

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**WHARTON JÖLESİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİNİN ENDOTEL HÜCRELERE
FARKLILAŞMASINDA
ANTİOKSİDAN MOLEKÜLLERİN ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

ÖZGE TEZCAN

BİYOKİMYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970081

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**WHARTON JÖLESİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİNİN ENDOTEL HÜCRELERE
FARKLILAŞMASINDA
ANTİOKSİDAN MOLEKÜLLERİN ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

BİYOKİMYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE TEZCAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Pınar AKAN

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube
Müdürlüğü tarafından 2017.KB.SAG.028 kodu ile desteklenmiştir.

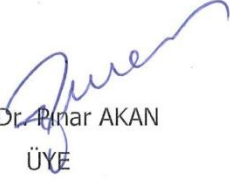
TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970081

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı,
Biyokimya Yüksek Lisans programı öğrencisi Özge TEZCAN "**WHARTON JÖLESİ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN ENDOTEL HÜCRELERE
FARKLIŞMASINDA ANTİOKSİDAN MOLEKÜLLERİN ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**" konulu Yüksek Lisans tezini 03.05.2019 tarihinde başarılı olarak
tamamlamıştır.



Prof. Dr. Sezer UYSAL
BAŞKAN

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)



Prof. Dr. Pınar AKAN
ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)



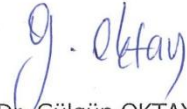
Prof. Dr. Aslıhan BÜYÜKÖZKÜTÜK KARUL
ÜYE

(Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi)



Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK
ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)



Prof. Dr. Gülgün OKTAY
ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç. Dr. Yusuf KURTULMUŞ
YEDEK ÜYE

(Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç. Dr. Özlem GÜRSOY ÇALAN
YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2.GENEL BİLGİLER.....	8
2.1.Kök Hücre	8
2.1.1.Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	8
2.1.2.Mezenkimal Kök Hücreler.....	10
2.1.3.Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücreleri	11
2.2.Kök Hücre Enerji Metabolizması	12
2.3.Kök Hücrelerde Farklılaşma Sürecinde Oksidatif Stres.....	14
2.4. Antioksidan Bileşenler ve Kök Hücre Sağkalımı-Farklılaşması	16
2.5. Endotelyal Farklılaşma	18
3.GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Araştırmanın Tipi.....	19
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	19
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	19
3.4. Çalışma Materyali.....	19
3.5.Araştırmanın Değişkenleri	20
3.6.Veri Toplama Araçları	20
3.6.1.Göbek Kordonunun Temini.....	22
3.6.2.WJ-MKH'lerin İzolasyonu	22
3.6.3.WJ-MKH'lerinin Kültürü	24
3.6.4.Karakterizasyon Deneyleri.....	25
3.6.5.WJ-MKH'lerine Antioksidan Molekül ve H ₂ O ₂ Uygulaması.....	32
3.6.6. Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testleri	34

3.6.7. BCA Protein Tayini.....	35
3.6.8. Antioksidan Enzim Aktivite Ölçümü	36
3.6.9. WJ-MKH'lerinin Endotelial Hücre Farklılaşması ve Progenitor Endotelial Hücre Eldesi	41
3.6.10. Endotelial Farklılaşma Sürecinde Total ROT Ölçümü	42
3.6.11. WJ-MKH'lerinde ve Endotelial Hücrelerinde MDA Analizi	42
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	45
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	45
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	46
3.10. Etik Kurul Onayı	46
4. BULGULAR	47
4.1. WJ-MKH'lerin İzolasyon Süreleri ve Proliferasyon Hızları	47
4.2. WJ-MKH Karakterizasyonu	48
4.2.1. Akış Sitometri Sonuçları	48
4.2.2. WJ-MKH'lerinin İF Mikroskop ile Değerlendirilmesi	50
4.2.3. WJ-MKH'lerinin RT-PZR ile değerlendirilmesi	52
4.2.4. WJ-MKH'lerinin kantitatif PZR ile değerlendirilmesi.....	53
4.2.4.1. WJ-MKH'lerinin karakterizasyonunun kantitatif PZR sonuçları.....	53
4.2.4.2. Endotelial farklılaşma sürecinde antioksidan enzim aktivitelerinin kantitatif PZR sonuçları	55
4.3. Canlılık ve Proliferasyon Testi Sonuçları.....	57
4.4. Antioksidan Enzim Aktivite Sonuçları	60
4.5. Endotelial Farklılaşma Sonrası Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları	67
4.6. Endotelial Farklılaşma Sürecinde Total ROT Ölçümü	68
4.7. Endotelial Farklılaşma Sürecinde MDA Analizi Sonuçları.....	69
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
7. KAYNAKLAR	77
8. EKLER	84
8.1. Ek-1 Gönüllü Bilgilendirme Formu	84

