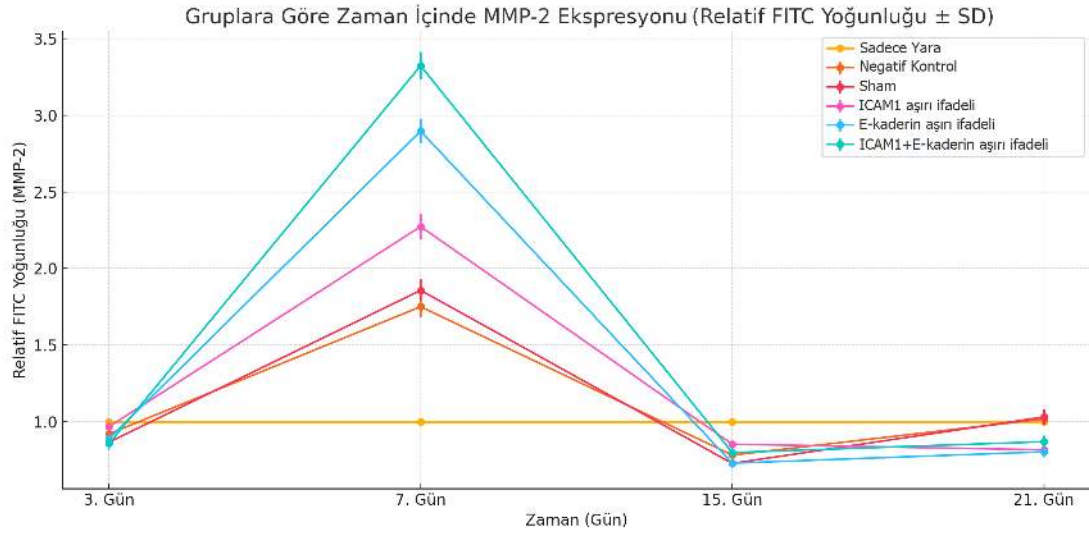
analizi. Veriler, kantitatif immüno Floresan ile MMP-2 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, “Sadece yara” grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($*p < 0.0001$). (10X Büyütme)

Gruplara göre zaman içinde MMP-2 ekspresyonuna ait Şekil 67 ve Şekil 68 incelendiğinde, tüm gruplarda MMP-2 seviyelerinin zamanla anlamlı değişimler gösterdiği ve bu değişimlerin yara iyileşme sürecindeki farklı evreleri yansıttığı anlaşılmaktadır. 3. günde MMP-2 ekspresyon düzeyleri tüm gruplarda oldukça düşük seviyelerde kalmış, bu da erken inflamasyon ve matriks yeniden düzenleme sürecinin henüz başlangıç aşamasında olduğunu göstermektedir. Bu dönemde esas olarak nötrofiller ve makrofajlar aktiftir, yara bölgesini temizlerler. Ancak sadece yara grubu hariç diğer tüm gruplarda 7. günde belirgin bir artış gözlenmiştir; özellikle E-kaderin ve ICAM1+E-kaderin aşırı ifade gruplarında MMP-2 seviyeleri, sadece yara grubuna göre 2,5–3 kat artmıştır. Bu durum, modifiye ADKH'lere yara bölgesinde daha iyi tutunarak MMP-2 üretimini artırdığını ve böylece erken dönemde aktif bir ECM'in yeniden şekillenme süreci başlattığını düşündürmektedir. 15. günde ise yalnızca yara grubunda MMP-2 ekspresyon seviyesi yükselmiş, diğer tüm gruplarda düşüş gözlenmiştir. Bu düşüş, ADKH'ler erken dönemde MMP-2 salarak ECM yeniden yapılanmasını başlattığını, ancak 15. günde artık bu süreci tamamlayarak ekspresyonlarını baskıladığını göstermektedir. 21. güne gelindiğinde ise tüm gruplarda belirgin bir azalma ile MMP-2 düzeyleri birbirine oldukça yaklaşmıştır. Sadece yara, negatif kontrol ve sham gruplarında MMP-2 ekspresyon seviyesi diğer modifiye ADKH transplante edilen gruplara göre bir miktar yüksek kalmıştır. Bu evredeki düşüş, kök hücrelerin erken yeniden şekillenme sonrası MMP-2 üretimini baskılayarak olgun ECM'nin stabilitesine katkı sunduğunu göstermektedir. Özellikle ICAM1 ve E-kaderin aşırı ifadeli ADKH gruplarında bu baskılanma daha güçlüdür. Bu durum, bu hücrelerin dokuya tutunmasının sadece erken yeniden şekillenmeyi değil, geç fazda matür ECM oluşumunu da düzenlediğini göstermektedir. Sonuç olarak Şekil 67 ve Şekil 68, ADKH'lerin özellikle genetik olarak modifiye edilmiş versiyonlarının yara bölgesinde erken dönemde matriks yeniden yapılanmasını hızlandırdığı, ancak ilerleyen dönemlerde fizyolojik şekilde MMP-2 ekspresyonunu baskılayarak doku stabilizasyonuna katkı sağladığını ortaya koymaktadır. Bu farklılaşmalar, ADKH'lerin

MMP-2 üzerinden iyileşme sürecinin evrelerine uyum sağladığını ve genetik modifikasyonların bu süreci zamanlama açısından etkilediğini net biçimde göstermektedir.



Şekil 67. Gruplara göre zaman içinde MMP-2 ekspresyon düzeylerinin normalize edilmemiş değerleri (FITC yoğunluğu $\pm$ SD). Her bir grup için MMP-2 düzeyleri 3., 7., 15. ve 21. günlerde doğrudan FITC floresan yoğunluğunun n=6 tekrar ölçümleriyle belirlenmiştir. ADKH'ler, yara bölgesine aşağıdaki farklı gruplar halinde uygulanmıştır: Herhangi bir uygulama yapılmamış Sadece yara (negatif referans kontrol), Modifiye edilmemiş ADKH (Negatif kontrol), sgNT + dCas9puro ile transdüklenmiş ADKH (Sham), ICAM1 aşırı ifade ADKH, E-kaderin aşırı ifade ADKH, ICAM1 ve E-kaderin çift aşırı ifade ADKH. Ölçümler, MMP-2 antikoru ile yapılan FITC işaretlemeleri üzerinden elde edilmiştir. Grafik üzerinde her grup farklı bir sembolle temsil edilmiştir; hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.



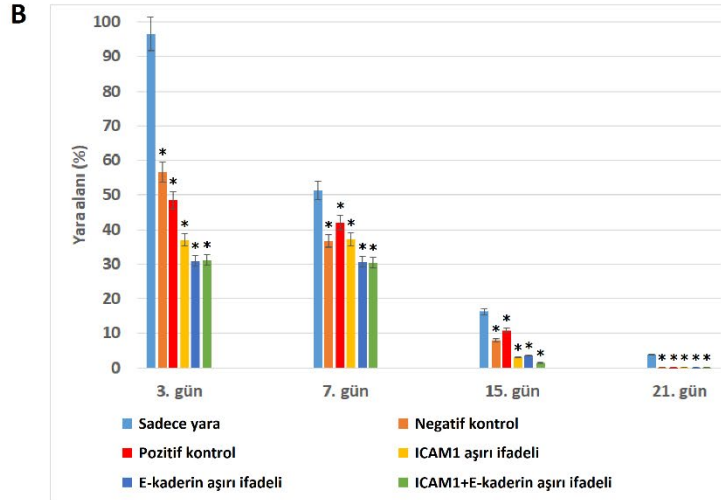
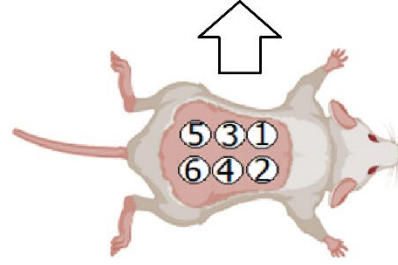
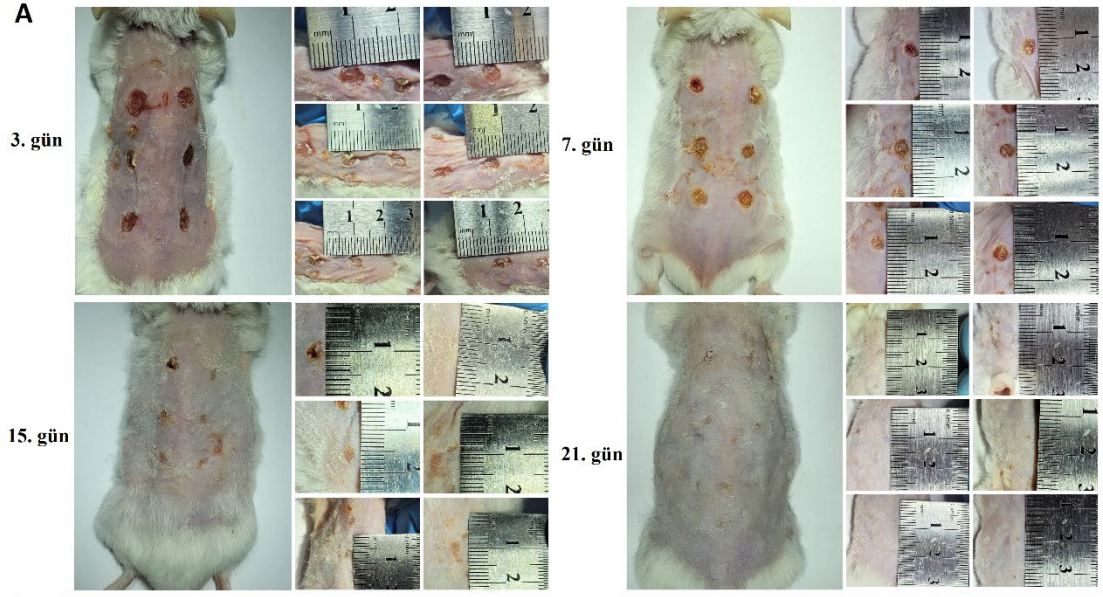
Şekil 68. Farklı genetik modifikasyonlara sahip ADKH'lerin yara bölgesindeki MMP-2 ekspresyonuna etkisi (3., 7., 15. ve 21. günlerde Relatif FITC yoğunluğu $\pm$ SD). ADKH'ler, yara bölgesine aşağıdaki farklı gruplar halinde uygulanmıştır: Herhangi bir uygulama yapılmamış Sadece yara (negatif referans kontrol), Modifiye edilmemiş ADKH (Negatif kontrol), sgNT + dCas9puro ile transdüklenmiş ADKH (Sham), ICAM1 aşırı ifadeli ADKH, E-kaderin aşırı ifadeli ADKH, ICAM1 ve E-kaderin çift aşırı ifadeli ADKH. Veriler, MMP-2 antikoru kullanılarak elde edilen FITC floresan yoğunluklarına dayanmaktadır. Her grup için değerler, "Sadece yara" grubuna göre normalize edilmiştir (n=6). Noktalar her bir zaman noktasındaki ortalama değeri temsil ederken, hata çubukları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.