8.2.Ek-2 Etik Kurul Onayı	87
8.3.Ek-3 Özgeçmiş	88



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücreler	9
Şekil 2: İnsan göbek kordonu ve iç yapısı	12
Şekil 3: Kök hücre enerji metabolizması	13
Şekil 4: Kök hücrelerde oksidatif stres mekanizması	14
Şekil 5: Antioksidan moleküllerin sınıflandırması.....	17
Şekil 6: Eksplant kültür yöntemi (A) ve (B); kordonun genel görüntüsü; Göbek kordonundan elde edilen eksplantlar petri kabında (C) ve 6 kuyucuklu kültür kaplarına (D) ekildi.	23
Şekil 7: insan MKH fonksiyonel tanımlama kit protokolü	25
Şekil 8: WJ-MKH'lerinin osteojenik ve adipojenik farklılaşmasına ait histokimyasal boyama görüntüleri. (A: 10X büyütme) ve (B: 100X büyütme); osteojenik farklılaşma grubu (Alizarin red boyaması), (C: 100X büyütme) ve (D: 100X büyütme); adipojenik farklılaşma grubu (Oil red boyaması)	26
Şekil 9: WJ-MKH'lerinin kondrojenik farklılaşmasına ait histokimyasal boyama görüntüleri. (A: 100X büyütme) ve (B: 20X büyütme); kondrojenik farklılaşma (Alcian blue boyaması).....	27
Şekil 10: NAC, AAP ve NaSe'nin konsantrasyonunu belirlemek üzere yapılan hücre canlılığı ön çalışma verileri Sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu x100) formülü ile canlılık (%) olarak hesaplanmıştır.(* Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek , $p < 0,05$, sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=3$).	33
Şekil 11: WST-1 kit probunun dönüşümü	34
Şekil 12: BCA protein tayini için örnek hazırlığı, BCA reaktifi ve Cu^{+1} ile reaksiyonu	35
Şekil 13: BSA standart eğri grafiği.....	36
Şekil 14: SOD ölçüm prensibinin şematize gösterimi.....	36
Şekil 15: SOD aktivite hesaplaması	37
Şekil 16: Örnek bir H_2O_2 standart eğrisi	39
Şekil 17: Örnek bir NADPH standart eğrisi	41
Şekil 18: MDA analizi sonrası kromatogram görüntüleri (A); MDA kalibratör kromatogramı, (B); WJ-MKH lizati kromatogramı	44
Şekil 19: Eksplant yöntemi ile izole edilen WJ-MKH'lerinin periyodik zaman aralıklarında pasajlanması sonucu hücre miktarındaki değişimler (sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak verilmiştir, $p > 0.05$; $n=3$)	48
Şekil 20: Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH'lerinin eksplantlardan 9-10. günde ilk çıkışları (A); 10X büyütme (B); 4X büyütme ve genel görüntüleri (C); 10X büyütme, (D); 40X büyütme	48
Şekil 21: Örnek bir akış sitometri verisi, WJ-MKH'lerine ait bir flow örneğindeki CD 90, CD44, CD105, CD73 yüzey antijenlerinin yüzde oranları	49
Şekil 22: Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH'lerinin pasaj sayısına göre yüzey antijeni yüzde değişimleri, eksplant yöntemiyle izole edilen ve idame ettirilen WJ-MKH'lerinin CD 90, CD 44, CD 105 ve CD 73 yüzey antijenlerinin 2,3 ve 4. pasajlarındakida yüzey	50

Şekil 23: WJ-MKH'lerinin karakterizasyonu için elde edilen hücre yüzey antijenlerin immunfloresans görüntüleri (A); FITC işaretli (yeşil) CD90 antikoru ışımaya görüntüsü, nükleus (mavi;DAPI), (B); Fikoeritrin işaretli (turuncu) CD44 antikoru ışımaya görüntüsü, nükleus (mavi;DAPI), (10X'lik büyütme), (A)(B); WJ-MKH pasaj-2.....	51
Şekil 24: WJ-MKH'lerinin osteojenik farklılaşması, (A); 10X'lik büyütme, (B); 20X'lik büyütme, sitosol: FITC (yeşil), nükleus: DAPI (mavi).....	51
Şekil 25: WJ-MKH'lerinin adipojenik farklılaşması, (A); 20X'lik büyütme, (B); 10X'lik büyütme, sitosol: FITC (yeşil), nükleus: DAPI (mavi).....	52
Şekil 26: GAPDH, CD90 ve CDH2 genleri için agaroz jel elektroforezi görüntüleri MKH karakterizasyonu için izole edilen cDNA örnekleri ile GAPDH, CD90 ve CDH2 genleri için elde edilen PCR ürünlerinin varlığı %2'lik agaroz jel elektroforezinde de gösterilmiştir. (A); Farklı pasaj dönemlerine ait cDNA örnekleri kullanılarak yapılan GAPDH genine ait PZR ürünleri, (B); CD90 genine ait PZR ürünleri (C); CDH2 genine ait PZR ürünleri, (D); CDH2 geni için artan MgCl ₂ konsantrasyonuna ile elde edilen jel elektroforezi görüntüleri	53
Şekil 27: WJ-MKH'leri ile yapılan CD105 genine özgü primerler kullanılarak yapılan bir kantitatif PZR deneyi sonrası örneklerin erime eğrileri ve pikleri (T _m değerleri).....	54
Şekil 28: WJ-MKH'lerinde koşula bağlı CD90 gen ekspresyon değişimleri. WJ-MKH'lerinde pasaj grupları arasında koşula bağlı CD90 gen ekspresyonlarını farklılaşması indüklenmiş hücrelerde 10. Günü sonunda belirgin olarak azaldığı bulundu (* kontrole göre anlamlı azalma p<0.05, sonuçlar ort±SEM olarak ifade edilmiştir, n=3).	55
Şekil 29: WJ-MKH grubunda antioksidan enzimlerine ait relatif gen ekspresyon değişimleri.....	56
Şekil 30: WJ-MKH grubunda antioksidan enzim genlerine ait kat değişikliği	56
Şekil 31: EF grubunda antioksidan enzimlerine ait relatif gen ekspresyon değişimleri	57
Şekil 32: EF grubunda antioksidan enzim genlerine ait kat değişikliği	57
Şekil 33: WJ-MKH'lerinde 10 günlük NAC, AAP ve NaSe uygulamasının hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi. Sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu x100) formülü ile canlılık (%) olarak verilmiştir.(* Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek , p<0,05, sonuçlar ort±SEM olarak ifade edilmiştir, NAC (2mM), AAP (300uM), NaSe (40nM) , n=5).	58
Şekil 34: Progenitör endotelial hücrelerde NAC, AAP ve NaSe'nin hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu x100) formülü ile canlılık (%) olarak verilmiştir (* EF grubuna göre anlamlı yüksek , p<0,05, sonuçlar ort±SEM olarak ifade edilmiştir, NAC (2mM), AAP (300uM), NaSe (40nM) n=10).....	58
Şekil 35: Endotelial farklılaşma sürecinde hücre canlılığı ve proliferasyonunun WJ-MKH lere göre değişimi. Sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu x100) formülü ile proliferasyon (%) olarak verilmiştir (*WJ-MKH grubuna göre anlamlı fark , p<0,05, sonuçlar ort±SEM olarak ifade edilmiştir, NAC (2mM), AAP (300uM), NaSe (40nM) n=10).....	59

Şekil 36: WJ-MKH'lerinde 2 saatlik H ₂ O ₂ uygulamasının hücre canlılığı üzerine uygulama dozuna bağlı etkisi.....	59
Şekil 37: EF hücrelerinde 2 saatlik H ₂ O ₂ uygulamasının hücre canlılığı üzerine uygulama dozuna bağlı etkisi.....	60
Şekil 38: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde GPx enzim aktivite düzeyi (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$)	61
Şekil 39: WJ-MKH'lerinde GPx enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH+ H ₂ O ₂ grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$, GPx: glutatyon peroksidaz).....	61
Şekil 40: EF grubu hücrelerinde GPx enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*EF grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$).....	61
Şekil 41: WJ-MKH'lerinde 2 saatlik H ₂ O ₂ uygulaması sonrası GPx enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH+ H ₂ O ₂ grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek, ** WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük; $p<0,05$).....	62
Şekil 42: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H ₂ O ₂ uygulaması sonrası GPX enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*EF+AA+H ₂ O ₂ grubunda EF grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$).....	62
Şekil 43: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde katalaz enzim aktivite düzeyi (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$)	63
Şekil 44: WJ-MKH'lerinde Katalaz enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük $p<0,05$ $n=6$).....	63
Şekil 45: EF grubu hücrelerinde Katalaz enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*EF grubuna göre anlamlı düşük, $p<0,05$ $n=6$)	64
Şekil 46: WJ-MKH'lerinde 2 saatlik H ₂ O ₂ uygulaması sonrası katalaz enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH+ H ₂ O ₂ grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük, ** WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük; $p<0,05$ $n=6$).....	64
Şekil 47: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H ₂ O ₂ uygulaması sonrası katalaz enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (* EF grubuna göre anlamlı düşük; $p<0,05$ $n=6$).....	65
Şekil 48: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde SOD enzim aktivite düzeyi (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$)	65
Şekil 49: WJ-MKH'lerinde SOD enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük $p<0,05$ $n=6$)	66
Şekil 50: EF grubunda SOD enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*EF grubuna göre anlamlı düşük $p<0,05$ $n=6$).....	66
Şekil 51: WJ-MKH'lerinde 2 saatlik H₂O₂ uygulaması sonrası SOD enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük, $p<0,05$ $n=6$).....	67
Şekil 52: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H ₂ O ₂ uygulaması sonrası SOD enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (* EF grubuna göre anlamlı düşük; $p<0,05$ $n=6$)	67

Şekil 53: Ters faz ışık mikroskopik görüntüler Endotelial farklılaşma amaçlı rich medium uygulaması sonrası 3 .gün ters faz ışık mikroskobu görüntüsü. (A); (10X büyütme, WJ-MKH pasaj-2 hücreleri), (B) ve (C), Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan HUVEC'lere ait ters faz ışık mikroskobu görüntüleri (10X)	68
Şekil 54: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde total ROT miktarı (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$).....	69
Şekil 55: WJ-MKH'leri edotelyal farklılaşma grubu hücrelerinde 2 saatlik H_2O_2 uygulaması sonrası oksidatif strese bağlı total ROT miktarı (*EF+ H_2O_2 grubunda WJ-MKH+ H_2O_2 grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$).....	69
Şekil 56: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde total MDA miktarı (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$ MDA: malondialdehit)	70
Şekil 57: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H_2O_2 uygulaması sonrası oksidatif strese bağlı total MDA miktarı (*EF+ H_2O_2 grubunda EF grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$ MDA: malondi aldehit)	70
Şekil 58: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H_2O_2 uygulaması ardından antioksidan molekül muamelesi sonrası oluşan oksidatif strese bağlı total MDA miktarı (*EF+ H_2O_2 +NAC grubunda EF grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$ MDA: malondi aldehit)	71
Şekil 59: WJ-MKH grubu hücrelerinde 2 saatlik H_2O_2 uygulaması ardından antioksidan molekül muamelesi sonrası oluşan oksidatif strese bağlı total MDA miktarı (*WJ-MKH+ H_2O_2 grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$ MDA: malondi aldehit)	71

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Kullanılan cihazlar	20
Tablo 2: Kullanılan kimyasallar	20
Tablo 3: Kullanılan kitler	21
Tablo 4: cDNA sentezi genomik DNA eliminasyon basamağı	29
Tablo 5: cDNA sentezi reverse transkripsiyon mix basamağı	29
Tablo 6: RT-PZR için kullanılan primer sekansları ve Tm değerleri	30
Tablo 7: qPZR için kullanılan primer sekansları	31
Tablo 8: qPZR reaksiyon bileşenleri	31
Tablo 9: qPZR için sıcaklık ve tur sayısı ayarlaması	31



KISALTMALAR

AcCoA: Asetil Koenzim A

APP: Askorbik asit-2-fosfat

ATP: Adenozin Trifosfat

cDNA: Komplamenter DNA

CD: Farklılaşma Yüzey Antijen Kümeleri

CM-H₂DCFDA: Karboksimetil Dikloroflorosein Diasetat

EE-MKH: Ekstra Embriyonik Mezenkimal Kök Hücre

EF: Endotelyal Farklılaşma

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

EKH: Embriyonik Kök Hücre

FAO: Yağ Asidi Oksidasyonu

FBS: Fötal Sığır Serum

GAPDH: Gliseraldehit 3- fosfat dehidrogenaz

GPx: Glutatyon Peroksidaz

GKK-MKH: Göbek Kordonu Kanı Mezenkimal Kök Hücre

iPKH: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

KAT: Katalaz

Kİ-MKH: Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre

MDA: Malondialdehit

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

NAC: N-asetil Sistein

NaSe: Sodyum Selenit

NOT: Nitrik Oksijen Türü

OKFOS: Oksidatif Fosforilasyon

PBS: Fosfat Tamponlu Fizyolojik Solüsyon

RT-PZR: Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ROT: Reaktif Oksijen Türü