3.1.16. Makroskobik İncelemeler ve Yara Kapanma Hızı Tayini

Farelerin sırtında 5 mm'lik pucnh ile oluşturulan tam kat deri defektlerinin 3, 7, 15 ve 21. günlerdeki in vivo analizi sonucunda açık kalan yara yüzdeleri incelendiğinde, genetiği değiştirilmiş ADKH'lerin yara iyileşmesi üzerindeki etkisi kesin olarak ortaya konmuştur. 3. gün sonunda, hiçbir müdahale uygulanmayan "sadece yara" grubunda açık kalan yara yüzdesi ~%96 ile anlamlı derecede ($p<0.0001$) tüm gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu yüzde, yaranın inflamatuvar fazda olduğunu ve iyileşmenin henüz başlamadığını doğrulamaktadır. Buna karşılık, negatif kontrol grubunda bu oran ~%56, sham grubunda ~%48, ICAM1 aşırı ifade grubunda ~%37, E-kaderin aşırı ifade grubunda ~%31 ve ICAM1+E-kaderin aşırı ifade grubunda ise ~%31 olarak ölçülmüştür. Yara açıklığındaki bu düşüşler, genetik olarak modifiye edilmiş ADKH'lerin implante edildikleri dokuda daha erken tutunmalarını

sağlayarak hücrel organizasyonu sağladığını göstermektedir. Yara kapanma mekanizması 7. günde proliferatif faza ilerlemesine rağmen, açık yara oranı "sadece yara" grubunda ~%51'e düşmüştür. Diğer gruplardaki açık yara oranı, negatif kontrol grubunda ~%36, sahte grupta ~%42, ICAM1 aşırı ifade grubunda ~%37, E-kaderin aşırı ifade grubunda ~%30 ve ICAM1+E-kaderin aşırı ifade grubunda ise ~%30 olmuştur. Özellikle E-kadherin ve ICAM1+E-kaderin ADKH'lerinin yara bölgelerine verildiği gruplardaki bu azalma, bu hücrelerin hücre-hücre tutunmasını ve kolektif göçü artırarak epitelizeasyonu hızlandırdığını göstermekte olup, tüm gruplara göre açık yara kalma oranı en düşük grup anlamlı bir şekilde ($p<0.0001$) ICAM1+E-kaderin ADKH'lerinin yara bölgelerine verildiği grup olmuştur. 15. günde, hiçbir müdahale uygulanmayan "sadece yara" grubunda açık yara oranı ~%16'ye düşmüştür. Diğer tüm gruplarda açık yara oranı negatif kontrol grubunda ~%8, sham grubunda ~%10, ICAM1 aşırı ifadeli grubunda ~%3, E-kaderin aşırı ifade grubunda ~%3 ve ICAM1+E-kaderin aşırı ifadeli grubunda ~%1 olmak üzere neredeyse tamamen iyileşmiştir. Bu oran, özellikle ICAM1+E-kaderin kombinasyonunda ~%1'e düşmüştür. Bu da, bu hücre kombinasyonunun ECM ile etkileşime girme yeteneğini artırdığını ve dokunun ilk organizasyonunda etkili bir sonuç verdiğini göstermektedir. ICAM1 ve/veya E-kaderin aşırı ifadesinin sağlandığı yara gruplarında yara açıklığı yüzdesi belirgin bir şekilde diğer tüm gruplara göre anlamlı bir şekilde ($p<0.0001$) düşük kalmıştır. 21. günde, "sadece yara" grubunda ~%3'lük küçük bir açık yara alanı kalırken, tüm ADKH gruplarında yara iyileşmesi tamamlanmıştır (%0 açık yara).

Son olarak, tüm günler ele alındığında, ICAM1 ve E-kadherin genlerini aşırı ifade eden ADKH'lerin yara dokusuna erken tutunmasında artış açısından göçü artırmakla kalmayıp, aynı zamanda yaranın iyileşme sürecini tamamlamak için geç fazda dahi olgun doku matriksi oluşumunu da sağladığı belirgindir. Ayrıca, ICAM1+E-kaderin genlerinin kombine bir şekilde aşırı ifadesinin erken fazda açık yara oranını azaltmasının yanı sıra en kısa iyileşme süresini sağlamadığı bu analiz sonuçlarında görülmektedir (Şekil 69).



Şekil 69. İn vivo olarak fareler üzerinde genetik olarak modifiye edilmiş ve edilmemiş ADKH'lerin uygulandığı yara bölgelerinin 3., 7., 15. ve 21. günlerdeki kapanma oranlarının analizi. **(A)** 3., 7., 15. ve 21. günlerdeki yara bölgelerinin gruplandırılması: 1. grup, herhangi bir uygulama yapılmayan ve hücre verilmeyen sadece tam kat deri defekti uygulanan yara bölgesi; 2. grup, herhangi bir gen modifikasyonu uygulanmamış negatif kontrol ADKH'lerin implante edildiği yara bölgesi; 3. grup, herhangi bir gen bölgesini hedeflemeyen sgRNA ve dCas9 kompleksinin viral transdüksiyon ile aktarıldığı sham ADKH'lerin implante edildiği bölgesi; 4. grup,

ICAM1 RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'lerin implante edildiği bölgesi; 5. grup, E-kaderin RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'lerin implante edildiği bölgesi; 6. grup, ICAM1 ve E-Kaderin RNA ekspresyonu artırılmış ADKH'lerin implante edildiği yara bölgesi **(B)** 3., 7., 15. ve 21. günlerdeki uygulama yapılan yara bölgelerinin açık kalan yara yüzdesi. Her grup için değerler, "Sadece yara" grubuna göre normalize edilmiştir (ortalama $\pm$ SD, n=6). Veri çubuklarının üzerindeki yıldız, negatif kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (* $p < 0.0001$). (10X Büyütme)



3.2. TARTIŞMA

Kök hücreler, kendini yenileme kapasitesi ve çok yönlü farklılaşma potansiyeli gibi önemli özellikleri sayesinde doku yenilenmesi ve yara iyileşmesi gibi karmaşık biyolojik süreçlerde, hücre temelli tedavi stratejileri arasında giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Özellikle MKH'ler immünmodülatör özellikleri, dokuya özgü mikroçevreye adaptasyon yetenekleri ve çeşitli mekanizmaları aktive edebilmeleri nedeniyle tercih edilen hücre tiplerindendir.

E-kaderin ve ICAM1 genleri ise, hücre-hücre etkileşimleri, adezyon, immün modülasyon ve hücre migrasyonu inflamasyon yanıtlarının düzenlenmesi gibi yara iyileşmesinin temel bileşenlerinde rol oynamaktadır.

Tez kapsamında yapılmış olan bu çalışmada, CRISPRa/dCas9 sistemi ile E-kaderin ve ICAM1 gen ifadeleri artırılarak genetik olarak düzenlenmiş ADKH'lerin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, *in vivo* fare yara modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Yara iyileşmesi inflamasyon, epitelizasyon, neoanjiyogenez, proliferasyon ve kolajen matriks oluşumu gibi bir dizi adımları içeren karmaşık bir süreçtir (Peña ve Martin, 2024; Adib ve ark., 2022). Bu karmaşık süreç EGF, TGF- β , PDGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), VEGF, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), IL ailesi ve TNF- α gibi çok sayıda büyüme faktörü, sitokin ve kemokinler tarafından gerçekleştirilir ve düzenlenir (Zarei ve Soleimaninejad, 2018; Dinh ve ark., 2015; Viaña-Mendieta ve ark., 2022). Ayrıca, büyüme faktörleri ve sitokinlerin lokal veya topikal uygulanmasının deri yaralarının onarımını desteklediği bildirilmiştir (Grazul-Bilska ve ark., 2003; Barrientos ve ark., 2008). Bununla birlikte, MKH'lerin deri yaralanmalarında, yara kapanmasını, yeniden epitelizasyonu, hücreliliği ve anjiyogenezini uyarak çeşitli hayvan modellerinde yara iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir (Kim ve Suh, 2010; Borena ve ark., 2010; Volkova ve ark., 2023; Xu ve ark., 2022). MKH'ler yara iyileşmesini implante edildikleri bölgedeki doku hücrelerine doğrudan farklılaşarak veya TNF- α , IL-10, VEGF, IGF-1 gibi parakrin faktörlerin salgılanması yoluyla doku rejenerasyonunu ve yara onarımını uyarak gerçekleştirdikleri bildirilmiştir (Zaib ve ark., 2024; Farzaneh ve ark., 2019; Mancuso ve ark., 2020).