SOD: Süperoksit Dismutaz

qPZR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PZR)

WJ-MKH: Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücre

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca benden desteğini ve değerli bilgilerini esirgemeyen, her koşulda öğrencisinin moral ve motivasyonunun düşmemesi için yapıcı tutumunu koruyarak bilimsel anlamda bu zorlu ve sabır gerektiren süreçte yanımda olan sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Pınar AKAN'a,

Yüksek lisansa başladığım dönem laboratuvar ortamında pek çok tecrübe kazanmama yardımcı olan ve emeklilik süresine kadar bana danışmanlık yapan hocam Sayın Prof. Dr. Kemal BAYSAL'a,

Eğitim süreci boyunca öneri ve yardımlarını bizden esirgemeyen başta Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Sezer UYSAL olmak üzere diğer öğretim üyelerimize, güler yüzünü hiç kaybetmeyen anabilim dalı sekreterimiz Eda OLUM ve anabilim dalı personellerimize,

Anabilim dalında güzel bağlar kurarak bilgi ve tecrübelerimizi paylaştığımız yüksek lisans ve doktora sürecindeki arkadaşlarıma,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yaşadığım teknik aksaklıklarda yardımlarını esirgemeyen ARLAB birimi çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini benden asla esirgmeden her zaman arkamda olduklarını hissettiren kıymetli canım aileme, iyi günümde kötü günümde beni asla yalnız bırakmayan can yoldaşıma,

Bu araştırmaya destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Özge TEZCAN

WHARTON JÖLESİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN ENDOTEL HÜCRELERE FARKLILAŞMASINDA ANTİOKSİDAN MOLEKÜLLERİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Özge TEZCAN, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Giriş ve amaç: Rejeneratif tıp alanında kök hücre terapisinin başarısı, stres ortamında kök hücrelerin hayatta kalma ve hasarlı dokuları yenileme yetenekleri ile ilişkilidir. Kök hücrelerin işlevsel olarak olgunlaşmış erişkin hücrelere farklılaşması sırasında hücre içinde farklı metabolik süreçlerin devreye girdiği bilinmektedir. Kök hücre farklılaşma sürecinde olası metabolik değişim sürecini tetikleyen en önemli faktörlerden birinin hücrelerin maruz kaldığı oksidatif stres olduğu ileri sürülmektedir. Ancak kök hücrelerin endotelyal hücrelere farklılaşması esnasındaki oksidatif metabolizma değişimleri henüz net olarak tanımlanmamıştır.

Çalışmamız ile multipotent mezenkimal kök hücrelerin (MKH) endotelyal hücrelere farklılaşma sürecindeki reaktif oksijen tür (ROT) düzeylerinin ve antioksidatif enzim aktivite değişimlerinin belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca oksidatif stres üzerinde etkili olabilecek uygulamaların hücre canlılığı ve farklılaşma sürecine etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra, WJ-MKH'lerinin izolasyonu, endotelyal hücrelere farklılaşması ve karakterizasyonu için uygulanabilir etkin bir protokolün kendi laboratuvar koşullarımızda oturtulması da hedeflendi.

Yöntemler: Göbek kordonu Wharton jölesinden (WJ) enzimatik ve eksplant yöntemi ile MKH'ler elde edilerek, proliferasyon kapasiteleri karşılaştırıldı. İzolasyon sonrası MKH karakterizasyonu için CD44, CD90, CD105 yüzey antijenlerinin gen ve protein ekspresyon düzeyleri kantitatif PZR, immunohistokimya ve akış sitometrisi yöntemleri ile gösterildi. Elde edilen MKH'lerin endotelyal hücrelere farklılaştırılma sürecine antioksidan moleküllerin etkisinin incelenmesi için N-asetil sistein (NAC), askorbik asit (AAP) ve sodyum selenit (NaSe) uygulamasının etkileri değerlendirildi. Kök hücrelerin kendi kendini yenileme ve farklılaşması sürecinde

hücrel MDA, total ROT miktarı ve antioksidan enzim aktivite düzeylerinin değişimi fotometrik ve florometrik olarak incelendi. Antioksidan enzimlerin gen ekspresyon düzeyleri kantitatif PZR ile değerlendirildi. Ayrıca H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres modelinde kök hücrelerin ve progenitör endotelial hücrelerin reaktif oksijen türleri yanı sıra CAT, SOD ve GPx enzimlerinin değişimleri de analiz edildi.

Bulgular: WJ-MKH ve endotelial hücre karakterizasyonu kapsamında yapılan deneylerde ileri pasaj sayısının ($>4-5$) MKH karakterizasyonunda azalmaya yol açtığı saptandı. WJ-MKH'lerinde NAC (2mM) hücre canlılığı artırdığı gözlemlendi ($p<0.05$) Endotelial hücrelerde ise NAC ve askorbik asit uygulaması hücre canlılığını sırası ile ortalama $\sim\%40$ ve $\sim\%20$ oranında artırırken, Na-selenit uygulamasının olumlu bir etkisi görülemedi. Endotelial hücrelerde total ROT ve MDA miktarının WJ-MKH'lerine göre sırası ile ortalama ~ 7 ve ~ 2 kat artırdığı belirlendi. Endotelial farklılaşma sürecinde katalaz ,glutasyon peroksidaz enzim aktivitelerinin anlamlı arttığı gösterildi ($p<0,05$). Oksidatif stres oluşturmak amacı ile üç saatlik H_2O_2 (300 μM) uygulamasının kök hücre canlılığını kontrol grubuna göre $\sim\%60$ oranında azalttığı ve antioksidan enzim düzeylerini belirgin olarak düşürdüğü gösterildi. NAC, uygulamasının WJ-MKH'lerini H_2O_2 toksisitesine karşı koruduğu ancak endotelial farklılaşması indüklenmiş hücrelerde ise oksidatif stres düzeyini tam olarak baskılayamadığı gözlemlendi.

Sonuç: Sonuç olarak literatür taramalarımıza göre bu tez çalışması ile ilk kez NaSe, AAP ve NAC uygulamalarının WJ-MKH'lerinin kendi kendini yenilemesi ve endotelial farklılaşma süreci üzerine etkileri gösterildi. WJ-MKH lerin izolasyon protokolü laboratuvar koşullarımızda optimize edilerek, elde edilen hücrelerin MKH karakterleri protein ve gen ekspresyonları düzeyinde gösterildi. Endotelial farklılaşma protokolü kendi laboratuvar koşullarımızda uygulanabilir hale getirilerek, bu süreçteki oksidatif strese bağlı metabolik değişimler belirlendi. Çalışmamız ile elde edilen veriler ve protokollerin daha sonra planlanabilecek rejeneratif tıp uygulamaları kapsamındaki projeler için temel bir basamak oluşturabilecek kapasitede olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Wharton Jölesi, Mezenkimal Kök Hücre, Endotelial Farklılaşma, Oksidatif Stres

DETERMINATION OF THE ROLE OF ANTIOXIDANT MOLECULES IN DIFFERENTIATION PROCESSES OF WHARTON'S JELLY MESENCHYMAL STEM CELLS INTO ENDOTHELIAL CELLS

Özge TEZCAN, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Introduction and aim: The success of stem cell therapy in regenerative medicine is related to the ability of stem cells to survive and to restore damaged tissues in a stressful environment. When differentiating stem cells into functionally mature adult cells, different metabolic processes are involved in the cell. It is suggested that one of the most important factors triggering the process of possible metabolic change in the process of stem cell differentiation is the oxidative stress to which the cells are exposed. However, oxidative metabolism changes during the differentiation of stem cells to endothelial cells have not been clearly defined.

In our study, it was aimed to determine the reactive oxygen species (ROS) levels and antioxidative enzyme activity changes in the differentiation process of multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) to endothelial cells. Also to determine the effects of the applications that may be effective on oxidative stress on cell viability and differentiation process of WJ-MSCs into endothelial cells were aimed.

Methods: MSCs were obtained from Wharton's jelly of the umbilical cord by enzymatic and explant method and their proliferation capacity was compared. The gene and protein expression levels of CD44, CD90, CD105 surface antigens were determined by quantitative PCR, immunohistochemistry and flow cytometry methods. 2 mM N-acetyl cysteine (NAC), 300 μ M ascorbic acid (AAP) and 40 nM sodium selenite (NaSe) were applied to investigate the effect of antioxidant molecules on the differentiation of MSCs to endothelial cells. In addition, 200 μ M H₂O₂ was applied to determine the oxidative stress that is thought to affect the differentiation process. Fluorometric measurement was performed by using carboxymethyl dichlorofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA) probe to determine ROS level against oxidative stress in

WJ-MSCs. MDA analysis was also performed by HPLC method to determine cellular oxidative stress damage. The change in catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) enzyme activities in the differentiation process were evaluated by using colorimetric enzyme activity measurement kits. Antioxidant molecules and changes in gene expression of CAT, SOD and GPx enzymes against H₂O₂ were analyzed by quantitative PCR.

Results: In the experiments conducted under WJ-MSC and endothelial cell characterization, the number of advanced passages (> 4-5) was found to lead to a decrease in MSC characterization. It was observed that the treatment with NAC(2mM) increased the cell viability in WJ-MSCs ($p < 0.05$). In endothelial cells, NAC and ascorbic acid application increased cell viability by ~ 40% and ~ 20% respectively, whereas Na-selenite application did not have a positive effect. It was determined that total ROT and MDA levels in endothelial cells increased by ~ 7 and ~ 2-fold, respectively, according to WJ-MSCs. In the endothelial differentiation process, it was shown that catalase and glutathione peroxidase enzyme activities increased significantly ($p < 0.05$). It was shown that three-hour treatment with H₂O₂ (300 μ M) decreased 60% of stem cell viability compared to control group, significantly decreased antioxidant enzyme levels, induced oxidative stress in WJ-MSC. NAC application protected WJ-MSCs against H₂O₂ toxicity, but in the endothelial differentiated cells, oxidative stress level was not to be fully suppressed.

Conclusion: As a result, according to our literature reviews, the effects of NaSe, AAP and NAC on WJ-MSCs' self-renewal and endothelial differentiation process were shown for the first time. The isolation protocol of WJ-MSCs was optimized in our laboratory conditions and the MSC characters of the cells were shown at the level of protein and gene expression. The endothelial differentiation protocol was made available in our laboratory conditions and metabolic changes due to oxidative stress were determined in this process. The data and protocols obtained by our study are thought to be the basic step for the projects that can be planned later in the scope of regenerative medicine applications.

Keywords: Wharton's Gel, Mesenchymal Stem Cell, Endothelial Differentiation, Oxidative Stress

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler, deneysel araştırmalar için kök hücreler değerli birer kaynak olarak görülürken, son dönemde rejeneratif tıp alanında da sıklıkla kullanılmaya başlanmış ve bu özellikleri sayesinde günümüzde önem kazanmıştır. Buna yönelik olarak üzerinde en fazla çalışılan ve klinik tedavide kullanılan kök hücreler erişkin doku türevli kemik iliği kök hücreleri (Kİ-KH) dir. Erişkin doku türevli kök hücrelere ilave olarak insan perinatal ve postnatal dokularında da multipotent kök hücreler tespit edilmiş ve "ekstra embriyonik mezankimal kök hücreler (EE-MKH)" olarak tanımlanmıştır [1]. EE-MKH içinde bir grup, göbek kordonu yapısının iç kısmını kuşatan ve Wharton jölesi olarak adlandırılan kısımdaki Wharton jölesi mezenkimal kök hücreleri (WJ-MKH)' dir. Bu hücrelerin bilinen kök hücre özelliklerini göstermesinin yanı sıra, doku reddine yol açan proteinleri eksprese etmemeleri, immün sistem baskılayıcı/düzenleyici fonksiyonları nedeni ile erişkin kemik iliği mezenkimal kök hücre (Kİ-MKH)' lerine göre üstün oldukları gösterilmiştir [2]. Günümüzde Wharton jölesinden kök hücre eldesi ve sonrası farklılaştırılması için literatürde protokoller tanımlanmasına karşın, bunun paralelinde yapılacak olan araştırmalarda kök hücre farklılaştırma protokollerinin optimize edilmesinin gerektiği düşünülmektedir. Ülkemiz koşullarında primer kökenli kök hücre eldesi ve farklılaştırma protokolleri gerekli malzeme, araç-gereç ve alt yapı kısıtlamalarından dolayı sınırlı sayıda laboratuvarıda uygulanabilmektedir.