CRISPR/Cas sistemi MKH'lerde kullanılarak başarılı bir şekilde orak hücre anemisi ve beta talasemi gibi birçok genetik ve kronik hastalığın tedavisine yönelik olarak kullanılmıştır (Frangoul ve ark., 2021; Lu ve ark., 2020). Ayrıca, CRISPR sisteminin MKH'lerde kullanılmasıyla deri ve kornea yara iyileşmesine yönelik yapılan bazı çalışmalarda mevcuttur (Chang ve ark., 2018; Li ve ark., 2023; Srifa ve ark., 2020). Yapılan bu çalışmalarda, hem Cas9 hem de dCas9 sistemleri aracılığıyla gerçekleştirilen MKH'ler üzerindeki gen düzenleme uygulamalarında, yara iyileşmesini hızlanmasını sağlayan sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, giderek artan sayıda kanıt, MKH'lerin yaralı bölgede tutunmasının zayıf ve dolayısıyla parakrin sinyalleşmesinin beklenenden daha sınırlı olduğunu göstermektedir (Tanaka ve ark., 2022; Li ve ark., 2024; Weiliang ve Lili, 2021).

CRISPRa/dCas teknolojisi, klasik gen transfer yöntemlerinin aksine, genoma kalıcı bir hasar vermeksizin hedef genlerin promotör bölgeleri üzerinden transkripsiyonel aktivasyonu artırmakta ve böylece hücrelerin doğal genetik dengesine müdahale etmeden fonksiyonel iyileştirme sağlama potansiyeli sunmaktadır.

Bu sebeple, tez kapsamında yapılmış olan bu çalışmada, MKH'lerin dermal yara bölgesinde tutunma kabiliyetlerinin artırılması amaçlanmıştır. Bunun için, çalışmada fare adipoz dokusundan elde edilen ADKH'lerde ICAM1 ve/veya E-kaderin adezyon ilişkili genlerin ekspresyonları lentivirüs aracılıklı CRISPRa/dCas9 sistemi ile artırılmıştır. ICAM1 ve/veya E-kaderin gen ekspresyonları artırılmış ADKH'lerin ise in vitro analizleri tamamlandıktan sonra in vivo şartlar altında farelerin sırtında açılan tam kat yara bölgelerine implante edilerek yara iyileşmesi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Fare adipoz dokusundan kollajenaz sindirimi ile başarıyla elde edilen kök hücreler, ilk kültür günlerinden itibaren fibroblast-benzeri şekil sergilemiştir. Bu kök hücrelerin 4 gün gibi kısa bir sürede hücre kültür kabında %80 doluluk düzeyine ulaşması ve mikroskop ile incelemelerde iğsi (mekik) morfolojinin gözlenmesi, adipoz kaynaklı MKH'lerin yüksek proliferasyon kapasitesi ve tipik fibroblastik formunu ortaya koymaktadır. Buna göre, benzer şekilde literatürde de adipoz doku MKH'lerinin kültürde uzun iğsi şekilli fibroblast benzeri morfoloji sergilediği bildirilmiştir (Mushahary ve ark., 2018; Ardeshirylajimi ve ark., 2014). Bu morfolojik ve büyüme özellikleri literatür ile uyumlu olup, izole edilen hücrelerin mezenkimal karakterde olduğunun göstergesidir.

Elde edilen ADKH'lerin hücre yüzey belirteçlerinin akış sitometrisi ile analizi, izole edilen hücrelerin MKH fenotipine sahip olduğunu güçlü şekilde desteklemiştir. MKH'ler için uluslararası kabul görmüş immünojenotip kriterleriyle ve literatürle uyumlu olarak, çalışmamızda 3. ve 5. pasajlardaki hücrelerin CD44 ve CD90 yüzey belirteçleri pozitif, buna karşın CD34 ve CD45 yüzey belirteçleri bakımından negatif bulunmuştur (Leyva-Leyvave ark ., 2013; Ullah ve ark., 2015). Özellikle, CD90 ve CD44, MKH'lerin iyi bilinen yüzey belirteçleri olup, CD34 ve CD45 yüzey belirteçleri ise hematopoetik hücrelere özgüdür. Ayrıca, Balb/C farelerinden elde edilen adipoz kaynaklı MKH'lerin CD29, CD44, CD105, Sca-1 gibi MKH yüzey belirteçlerini taşıyıp CD34, CD45, CD11b gibi hematopoetik yüzey belirteçlerini eksprese etmediği diğer çalışmalarda da gösterilmiştir (Ghaneialvar ve ark., 2018). Yaptığımız çalışmada da akış sitometrisi ile elde edilen bulgular Ghaneialvar ve ark. ait literatürle benzer şekilde olup, çalışma süresince gerçekleştirilen ADKH kültürlerinde hematopoetik hücre kontaminasyonunun minimal olduğunu göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızda gerçekleştirilen IF boyamaya ait elde edilen sonuçlar (3. ve 5. pasaj hücrelerinde CD44 ve CD90'ın belirgin pozitif, CD34 ve CD45'in ise negatif oluşu) akış sitometrisi verilerini doğrulamaktadır. Bu yönüyle, bu çalışmanın 5. pasajında dahi ADKH'lerin yüksek CD44+ ve CD90+ oranlarını sürdürmesi, mezenkimal karakterin stabil kaldığını ve çalışmadaki hücrelerin sonraki deneyler için de güvenilir bir MKH modeli olduğunu göstermektedir.

MKH'lerin klasik çok yönlülük kriterlerinden biri de uygun uyarılarla adipositlere farklılaşabilmeleridir. Tez kapsamında yapılmış olan bu çalışmada ADKH kültürlerine herhangi bir adipogenik indüksiyon uygulanmadığında, Oil Red O boyamasıyla lipid birikimi saptanmadığı, yani hücreler spontan olarak adiposit fenotipine geçmediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, farklı bir çalışmada kontrol grubu MKH kültürlerinin normal şartlarda Oil Red O negatif kaldığı, oysa adipojenik ortama alınan hücrelerde yağ damlacıklarının ortaya çıktığı gösterilmiştir (Ghaneialvar ve ark. 2018). Ayrıca bu durum, izole ettiğimiz hücre popülasyonunda olgun adiposit veya preadiposit kontaminasyonu olmadığını ve hücrelerin mezenkimal hattı koruduğunu göstermesi bakımından önemlidir.

Literatürde osteokalsin ve osteonektin gibi proteinlerin osteoblastik farklılaşmanın belirleyicileri olduğu ve osteojenik hücreler tarafından salgılandığı iyi bilinmektedir (Mohamed-Ahmed ve ark., 2018). Hatta bu matriks proteinlerinin,

farklılaşan MKH’lerde ilk mineral kristallerinin oluşumunda önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (Russell ve ark., 2016). Osteojenik farklılaşmanın fonksiyonel çıktıları arasında alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi ve ekstrasellüler matriks mineralizasyonu kritik öneme sahiptir. Tez kapsamında yapılmış olan bu çalışmada da elde edilen osteojenik farklılaşma verileri, ADKH’lerin kemik hücresi fenotipine yönlendirilebildiğini açıkça göstermektedir. Osteojenik indüksiyon altındaki hücrelerde 7. günden itibaren osteoblasta özgü proteinlerin (osteokalsin ve osteonektin) üretilmeye başlandığı, 14. günde sinyalin belirgin artışı ve 21. günde en yüksek düzeye ulaştığı saptanmıştır. Kontrol grubunda (farklılaştırılmamış hücrelerde) ise bu proteinlere yönelik herhangi bir sinyal gözlemlenmemiştir. Bu bulgular, hücrelerimizin büyüme faktörleri ile uyarıldığında zamanla osteoblastik fenotipe geçiş yaptığını ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz bulgular, farklılaşmanın 7. gününde düşük seviyede ALP aktivitesi ve sınırlı kalsifikasyon olduğunu, 14. günde hem ALP pozitif alanların hem de mineralize nodüllerin belirgin biçimde arttığını, 21. günde ise maksimum ALP aktivitesiyle birlikte yaygın ve yoğun mineral birikimi gerçekleştiğini göstermiştir. Bu kademeli artış, osteogenez sürecinin beklenen bir seyri olup, ALP enzimi erken dönem osteoblastik farklılaşmanın önemli bir göstergesidir ve mineral depozit oluşumunda başlatıcı rol oynar (Berbéri ve ark., 2017). ALP, organik fosfatları hidrolize ederek kalsiyum-fosfat kristallerinin çökmesine zemin hazırlar; dolayısıyla osteojenik kültürlerde ALP artışını genellikle takiben matriks mineralizasyonu hız kazanır (Hemati ve ark.i 2025; Süloğlu ve ark.i 2019). Bu çalışmada da özellikle 2. ve 3. haftalarda ALP’deki yükselişle paralel biçimde Von Kossa boyasıyla saptanan inorganik fosfat birikimi ve Alizarin Kırmızısı boyasıyla saptanan kalsiyum birikimi artmıştır. Literatürde, Alizarin Kırmızısı ve Von Kossa boyamalarının osteojenik kültürlerde kalsifiye matriks oluşumunu doğrulamak için yaygın biçimde kullanılan klasik yöntemler olduğu belirtilmektedir. Genellikle MKH’lerin osteoblastik farklılaşmasında 14–21 gün kültür süresi sonunda anlamlı mineralizasyon elde edilir ve hem Von kossa hem de Alizarin Kırmızısı boyaması pozitif sonuç verir (Zainal Ariffin ve ark., 2024; Elango J., 2023).

ICAM1 insanlarda ve farelerde inflamasyon sürecinin ve yara iyileşmesinin merkezinde yer alır. İmmünoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan ICAM1, endotel hücre zarlarında bulunur ve lökosit hücre zarlarında bulunan doğal ligandı olan lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1 (LFA-1) ile etkileşimleri yoluyla inflamasyon sırasında

hedef doku bölgesine lökosit tutunması ve göçü için gereklidir (Gay ve ark., 2011; Zhao ve ark., 2021). Yapılan çalışmalarda, MKH'lerde ICAM1 gen ifadesi çok düşük olmakla birlikte, ICAM1 gen ifadesi inflamasyonlu bir ortamda bulunan MKH'lerde önemli ölçüde artar (Ren ve ark., 2010; Rubtsov ve ark., 2017). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda hücre-hücre adezyonunu sağlayan E-kaderin gen ifade seviyesinin ise MKH'lerde bazal seviyelerde olduğu belirlenmiştir (Redmer ve ark., 2011; Passanha ve ark., 2020; Debruyne ve ark., 1999). Yukarıda bahsedilen çalışmalarla bağlantılı bir şekilde ICAM1 gen ifade seviyesinin MKH'lerde düşük olmasına bağlı olarak, bu çalışmada CRISPRa/dCas9 sistemi ile yalnızca ICAM1 geninin aşırı ifade edildiği ADKH'lerde ICAM1 geninin ifade seviyesi kontrole göre yaklaşık ~200 kat artış göstermişken, hem ICAM1 hem de E-kaderin geninin aşırı ifade edildiği ADKH'lerde ise ICAM1 gen ifade seviyesi kontrole göre yaklaşık ~120 kat artış göstermiştir. ADKH'lerde ICAM1 gen ifadesinin bu denli yüksek bir artış göstermesi ICAM1 gen ifade seviyesinin kök hücrelerde çok düşük seviyelerde olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, MKH'lerde E-kaderin geninin zaten bazal seviyelerde gen ifadesi olmasından dolayı yaptığımız çalışmada CRISPRa/dCas9 sistemi ile sadece E-kaderin geninin aşırı ifade edilmesi ADKH'lerde kontrole göre yaklaşık ~8 kat artış göstermişken, hem ICAM1 hem de E-kaderin geninin aşırı ifade edildiği ADKH'lerde ise E-kaderin gen ifade seviyesi kontrole göre yaklaşık ~5 kat artış göstermiştir. Dolayısıyla, çalışmamızda elde edilen, hem ICAM1 hem de E-kaderin genlerine ait ifade verileri literatür ile de uyumludur.

Yapılan kapsamlı çalışmalarda ICAM1'in MKH'lerin bağışıklık baskılayıcı kapasitesini artırabildiği ve in vitro ortamda hücre migrasyonuna katkıda bulunabildiği bildirilmiştir (Buschmann ve ark., 2012; Ma ve ark., 2017; Wang ve ark., 2014). Bununla birlikte, ilk başlarda β -katenin ile kompleks halindeki E-kaderin proteininin, hücre-hücre adezyonunu sağlayarak β -katenin bağımlı Wnt sinyallemesini baskıladığı ve hücre proliferasyonunu engellediği düşünülmekteydi (Pećina-Slaus, 2003; Jaggi ve ark., 2005). Fakat, son zamanlarda, E-kaderinin yeniden ekspresyonunun kanser hücrelerinin proliferasyonunu sağladığı ve metastatik potansiyellerini artırdığı bildirilmiştir (Jeanes ve ark., 2008; Park ve ark., 2017). Dolayısıyla, E-kaderinin yeniden ekspresyonunun bazı kanser türlerinde proliferasyonu engellediği, bazı türlerinde ise proliferasyonu sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca, kök hücrelerde E-kaderinin koşullu inaktivasyonunun hücre göçünü engellediği bildirilmiştir (Li ve ark.,

2012). Yukarıda bahsedilen çalışmalarla bağlantılı olarak, çalışmamızda da ICAM1 ve/veya E-kaderin geni aşırı ifade edilen ADKH'lerde yapmış olduğumuz hücre adezyon ve canlılık deneylerinde, ADKH'lerin kontrollere göre tutunmuş oldukları yüzeyden ayrılma süreleri artmıştır. Ayrıca, ICAM1 ve/veya E-kaderin geni aşırı ifade edilen ADKH'leri tutunma yüzeylerinden ayırdıktan sonraki yeniden yüzeye tutundurma sürecinin morfolojik deneylerinde, ICAM1 ve/veya E-kaderin geni aşırı ifade eden ADKH'lerin kontrollere göre ekildikleri ortamdaki yüzeye tutunma süreleri kısalmış ve buna bağlı olarak daha erken şekilde prolifer olmaya başlamışlardır. Li ve arkadaşları (2023), dCas9 sistemi ile PDGFR- β geninin aktivasyonu gerçekleştirilen fare ADKH'leri ile yapılan in vitro yara iyileşme modelinde 24. saatte genetik olarak aktive edilmiş hücre grubunda yara kapanma oranı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükselmiştir. 48. saatte ise genetik olarak aktive edilen hücrelerin bulunduğu grupta yara alanının tamamen kapandığı, buna karşılık kontrol grubunda ise belirgin açıklığın halen mevcut olduğu gözlenmiştir (Li ve ark., 2023). Buna karşın, yaptığımız çalışmada yer alan in vitro yara deneylerinde, ICAM1 aşırı ifade edilmiş ADKH'lerde 36. saatte %100 oranında kapanma gözlenmiştir. Ayrıca, E-kaderin geni aşırı ifade edilen ADKH'lerin 30. saatte yara alanlarının tamamen kapandığı belirlenmiştir. Hem ICAM1 hem de E-kaderin aşırı ifade edildiği ADKH'lerde kontrollere göre migrasyonu önemli ölçüde artarak açılmış olan yara bölgesini daha hızlı bir şekilde kapatmışlardır. Dolayısıyla, yapılan bu deneylerde etkili sonuç hem ICAM1 hem de E-kaderin geninin birlikte aşırı ifade edildiği ADKH grubunda elde edilmiştir. ICAM1 ve E-kaderin genlerinin birlikte aşırı ifade edildiği ADKH grubu, Li ve arkadaşlarının bildirdiği sonuçlardan daha hızlı bir etki göstermiştir ve 24. saatte %100 oranında bir kapanma elde edilmiştir. Buradan da anlaşılacağı üzere, ICAM1 ve/veya E-kaderin genlerinin ADKH'lerde aşırı ifade edilmesi PDGFR- β aktivasyonuna kıyasla hücrelerin migrasyonunu ve yara kapanmasını daha güçlü şekilde destekleyebileceğini göstermektedir.

Yara iyileşme süreci, inflamasyonun başlaması ile aktive olur. Bu süreçte inflamatuvar faktörlerin indüklenmesi ve çeşitli inflamasyon ilişkili hücrelerin yara bölgesine göçü, inflamasyon ilişkili hücrelerin ve hücre dışı bileşenlerin yenilenmesini sağlayarak doku rejenerasyonunu başlatır (Inokuma ve ark., 2006). Bununla birlikte, MKH'ler yara bölgesine implantasyonu yoluyla birden fazla deri hücre tipine farklılaşması ve parakrin faktörlerin yara bölgesinde salınımı yoluyla yara onarımına

katkıda bulunur. (Sasaki ve ark., 2008). Diyabetik farelerde fetal MKH'lerin yara açıklığını anlamlı derecede azalttığı, EGF, VEGF, TGF- β 1 gibi büyüme faktörlerinin mRNA düzeylerini yükselttiği gösterilmiştir (Badillo ve ark., 2007). Ayrıca, miyokard enfarktüsü ve omurilik yaralanmalarının tedavisi de dahil olmak üzere MKH'ler kullanılarak çeşitli klinik çalışmalar yapılmıştır (Chernykh ve ark., 2006; Segers ve ark., 2006). Ayrıca bazı raporlar MKH'ler için yara iyileşmesine katkı sağladığına dair bulgular elde etmiş olsa da, MKH'lerin yara iyileşmesi üzerine etkileri sınırlı ve dokuya özgü farklılaşması yoluyla hasarlı dokunun yenilenmesine önemli ölçüde katkıda bulunup bulunamayacağı tartışmalı kalmıştır (Sasaki ve ark., 2008). Yaptığımız çalışmada ise, söz konusu sınırlamaların ICAM1 ve/veya E-kaderin genleri aşırı ifade edilmiş ADKH'ler kullanılarak aşıldığı düşünülmektedir. İn vivo deneylerde, ICAM1 ve/veya E-kaderin geni aşırı ifade edilen ADKH'lerin verilmiş olduğu yara bölgelerindeki yara kapanma süreci, herhangi bir uygulama yapılmamış "sadece yara" bölgesi ve gen modifikasyonu yapılmamış ADKH'lerin verildiği yara gruplarına göre, daha hızlı ilerlemiştir. Özellikle hem ICAM1 hem de E-kaderin genleri birlikte aşırı ifade edilen ADKH'lerin verilmiş olduğu yara bölgesi neredeyse 15. günde kapanmıştır.