Kök hücreler fizyolojileri ve enerji ihtiyaçları bakımından kullandıkları metabolik yollarla, özelleşmiş somatik hücrelere göre farklılık göstermektedirler. Bu farklılığa ilişkin yapılan araştırmalarda kök hücre ve mitokondri ilişkisi üzerinde durularak, kök hücrelerdeki "metabolik plastisite" üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarla Kök hücrelerde genel olarak enerji metabolizmasının yoğun bir şekilde glikoliz üzerinden sürdürüldüğü ve fonksiyonel olarak olgun mitokondri yoksunluğundan dolayı pirüvat kullanımının az olduğu vurgulanmaktadır [3]. Kök hücrelerin farklılaşması sürecinde glikoliz ağırlıklı bir metabolizmadan, mitokondrilerdeki elektron transfer zinciri (ETZ) ve ATP sentazın rol aldığı oksidatif fosforilasyona doğru enerji ihtiyacını karşılamaya

yönelik metabolik bir dönüşüm olduğu ortaya atılmaktadır. Bu metabolik değişimi tetikleyen biyokimyasal mekanizmalar ise henüz çok az bilinmektedir.

Kök hücre farklılaşmasının kontrolünün, genom düzeyinde olmakla beraber buna eşlik eden hücre içi anabolizma ve katabolizma olaylarıyla fizyolojik bir denge halinde tutulmaya çalışıldığı vurgulanmaktadır [4]. Günümüzde kök hücre eldesi, çoğaltılması ve çeşitli hücre tiplerine farklılaştırılması üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bu süreçle ilişkili olarak mitokondriyel biyogenezin ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) kök hücre farklılaşması üzerine etkisi henüz net olarak tanımlanmamıştır.

Son dönem yaygın olan rejeneratif tıp uygulamalarında hasarlı doku veya organlara kök hücre transplantasyonunda, tedavi ve iyileşme sürecinin nakledilen kök hücrelerin işlevselliğini koruyarak sağ kalma yeteneğine bağlı olduğu savunulmaktadır [5][6]. Buna ilişkin olarak özellikle MKH'lerin travma ya da yaralanmalara bağlı olarak doku tamir mekanizması üzerine olumlu etkileri ortaya konulmuştur. Kardiyovasküler vasküler sistem, ateroskleroz ve endotel hasarı patogenezi incelendiğinde doku hasarına neden olan temel faktörlerden birinin oksidatif stres koşulları olduğu vurgulanmaktadır [5][7]. Diğer taraftan oksidatif stresin belli bir değerin altında olmasının, kök hücre farklılaşmasını etkilediği saptanmıştır [8]. MKH'lerin kemik, yağ ve kıkırdak dokusuna farklılaşmanın yanı sıra, endotel hücre farklılaşmasında da oksidatif stresin yani ROT'ların önemli olduğu ileri sürülmektedir [9]. Kök hücre farklılaşması sürecinde oksidatif strese karşı koruyucu mekanizma olarak kullanılacak antioksidan moleküllerin kök hücreler üzerine nasıl bir etkisi de henüz net olarak bilinmemektedir. Ayrıca literatür taramamıza göre henüz WJ-MKH'lerinin endotel hücrelere farklılaşmasında oksidan ve antioksidan moleküllerin rolü tanımlanmamıştır.

Çalışmamız ile WJ-MKH'lerin endotel hücrelere farklılaşma sürecindeki ROT düzeylerinin ve antioksidatif enzim aktivite değişimlerinin belirlenmesi, ROT değişimlerinin endotel hücrelere farklılaşma üzerine etkisini ve bu süreçte antioksidan moleküllerin rolünün belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca WJ-MKH'lerinin izolasyonu, endotel hücrelere farklılaşması ve karakterizasyonu için kendi laboratuvar koşullarımızda uygulanabilir etkin bir protokolün oturtulması da hedeflendi.

Bu tez çalışması ile ulaşmayı çalıştığımız hedefler aşağıdaki gibi özetlenebilir ;

- WJ-MKH' lerin izolasyon protokolünün laboratuvar koşullarımızda optimize edilerek, elde edilen hücrelerin kök hücre karakteristiklerinin gen ve protein ekspresyonları düzeyinde gösterilmesi

- Endotelyal farklılaşma protokollerinin kendi laboratuvar koşullarımızda uygulanabilir hale getirilmesi, farklılaşan hücrelerin karakterize edilmesi

- WJ-MKH'lerin endotelyal farklılaşma sürecindeki hücresel reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve antioksidan enzim aktivite değişimlerinin belirlenmesi

- Hidrojen peroksit (H_2O_2) uygulamasıyla oluşturulan oksidatif stres ortamına WJ-MKH' lerin verdiği hücresel yanıtın belirlenmesi

- Antioksidan moleküller olan N-asetil sistein (NAC), Na-selenit (NaSe) ve askorbik asit (AAP) uygulamasının WJ-MKH canlılığı ve endotelyal farklılaşma sürecine etkilerinin değerlendirilmesi