Ayrıca yara bölgesine uygulanan ADKH'ler yara bölgesindeki yerleşimlerini belirlemek amacıyla BrdU boyaması ile işaretlenmiştir. Bu bölgeler IF analizi ile BrdU-pozitif ADKH varlığı açısından incelenmiştir. Yapılan literatür taramalarında MKH'ler ile yara iyileşmesine yönelik çalışmalarda kök hücrelerin BrdU ile işaretlenerek yara bölgesindeki yerleşiminin izlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda BrdU ile işaretlenmiş kök hücrelerin yara bölgesine implante edildikten sonraki 7. gün ve sonrasındaki günlerde yara bölgesinde tespit edilememiştir (Tan ve ark., 2019). Tez kapsamında yapılan bu çalışmada da literatür ile uyumlu olarak negatif kontrol ve sham gruplarındaki yara bölgelerine implante edilen ADKH'ler 7. gün ve sonrasındaki günlerde yara bölgesinde tespit edilememiştir. Ancak, CRISPRa/dCas9 sistemi kullanılarak ICAM1 ve/veya E-kaderin gen bölgeleri aşırı ifade edilen ADKH'lerin yara bölgelerindeki varlığı 15. gün ve sonrasındaki günlerde net bir şekilde belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu iki genin birlikte aşırı ifade edildiği ADKH'lerin yağ bezi hücrelerine de dönüştüğü belirlenmiştir. Bu bulgular, literatürde sıklıkla bildirilen "kök hücrelerin yara bölgesinde kısa süreli kalıcılığı" görüşünün aksine, genetik olarak ICAM1 ve/veya E-kaderin genleri aşırı ifade edilen

ADKH'lerin yara bölgesinde daha uzun süre tutunduğunu ve rejeneratif potansiyelini sürdürdüğünü göstermektedir.

Yapılan in vivo çalışmasının ilgili analiz günlerinde farelerden alınan yara dokularının IF ve kantitatif IF analizleri ise ICAM1 ve/veya E-kaderin geni aşırı ifade edilen ADKH'lerin tez kapsamında yapılmış olan bu çalışmadaki IL-10, TNF- α ve MMP-2 ekspresyon profilleri üzerine olan etkilerini ve dermal yara iyileşmesindeki rollerini göstermiştir. IL-10, anti-inflamatuvar özellikleri ile yara iyileşmesinde bağışıklık dengesinin sağlanmasında kritik rol oynamaktadır (Moore ve ark., 2001; Barrientos ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda ADKH'lerin yara mikroçevresinde parakrin etkiler aracılığıyla IL-10 seviyesini artırarak inflamasyonu baskıladığı ve yara iyileşmesini desteklediği belirlenmiştir. (Singampalli ve ark., 2020). Çalışmamızda, yapılan in vivo deneylerden elde edilen bulgular sonucunda, ICAM1 geninin aşırı ifade edildiği ADKH'lerin uygulandığı grupta IL-10 ekspresyonu, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Elde edilen bu bulgu, literatürde yer alan ICAM-1'in hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks etkileşimi ve hücre sinyalizasyonundaki etkileri ile uyumludur. Özellikle, IL-10 seviyeleri, E-kaderin ve ICAM1/E-kaderin genlerinin aşırı ifade edildiği ADKH'lerin verildiği yara gruplarında ise 7. ve 15. günlerde belirgin bir şekilde tüm gruplara göre artış göstermiştir. Elde edilen bu bulgu yara mikroçevresinde hücreler arası sinyalizasyonu ve hücre-hücre etkileşimini artırarak yara dokusunun geçici matriksten olgun matrikse geçiş sürecinin bu gruplarda daha erken başladığını göstermiştir. İnflamasyon fazının erken evreleri olan 3. ve 7. günlerde, E-kaderin ve ICAM1/E-kaderin genlerinin aşırı ifade edildiği ADKH hücrelerinin verildiği yara gruplarında TNF- α seviyeleri belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Dolayısıyla, genetik modifikasyona sahip bu hücrelerin yara mikro çevresine genetik modifikasyona sahip olmayan ADKH'lere göre daha iyi bir şekilde tutunarak yara iyileşme sürecinin ilk sinyal iletiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu bulgu, TNF- α 'nın lökosit hareketi ve fibroblast aktivasyonu üzerindeki iyi bilinen etkileriyle uyumludur (Chung ve ark., 2009). Ayrıca, ECM yeniden şekillendirme sürecinin önemli bir belirteci olan MMP-2 yara iyileşmesinin erken fazlarında hem hücre göçü hem de anjiyogenez için gereklidir (Caley ve ark., 2015). MMP-2 ekspresyonunun ICAM1/E-kaderin genlerinin aşırı ifade edildiği ADKH'lerinin verildiği yara grubunun 7. gününde diğer tüm gruplara göre daha fazla artış göstermesi, ADKH'lerin yara mikroçevresine adapte olarak yeniden

şekillenmeye aktif bir şekilde katıldığını olgun maktrikse geçiş sürecinde ne kadar ileride olduğunu belirgin olarak göstermektedir. MMP-2 ekspresyonundaki artış, genetik modifikasyona sahip ADKH'lerin ECM'de yeniden şekillendirmesini kolaylaştırdığını göstermektedir. Erken dönemde artış göstermeye başlayan MMP-2 ICAM1/E-kaderin genlerinin aşırı ifade edildiği grupta diğer gruplara göre erken seviyede de düşüşe geçmiştir. Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada elde edilen bulgular MMP-2'nin erken dönemde ekspresyon seviyesinin artışı ve buna bağlı olarak azalması her iki genin aktive edildiği ADKH'lerin yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisinin ne kadar fazla olduğunu göstermektedir. Yapılan literatür taramalarında CRISPRa/dcas9 sistemi ile yara iyileşmesine yönelik yapılan çalışmalarda, IL-10, TNF- α , MMP-2 seviyelerinde meydana gelen değişikliklere yönelik analizlerin yer almadığı görülmüştür. Bu durum yaptığımız çalışmanın özgünlüğünü ve literatürdeki önemli bir açığı da doldurduğunu ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz detaylı sonuçlar ile literatürdeki bilgi eksikliğine katkı sağlamış bulunmaktayız.

4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada fare adipoz dokusundan elde edilen kök hücrelerde CRISPRa/dCas9 sistemi ile ICAM1 ve E-kaderin genleri aşırı ifade edilmiş ve bu hücrelerin hem in vitro hem de in vivo yara iyileşmesi süreçlerine olan etkileri kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ICAM1 ve/veya E-kaderin genleri aşırı ifade edilmiş kök hücrelerin in vitro deneylerinde adezyon, migrasyon, canlılık kapasitelerinde anlamlı artışlar, kontrol grubuna göre tutunma yüzeyinden daha geç ayrılma ve yeniden tutunma süresinde kısalma gözlenmiştir. Ayrıca aşırı ifade edilen kök hücrelerde migrasyon yeteneğinin arttığı ve in vitro yara deneyinde yara bölgesinin daha hızlı kapandığı görülmüştür.

İn vivo deneylerde ICAM1 ve/veya E-kaderin genleri aşırı ifade edilmiş ADKH'lerin tam kat deri defekti olan farelerde yara iyileşmesini hızlandırdığı gözlenmiştir. ICAM1 ve E-kaderin genlerinin birlikte aşırı ifade edildiği hücrelerin uygulandığı yara bölgelerinde ise iyileşme neredeyse 15. günde tamamlanmıştır. Yapılan IF analizlerinde IL-10, TNF- α , MMP-2 ekspresyonlarındaki artış genetik modifikasyonun yara iyileşmesini desteklediğini göstermiştir.

Bu çalışmada geliştirilen sistemin klinik öncesi modellerde ve insan yara tedavilerinde güvenli bir şekilde uygulanabilirliğini değerlendirebilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Elde edilen bulgular, ileri aşama araştırmalar için ön veri niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., Minakhin, L., Severinov, K., Regev, A., Lander, E. S., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353(6299), aaf5573. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>
- Adib, Y., Bensussan, A., & Michel, L. (2022). Cutaneous Wound Healing: A Review about Innate Immune Response and Current Therapeutic Applications. *Mediators of inflammation*, 2022, 5344085. <https://doi.org/10.1155/2022/5344085>
- Ardeshtyrlajimi, A., Soleimani, M., Hosseinkhani, S., Parivar, K., & Yaghmaei, P. (2014). A comparative study of osteogenic differentiation human induced pluripotent stem cells and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell journal*, 16(3), 235–244.
- Arslan, F. N., Eckert, J., Schmidt, T., & Heisenberg, C. P. (2021). Holding it together: When cadherin meets cadherin. *Biophysical Journal*, 120(19), 4182–4192. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.08.028>
- Atasever D, Germiyan ÖS, Uyanıkgil Y. Kök Hücreler, Dental Pulpa Kök Hücreleri ve Klinik Uygulamaları. *aktd. Eylül 2024;33(3):145-155*. doi:10.17827/aktd.1511375
- Atasever D, Germiyan ÖS, Uyanıkgil Y. Kök Hücreler, Dental Pulpa Kök Hücreleri ve Klinik Uygulamaları. *aktd. Eylül 2024;33(3):145-155*. doi:10.17827/aktd.1511375
- Ateş,U.(2016).Kök hücreyi tanıyalım. İstanbul Bilim ÜniversitesiFlorenceNightingale TransplantasyonDergisi,1(1),19-28. <https://doi.org/10.5606/fng.transplantasyon.2016.004>
- Avcı, M. (2022). Kök hücre; tanımı ve genel özellikleri, kullanım alanları, tarihi, yüzey belirteçleri. *Anatolian Clinic: The Journal of Medical Sciences*, 31(2), 87–93
- Avcılar, Saraymen, Özturan & Köker, (2018)Avcılar, H., Saraymen, B., Özturan, O. Ö., & Köker, M. Y. (2018). Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler. *Asthma Allergy Immunology*, 16(3), 174–181. <https://doi.org/10.21911/aai.438>
- Ayavoo, T., Murugesan, K., & Gnanasekaran, A. (2021). Roles and mechanisms of stem cell in wound healing. *Stem cell investigation*, 8, 4.
- Badillo, A. T., Redden, R. A., Zhang, L., Doolin, E. J., & Liechty, K. W. (2007). Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. *Cell and Tissue Research*, 329(2), 301–311. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0417-3>
- Baktır G.(2019) Wound Repair and Experimental Wound Models. *Experimed*, 9(3):130-7.y
- Barczak, W., Suchorska, W., Rubiś, B., & Kulcenty, K. (2015). Universal real-time PCR-based assay for lentiviral titration. *Molecular Biotechnology*, 57(2), 195–200. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9815-4>
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*:

official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 16(5), 585–601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>

Bártolo, I., Reis, R. L., Marques, A. P., & Cerqueira, M. T. (2022). Keratinocyte growth factor-based strategies for wound re-epithelialization. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 28(3), 665–676. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2021.0280>

Behr, M., Zhou, J., Xu, B., & Zhang, H. (2021). In vivo delivery of CRISPR-Cas9 therapeutics: Progress and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(8), 2150–2171. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.009>

Berbéri, A., Al-Nemer, F., Hamade, E., Noujeim, Z., Badran, B., & Zibara, K. (2017). Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: an in vitro study. *Clinical oral investigations*, 21(5), 1599–1609. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1945-6>

Bonnici, L., Suleiman, S., Schembri-Wismayer, P., & Cassar, A. (2023). Targeting Signalling Pathways in Chronic Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, 25(1), 50. <https://doi.org/10.3390/ijms25010050>

Borena, B. M., Pawde, A. M., Amarpal, Aithal, H. P., Kinjavdekar, P., Singh, R., & Kumar, D. (2010). Evaluation of autologous bone marrow-derived nucleated cells for healing of full-thickness skin wounds in rabbits. *International wound journal*, 7(4), 249–260. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2010.00683.x>

Bruno, S., Collino, F., Iavello, A., & Camussi, G. (2014). Effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on tumor growth. *Frontiers in Immunology*, 5, 382. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00382>

Bui, T. M., Wiesolek, H. L., & Sumagin, R. (2020). ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(3), 787–799. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RI0220-453R>

Bulut, S. (2024). Larinks kanserli hastalarda ICAM-1 ve CEACAM-1 arasındaki ilişkinin araştırılması (Doktora tezi). Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi> (Tez No. 891528)

Buschmann, K., Koch, L., Braach, N., Mueller, H., Frommhold, D., Poeschl, J., & Ruef, P. (2012). CXCL1-triggered interaction of LFA1 and ICAM1 control glucose-induced leukocyte recruitment during inflammation in vivo. *Mediators of inflammation*, 2012, 739176. <https://doi.org/10.1155/2012/739176>

Caley, M. P., Martins, V. L., O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in wound care*, 4(4), 225–234. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>

Caplan, A. I., Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry*, 98(5), 1076–1084.

Chang, Y. K., Hwang, J. S., Chung, T. Y., Shin, Y. J. (2018). SOX2 Activation Using CRISPR/dCas9 Promotes Wound Healing in Corneal Endothelial Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 36(12), 1851–1862. <https://doi.org/10.1002/stem.2915>

Chavez, M., Chen, X., Finn, P. B., Qi, L. S. (2023). Advances in CRISPR therapeutics. *Nature Reviews Nephrology*, 19(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00627-z>

Chernykh, E. R., Shevela, E. Y., Leplina, O. Y., Tikhonova, M. A., Ostanin, A. A., Kulagin, A. D., Pronkina, N. V., Muradov, Z.hM., Stupak, V. V., & Kozlov, V. A. (2006). Characteristics of bone marrow cells under conditions of impaired innervation in patients with spinal trauma. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 141(1), 117–120. <https://doi.org/10.1007/s10517-006-0109-0>

Chung, E. M., Kim, K. H., Park, S. H., Kim, K. H., & Kim, K. J. (2009). Migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by tumor necrosis factor-alpha and its possible role in wound healing. *Experimental & Molecular Medicine*, 41(10), 810–818. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.10.093>

Cialdai, F., Risaliti, C., & Monici, M. (2022). Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 958381.

Clarke, M. R., Imhoff, F. M., & Baird, S. K. (2015). Mesenchymal stem cells inhibit breast cancer cell migration and invasion through secretion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2. *Molecular Carcinogenesis*, 54(10), 1214–1219. <https://doi.org/10.1002/mc.22186>

CTACK/CCL27 acceleratesInokuma, D., Abe, R., Fujita, Y., Sasaki, M., Shibaki, A., Nakamura, H., McMillan, J. R., Shimizu, T., & Shimizu, H. (2006). CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 24(12), 2810–2816. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0264>

Debruyne, P., Vermeulen, S., & Mareel, M. (1999). The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta gastro-enterologica Belgica*, 62(4), 393–402.

Dinh, T., Braunagel, S., & Rosenblum, B. I. (2015). Growth factors in wound healing: the present and the future?. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, 32(1), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2014.09.010>

Elango J. (2023). Proliferative and Osteogenic Supportive Effect of VEGF-Loaded Collagen-Chitosan Hydrogel System in Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Pharmaceutics*, 15(4), 1297. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041297>

EL Barky AR, Ali EMM, Mohamed TM. Stem Cells, Classifications and their ClinicalApplications. *Am J Pharmacol Ther.* 2017;1(1): 001-007.

Erceg Ivkošić, I., Fureš, R., Ćosić, V., Mikelin, N., Bulić, L., Dobranić, D., Brlek, P., & Primorac, D. (2023). Unlocking the Potential of Mesenchymal Stem Cells in Gynecology: Where Are We Now?. *Journal of personalized medicine*, 13(8), 1253. <https://doi.org/10.3390/jpm13081253>

Farzaneh, M., Rahimi, F., Alishahi, M., & Khoshnam, S. E. (2019). Paracrine Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Cardiomyocytes. *Current stem cell research & therapy*, 14(1), 9–13. <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180821160421>

Finegan, T. M., & Bergstralh, D. T. (2020). Neuronal immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in epithelial morphogenesis: Insights from *Drosophila*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1809), 20190553. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0553>

- Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y. S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernytsky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., de Montalembert, M., Rondelli, D., Sharma, A., ... Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *The New England journal of medicine*, 384(3), 252–260. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
- Gay, A. N., Mushin, O. P., Lazar, D. A., Naik-Mathuria, B. J., Yu, L., Gobin, A., Smith, C. W., & Olutoye, O. O. (2011). Wound healing characteristics of ICAM-1 null mice devoid of all isoforms of ICAM-1. *The Journal of surgical research*, 171(1), e1–e7. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.06.053>
- Ghaneialvar, H., Soltani, L., Rahmani, H. R., Lotfi, A. S., & Soleimani, M. (2018). Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 33(1), 46–52. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0641-x>.
- Goodman, S. R. (2021). Stem cells and regenerative medicine. In S. R. Goodman (Ed.), *Goodman's medical cell biology* (4th ed., pp. 361–380). Academic Press. ISBN 9780128179277, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817927-7.00013-2>.
- Grazul-Bilska, A. T., Johnson, M. L., Bilski, J. J., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Abdullah, A., & Abdullah, K. M. (2003). Wound healing: the role of growth factors. *Drugs of today* (Barcelona, Spain:1998), 39(10), 787–800. <https://doi.org/10.1358/dot.2003.39.10.799472>
- Guo, M., Chen, H., Dong, S., Zhang, Z., & Luo, H. (2022). CRISPR-Cas gene editing technology and its application prospect in medicinal plants. *Chinese Medicine*, 17(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00584-w>
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 139(5), 945–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.002>
- Han, Z., Jing, Y., Zhang, S., Liu, Y., Shi, Y., & Wei, L. (2012). The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell & Bioscience*, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-8>
- He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology*, 25, 377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>
- Hemati, S., Ghiasi, M., & Salimi, A. (2025). Osteogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on Composite Polymeric Scaffolds: A Review. *Current stem cell research & therapy*, 20(1), 33–49. <https://doi.org/10.2174/011574888X263333231218065453>
- Hintermann, E., & Christen, U. (2019). The many roles of cell adhesion molecules in hepatic fibrosis. *Cells*, 8(12), 1503. <https://doi.org/10.3390/cells8121503>
- Huang, J., Zhou, Y., Li, J., Lu, A., & Liang, C. (2022). CRISPR/Cas systems: Delivery and application in gene therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 942325. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.942325>

Hur Y. H. (2024). Epidermal stem cells: Interplay with the skin microenvironment during wound healing. *Molecules and cells*, 47(12), 100138. <https://doi.org/10.1016/j.mocell.2024.100138>

Hurlbut, W. B. (2005). Altered nuclear transfer as a morally acceptable means for the procurement of human embryonic stem cells. *Perspectives in Biology and Medicine*, 48(2), 211–228. <https://doi.org/10.1353/pbm.2005.0046>

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>

Jaggi, M., Johansson, S. L., Baker, J. J., Smith, L. M., Galich, A., & Balaji, K. C. (2005). Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urologic oncology*, 23(6), 402–406. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2005.03.024>

Janiszewska, M., Primi, M. C., & Izard, T. (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(8), 2495–2505. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.010563>

Jeanes, A., Gottardi, C. J., & Yap, A. S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?. *Oncogene*, 27(55), 6920–6929. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.343>

Jo, H., Brito, S., Kwak, B. M., Park, S., Lee, M. G., & Bin, B. H. (2021). Applications of Mesenchymal Stem Cells in Skin Regeneration and Rejuvenation. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2410. <https://doi.org/10.3390/ijms22052410>

Johnson, A. L., Kamal, M., & Parise, G. (2023). The role of supporting cell populations in satellite cell mediated muscle repair. *Cells*, 12(15), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cells12151900>

Kaszak, I., Witkowska-Piłaszewicz, O., Niewiadomska, Z., Dworecka-Kaszak, B., Ngosa Toka, F., & Jurka, P. (2020). Role of cadherins in cancer—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7624. <https://doi.org/10.3390/ijms21207624>

Kim, J. Y., & Suh, W. (2010). Stem cell therapy for dermal wound healing. *International journal of stem cells*, 3(1), 29–31. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2010.3.1.29>

Knoedler, S., Knoedler, L., Kauke-Navarro, M., Rinkevich, Y., Hundeshagen, G., Harhaus, L., Kneser, U., Pomahac, B., Orgill, D. P., & Panayi, A. C. (2023). Regulatory T cells in skin regeneration and wound healing. *Military Medical Research*, 10(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s40779-023-00464-3>

Kozlova, I., & Sytnyk, V. (2024). Cell adhesion molecules as modulators of the epidermal growth factor receptor. *Cells*, 13(22), 1919. <https://doi.org/10.3390/cells13221919>

Lathif A.K and Keerthi P. (2023); STEM CELLS IN REGENERATIVE MEDICINE AND THERAPEUTIC POTENTIAL *Int. J. of Adv. Res.* 11 (Jun). 1251-1262]

Leyva-Leyva, M., Barrera, L., López-Camarillo, C., Arriaga-Pizano, L., Orozco-Hoyuela, G., Carrillo-Casas, E. M., Calderón-Pérez, J., López-Díaz, A., Hernández-Aguilar, F., González-Ramírez, R., Kawa, S., Chimal-Monroy, J., & Fuentes-Mera, L.

- (2013). Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. *Stem cells and development*, 22(8), 1275–1287. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0359>
- Li, C. Y., Cha, W., Luder, H. U., Charles, R. P., McMahon, M., Mitsiadis, T. A., & Klein, O. D. (2012). E-cadherin regulates the behavior and fate of epithelial stem cells and their progeny in the mouse incisor. *Developmental biology*, 366(2), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.03.012>
- Li, L., Bennett, S. A., & Wang, L. (2012). Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adhesion & Migration*, 6(1), 59–70. <https://doi.org/10.4161/cam.19809>
- Li, L., Hartley, R., Reiss, B., Sun, Y., Pu, J., Wu, D., Lin, F., Hoang, T., Yamada, S., Jiang, J., & Zhao, M. (2012). E-cadherin plays an essential role in collective directional migration of large epithelial sheets. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 69(16), 2779–2789. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0951-3>
- Li, Y., Dong, L., Chen, Y., Cai, W., Yang, G., & Wang, Y. (2024). Epithelial differentiation of gingival mesenchymal stem cells enhances re-epithelialization for full-thickness cutaneous wound healing. *Stem cell research & therapy*, 15(1), 455. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-04081-9>
- Li, Y., Li, D., You, L., Deng, T., Pang, Q., Meng, X., & Zhu, B. (2023). dCas9-Based PDGFR- β Activation ADSCs Accelerate Wound Healing in Diabetic Mice through Angiogenesis and ECM Remodeling. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5949. <https://doi.org/10.3390/ijms24065949>
- Li, Y., Lu, W., Xie, C., Yang, J., & Deng, B. (2023). dCas9-based PDGFR- β activation ADSCs accelerate wound healing in diabetic mice through angiogenesis and ECM remodeling. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5949. <https://doi.org/10.3390/ijms24065949>
- Liao, H., Wu, J., VanDusen, N. J., Li, Y., & Zheng, Y. (2024). CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair for precise gene editing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 35(4), 102344. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.102344>
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P., & Timlin, J. A. (2018). Delivering CRISPR: A review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*, 25(1), 1234–1257. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, Y., Xue, J., Deng, T., Zhou, X., Yu, K., Deng, L., Huang, M., Yi, X., Liang, M., Wang, Y., Shen, H., Tong, R., Wang, W., Li, L., Song, J., Li, J., Su, X., Ding, Z., Gong, Y., Zhu, J., ... Mok, T. (2020). Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nature medicine*, 26(5), 732–740. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0840-5>
- Ma, S., Chen, X., Wang, L., Wei, Y., Ni, Y., Chu, Y., Liu, Y., Zhu, H., Zheng, R., & Zhang, Y. (2017). Repairing effects of ICAM-1-expressing mesenchymal stem cells in mice with autoimmune thyroiditis. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(4), 1295–1302. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4131>

- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J., Backofen, R., ... Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., & Syrigos, K. (2009). Cell adhesion molecules: Role and clinical significance in cancer. *Cancer Investigation*, 27(10), 1023–1037. <https://doi.org/10.3109/07357900903062324>
- Mancuso, T., Barone, A., Salatino, A., Molinaro, C., Marino, F., Scalise, M., Torella, M., De Angelis, A., Urbanek, K., Torella, D., & Cianflone, E. (2020). Unravelling the Biology of Adult Cardiac Stem Cell-Derived Exosomes to Foster Endogenous Cardiac Regeneration and Repair. *International journal of molecular sciences*, 21(10), 3725. <https://doi.org/10.3390/ijms21103725>
- Mester, A., Opincariu, D., Benedek, I., & Benedek, I. (2017). Stem cell therapy in wound healing. *Journal of Interdisciplinary Medicine*, 2(1), 20–24. <https://doi.org/10.1515/jim-2017-0032>
- Michopoulou, A., & Rousselle, P. (2015). How do epidermal matrix metalloproteinases support re-epithelialization during skin healing? *European Journal of Dermatology*, 25(Suppl. 1), 33–42. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2572>
- Mishra, V. K., Shih, H. H., Parveen, F., Lenzen, D., Ito, E., Chan, T. F., & Ke, L. Y. (2020). Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 9(5), 1145. <https://doi.org/10.3390/cells9051145>
- Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S. A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., & Idris, S. B. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1> (Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S. A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., & Idris, S. B. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19, 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- Mui, K. L., Chen, C. S., & Assoian, R. K. (2016). The mechanical regulation of integrin–cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *Journal of Cell Science*, 129(6), 1093–1100. <https://doi.org/10.1242/jcs.183020>
- Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
- Musiał-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The pros and cons of mesenchymal stem cell-based therapies. *Cell Transplantation*, 28(7), 801–812. <https://doi.org/10.1177/0963689719855620>
- Niessen, C. M., Leckband, D., & Yap, A. S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: Dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic

regulation. *Physiological Reviews*, 91(2), 691–731.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2010>

Nourshargh, S., Krombach, F., & Dejana, E. (2006). The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(4), 714–718. <https://doi.org/10.1189/jlb.0206087>

Park, S. Y., Shin, J. H., & Kee, S. H. (2017). E-cadherin expression increases cell proliferation by regulating energy metabolism through nuclear factor- κ B in AGS cells. *Cancer science*, 108(9), 1769–1777. <https://doi.org/10.1111/cas.13321>

Passanha, F. R., Geuens, T., Konig, S., van Blitterswijk, C. A., & LaPointe, V. L. (2020). Cell culture dimensionality influences mesenchymal stem cell fate through cadherin-2 and cadherin-11. *Biomaterials*, 254, 120127. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120127>

Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in wound healing: A comprehensive review. *Advances in Wound Care*, 3(7), 445–464. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0473>

Pećina-Slaus N. (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer cell international*, 3(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-3-17>

Peña, O. A., & Martin, P. (2024). Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 25(8), 599–616. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00715-1>

Poliwoda, S., Noor, N., Downs, E., Schaaf, A., Cantwell, A., Ganti, L., Kaye, A. D., Mosel, L. I., Carroll, C. B., Viswanath, O., & Urits, I. (2022). Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. *Orthopedic reviews*, 14(3), 37498.