Çalışmamız ile elde edilen veriler ve protokoller daha sonra planlanabilecek rejeneratif tıp uygulamaları kapsamındaki projeler için temel bir basamak oluşturabilir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kök Hücre

Kök hücreler, ontogenez sürecinde köken aldıkları zaman aralığına göre; embriyonik, fetal ve erişkin kök hücreler olmak üzere temelde üç ana sınıfa ayrılmaktadırlar. Tarihsel olarak bakıldığında ilk kök hücre popülasyonu, McCulloch ve Till adlı araştırmacılar tarafından 1960' ların başında erişkin fare kemik iliğinde tespit edilmiştir. Daha sonra hematopoetik kök hücreler (HKH) olarak adlandırılacak bu koloni oluşturan hücreler, fare dalak hücreleriyle yapılan öncül bir çalışma ile ortaya konulmuştur. Bunun beraberinde yapılan araştırmalar kök hücre popülasyonunda; "kendini yenileyebilme ve proliferasyon olabilmek" olarak nitelendirilecek iki önemli karakteristiği ortaya çıkarmıştır. Bu kavramlar, kan ve deri gibi hücrelerin canlının yaşamı boyunca yenilenmesi gerekliliğinden yola çıkılarak ortaya atılmıştır [10]. McCulloch ve ekibinin öncül kök hücre popülasyonlarıyla yaptığı bu araştırmalar bir dönüm noktası olarak kök hücre biyolojisinin temelini oluşturmuştur. 20.yüzyılın ortalarından itibaren kök hücre biyolojisiyle ilgili çalışmalar ivme kazanarak günümüze kadar ulaşmış ve bu hücrelere ilişkin iki temel özellik literatürlerde sağlam bir şekilde yerini almıştır. Bu özelliklerden birincisi, uzun süre devam eden bölünme yeteneğiyle kendini yenileyebilen hücreler olmaları; ikincisi ise çeşitli uyaranlar aracılığıyla vücutta bulundukları doku ve organa göre işlevsel olarak özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme kapasiteleridir. Kök hücreler embriyonik ve erişkin dokulardan elde edilebildiği gibi, prenatal ve postnatal olarakta elde edilebilir. Kök hücrelerin farklılaşma yetenekleri köken aldıkları hücre tiplerine göre farklılık göstermektedir[11].

2.1.1.Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre 5 gruba ayrılmaktadır (Şekil1).

Totipotent Kök Hücreler: Bu gruptaki kök hücreler, tüm embriyonik- somatik hücre ve germ hücrelerini oluşturabilme potansiyeli taşırlar. Yani bu hücreler, canlıdaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme ve doku oluşturabilme yeteneğine sahiptir [12].

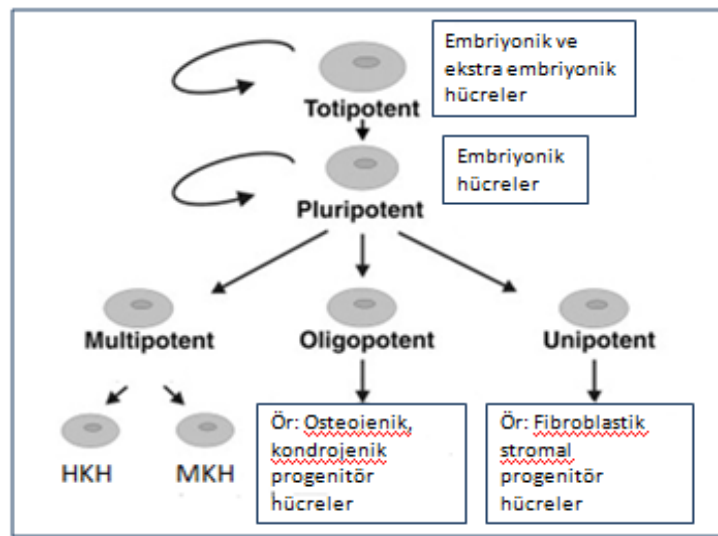
Embriyonik gelişimin başlangıcı olan zigot ve morula safhasının erken dönem hücreleri bu gruptaki hücrelerdir.

Pluripotent Kök Hücreler: Bu gruptaki kök hücreler ise totipotent hücrelerin devamı niteliğinde olup, embriyonik gelişim sürecinde oluşan blastosist yapısının iç kısmından elde edilen hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler, üç temel germ tabakasını (endoderm, mezoderm, ektoderm) oluşturabilme yeteneğine sahip olmasına rağmen, farklılaşma kapasiteleri sınırlanmaya başladığı için ekstra-embriyonik membran ve plasenta dokusunu oluşturabilme özelliğine sahip değildirler[13].

Multipotent Kök Hücreler: Bu gruptaki kök hücreler ise aynı ya da fonksiyon olarak birbirine yakın doku ve organ içindeki hücelere farklılaşabilme kapasitesine sahiptirler. Göbek kordonu kanında, yağ, kemik ve kalp dokusunda bulunan mezenkimal kök hücreler bu gruba örnek gösterilebilecek kök hücrelerdir.

Oligopotent Kök Hücreler: Belirli bir popülasyon içindeki birkaç grup hücreye farklılaşabilen kök hücrelerdir. Örneğin, dolaşım sisteminde yer alan lenfoid ve myeloid kök hücreler bu gruba dahil olan hücrelerdir.

Unipotent Kök Hücreler: Sadece kendi hücre tipini üretebilen kök hücrelerdir. Bu hücrelerin öncül (progenitör) hücrelerden farkı kendini yenileyebilme özelliğine sahip olmalarıdır.