Povlsen, G. K., Berezin, V., & Bock, E. (2008). Neural cell adhesion molecule-180-mediated homophilic binding induces epidermal growth factor receptor (EGFR) down-regulation and uncouples the inhibitory function of EGFR in neurite outgrowth. *Journal of Neurochemistry*, 104(3), 624–639. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05013.x>

Pratheesh, M. D., Gade, N. E., Nath, A., Dubey, P. K., Sivanarayanan, T. B., Madhu, D. N., Sreekumar, T. R., Amarpal, Saikumar, G., & Sharma, G. T. (2017). Evaluation of persistence and distribution of intra-dermally administered PKH26 labelled goat bone marrow derived mesenchymal stem cells in cutaneous wound healing model. *Cytotechnology*, 69(6), 841–849. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0097-0>

Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., & Saparov, A. (2021). Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 11(5), 700. <https://doi.org/10.3390/biom11050700>

Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., & Besser, D. (2011). E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO reports*, 12(7), 720–726. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.88>

- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., Le, A. D., Shi, S., Shao, C., & Shi, Y. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 184(5), 2321–2328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902023>
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: A cellular perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>
- Roger, M., Fullard, N., Costello, L., Bradbury, S., Markiewicz, E., O'Reilly, S., Darling, N., Ritchie, P., Määttä, A., Karakesisoglou, I., Nelson, G., von Zglinicki, T., Dicolandrea, T., Isfort, R., Bascom, C., & Przyborski, S. (2019). Bioengineering the microanatomy of human skin. *Journal of Anatomy*, 234(4), 438–455. <https://doi.org/10.1111/joa.12938>
- Rombouts, W. J., & Ploemacher, R. E. (2003). Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*, 17(1), 160–170. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402785>
- Russell, K. A., Chow, N. H., Dukoff, D., Gibson, T. W., LaMarre, J., Betts, D. H., & Koch, T. G. (2016). Characterization and Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *PloS one*, 11(12), e0167442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167442>
- Rousselle, P., Braye, F., & Dayan, G. (2019). Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, 344–365. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.09.008>
- Rubtsov, Y., Goryunov, K., Romanov, A., Suzdaltseva, Y., Sharonov, G., & Tkachuk, V. (2017). Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1. *Stem cells international*, 2017, 6516854. <https://doi.org/10.1155/2017/6516854>
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., & Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 180(4), 2581–2587. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2581>
- Segers, V. F., Van Riet, I., Andries, L. J., Lemmens, K., Demolder, M. J., De Becker, A. J., Kockx, M. M., & De Keulenaer, G. W. (2006). Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 290(4), H1370–H1377. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00523.2005>
- Shah, S., Ghosh, D., Otsuka, T., & Laurencin, C. T. (2024). Classes of stem cells: From biology to engineering. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 10(3), 309–322. <https://doi.org/10.1007/s40883-023-00355-3>
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(2), 115–130. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
- Sinclair, F., Begum, A. A., Dai, C. C., Toth, I., & Moyle, P. M. (2023). Recent advances in the delivery and applications of nonviral CRISPR/Cas9 gene editing. *Drug*

Delivery and Translational Research, 13(5), 1500–1519.
<https://doi.org/10.1007/s13346-023-01344-4>

Singampalli, K. L., Balaji, S., Wang, X., Parikh, U. M., Kaul, A., Gilley, J., Birla, R. K., Bollyky, P. L., & Keswani, S. G. (2020). The role of an IL-10/hyaluronan axis in dermal wound healing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 636. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00636>

Sioson, V. A., Kim, M., & Joo, J. (2021). Challenges in delivery systems for CRISPR-based genome editing and opportunities of nanomedicine. *Biomedical Engineering Letters*, 11(3), 217–233. <https://doi.org/10.1007/s13534-021-00195-4>

Srifa, W., Kosaric, N., Amorin, A., Jadi, O., Park, Y., Mantri, S., Camarena, J., Gurtner, G. C., & Porteus, M. (2020). Cas9-AAV6-engineered human mesenchymal stromal cells improved cutaneous wound healing in diabetic mice. *Nature communications*, 11(1), 2470. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16065-3>

Sorg, H., & Sorg, C. G. G. (2023). Skin wound healing: Of players, patterns, and processes. *European Surgical Research*, 64(2), 141–157. <https://doi.org/10.1159/000527839>

Souci, L., & Denesvre, C. (2021). 3D skin models in domestic animals. *Veterinary Research*, 52(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00892-6>

Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. *Cell Transplantation*, 25(5), 829–848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>

Sullivan, J. V., & Myers, S. (2022). Skin structure and function, wound healing and scarring. In R. D. Farhadieh, N. W. Bulstrode, B. J. Mehrara, & S. Cugno (Eds.), *Plastic Surgery: Principles and Practice* (pp. 1–14). Elsevier.

Süloğlu, A. K., Karacaoğlu, E., Bilgic, H. A., Selmanoğlu, G., Koçkaya, E. A., & Karaaslan, C. (2019). Osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on fibrin glue- or fibronectin-coated Ceraform®. *Journal of biomaterials applications*, 34(3), 375–385. <https://doi.org/10.1177/0885328219853421>

Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*, 11(19), 1553–1558. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00479-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00479-2)

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>

Takeo, M., Lee, W., & Ito, M. (2015). Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(1), a023267. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023267>

- Talbott, H. E., Mascharak, S., Griffin, M., Wan, D. C., & Longaker, M. T. (2022). Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell*, 29(8), 1161–1180. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.006>
- Tan, Q. W., Tang, S. L., Zhang, Y., Yang, J. Q., Wang, Z. L., Xie, H. Q., & Lv, Q. (2019). Hydrogel from Acellular Porcine Adipose Tissue Accelerates Wound Healing by Inducing Intradermal Adipocyte Regeneration. *The Journal of investigative dermatology*, 139(2), 455–463. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.08.013>
- Tanaka, K., Ogino, R., Yamakawa, S., Suda, S., & Hayashida, K. (2022). Role and Function of Mesenchymal Stem Cells on Fibroblast in Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines*, 10(6), 1391. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061391>
- Trawczynski, M., Liu, G., David, B. T., & Fessler, R. G. (2019). Restoring Motor Neurons in Spinal Cord Injury With Induced Pluripotent Stem Cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 369. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00369>
- Viaña-Mendieta, P., Sánchez, M. L., & Benavides, J. (2022). Rational selection of bioactive principles for wound healing applications: Growth factors and antioxidants. *International wound journal*, 19(1), 100–113. <https://doi.org/10.1111/iwj.13602>
- Volkova, M. V., Boyarintsev, V. V., Trofimenko, A. V., Kovaleva, E. V., Othman, A. A., Melerzanov, A. V., Filkov, G. I., Rybalkin, S. P., & Durymanov, M. O. (2023). Local injection of bone-marrow derived mesenchymal stromal cells alters a molecular expression profile of a contact frostbite injury wound and improves healing in a rat model. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 49(2), 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2022.04.014>
- Wang, G., Yang, F., Zhou, W., Xiao, N., Luo, M., & Tang, Z. (2023). The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157, 114004. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114004>
- Wang, J. Y., Pausch, P., & Doudna, J. A. (2022). Structural biology of CRISPR-Cas immunity and genome editing enzymes. *Nature Reviews Microbiology*, 20(11), 641–656. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00743-6>
- Wang, X. L., Chen, X. J., Ye, H. H., Xing, L. X., Han, X. Y., Cheng, Z. J., & Huang, S. J. (2017). Association of mRNA expression level of IP-10 in peripheral blood mononuclear cells with HBV-associated acute-on-chronic liver failure and its prognosis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences*, 37(5), 755–760. <https://doi.org/10.1007/s11596-017-1800-2>
- Wang, Y. G., Zhao, Y., Li, X. M., Tang, B., Chu, Y. N., Liu, Y. L., Zhu, H., & Zhang, Y. (2014). *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*, 22(2), 479–484. <https://doi.org/10.7534/j.issn.1009-2137.2014.02.039>
- Weiliang, Z., & Lili, G. (2021). Research Advances in the Application of Adipose-Derived Stem Cells Derived Exosomes in Cutaneous Wound Healing. *Annals of dermatology*, 33(4), 309–317. <https://doi.org/10.5021/ad.2021.33.4.309>
- Wright, A. V., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 164(1-2), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>

- Xu, J. H., Xu, S. Q., Ding, S. L., Yang, H., Huang, X., & Shi, H. F. (2022). Bone marrow mesenchymal stem cells alleviate the formation of pathological scars in rats. *Regenerative therapy*, 20, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.03.004>
- Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 2401–2415. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
- Xue, C., & Greene, E. C. (2021). DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends in genetics:TIG*, 37(7), 639–656. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.02.008>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience reports*, 35(2), e00191. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
- Yang, R., Liu, F., Wang, J., Chen, X., Xie, J., & Xiong, K. (2019). Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 229. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1331-2>
- Zaib, S., Areeba, & Khan, I. (2024). Purinergic Signaling and its Role in the Stem Cell Differentiation. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 24(8), 863–883. <https://doi.org/10.2174/0113895575261206231003151416>
- Zainal Ariffin, S. H., Megat Abdul Wahab, R., Abdul Razak, M., Yazid, M. D., Shahidan, M. A., Miskon, A., & Zainol Abidin, I. Z. (2024). Evaluation of in vitro osteoblast and osteoclast differentiation from stem cell: a systematic review of morphological assays and staining techniques. *PeerJ*, 12, e17790. <https://doi.org/10.7717/peerj.17790>
- Zarei, F., & Soleimaninejad, M. (2018). Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1), 906–911. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1439836>
- Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 236(4), 2459–2481. <https://doi.org/10.1002/jcp.30103>
- Zhang, Z., Zhang, Y., Gao, F., Han, S., Cheah, K. S., Tse, H. F., & Lian, Q. (2017). CRISPR/Cas9 Genome-Editing System in Human Stem Cells: Current Status and Future Prospects. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 9, 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.09.009>
- Zhao, M. L., Chen, T., Zhang, T. H., Tian, F., & Wan, X. (2021). H19 Overexpression Improved Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in Ulcerative Colitis by Modulating the miR-141/ICAM-1 and miR-139/CXCR4 Axes. *Disease markers*, 2021, 7107705. <https://doi.org/10.1155/2021/7107705>