Şekil 1: Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücreler

Kök hücreler köken aldıkları dokuya göre üç ana başlık altında incelenebilir:

Embriyonik Kök Hücreler: Döllenmenin ardından 4-5 gün sonra blastosist denilen bir yapı oluşmaktadır. Bu yapının iç kısmında embriyonik gelişimin ilerleyen dönemlerinde canlıyı oluşturacak çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahip pluripotent kök hücreler yer almaktadır. Embriyonik gelişimde bu hücreler, blastosistte "iç hücre kitlesi" olarak adlandırılan bir hücre popülasyonudur [14]. Biyolojik özelliklerine bakıldığında EKH' ler, normal bir karyotipe sahip olup, yüksek telomeraz aktivitesi göstererek, uzun dönem proliferasyon kapasitesine sahip hücreler olarak tanımlanmaktadır. EKH' ler, rejeneratif tıp için önemli bir potansiyele sahip olmasına rağmen embriyodan elde edilmesi etik kısıtlamalara neden olmaktadır [15].

Fetal Kök Hücreler: Fetüs organlarında lokalize olmuş olan ilk hücreler bu gruba dahil olan kök hücrelerdir. Fetal kök hücrelerin iki tipi bulunmaktadır:

-Tam fetal kök hücreler, oluşumunu tamamlamış fetüse ait dokulardan genellikle kürtaj sonrası elde edilen kök hücrelerdir. Bu hücreler ölümsüz olmamasına rağmen yüksek bir bölünme kapasitesine sahip olup multipotent hücrelerdir.

-Ekstraembriyonik fetal kök hücreler, ekstraembriyonik membranlardan köken almış hücreler olup, genellikle erişkin kök hücrelerden ayırt edilmemektedir. Bu kök hücreler ölümsüz olmamasına rağmen yüksek bir bölünme kapasitesinde olup pluripotent kapasiteye sahiptir ve doğum sonrası elde edilmektedir.

Erişkin Kök Hücreler: Somatik kök hücreler olarak da bilinen bu kök hücreler kemik iliği, kordon kanı, göbek kordonu, yağ dokusu, kan gibi özelleşmiş organ ve dokularda bulunur, kendini yenileyebilir ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilir. Hastalık, yaralanma, doku yenilenmesi gibi durumlarda önemli role sahiptirler [16], [17].

2.1.2.Mezenkimal Kök Hücreler

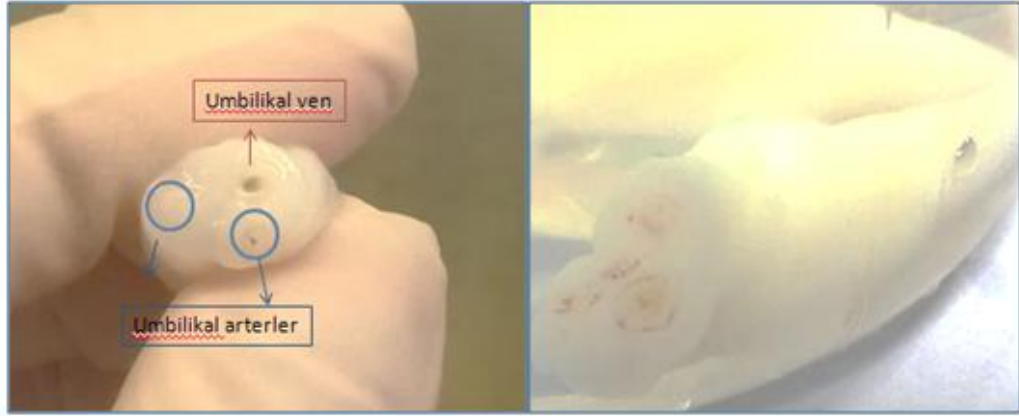
Tarihsel süreçte mezenkimal kök hücre (MKH) tanımlamasındaki ilk adımı A.J. Friedenstein adlı araştırmacı atmıştır. 1960' lı yıllarda Friedenstein yaptığı öncül araştırmalarıyla, postnatal yaşamdaki kemik iliğinin mezenkimal dokular için önemli

bir kök hücre kaynağı olduğunu belirterek çalışmalarına devam etmiştir. Daha sonrasında yaptığı deneylerinde fare kemik iliğinden izole ettiği hücrelerin, fibroblast benzeri, adherent ve klonojenik özellikte hücreler olup, yüksek ölçüde *in vitro* replikatif kapasiteye sahip olduklarını rapor etmiştir [18][19]. Araştırmalarında ayrıca bu hücrelerin multipotent karakterde olup, osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu da ifade etmiştir. Friedenstein yaptığı tüm bu öncül araştırmaların sonucunda, Kİ' nin hematopoetik kök hücrelerden (HKH) farklı olarak klonojenik, kendini yenileyebilen ve mezenkimal hücre soylarına farklılaşabilen bir hücre popülasyonu içerdiğini ortaya koymuştur [20][21]–[23].

Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlamakta en önemli kistas, "kendini yenileyebilme ve başka hücrelere farklılaşabilme potansiyeli" dir. MKH'ler bu özelliklere sahip olup, hem erişkin (kemik iliği, yağ, periferik kan) hem de ekstra embriyonik dokulardan (göbek kordunu/ kordon kanı, plasenta ve amniyon sıvısı) köken alabilmektedir [24]. MKH'ler kök hücre belirteci olarak belirli yüzey antijenlerini eksprese edebilirken, sadece MKH'lere özgü eksprese olan bir belirteç henüz keşfedilememiştir. Günümüzde MKH'ler ile ilgili yayınlanan pek çok yayında, bir hücrenin MKH olabilmesi için belirteç olarak CD105, CD73, CD44 ve CD90 yüzey antijenlerinin pozitif, CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR yüzey antijenlerinin ise negatif olması gerektiği vurgulanmaktadır [25]. Ayrıca MKH' lerin karakterizasyon açısından *in vitro* kültür koşullarında, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitesine sahip olması gerektiği vurgulanmaktadır [25].

2.1.3. Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücreleri

Göbek kordonunda iki arter ve bir ven, bunların çevresinde ise koruyucu görevi olan bir doku; Wharton jölesi bulunur (Şekil 2). Wharton jölesi mukoid bir bağ doku olup, stromal hücreler içererek hyalüronik asitçe zengindir. Stromal hücreler fibroblast-benzeri hücreler ve miyofibroblastlardır [26][27]. Wharton jölesi içindeki MKH'ler, Wharton jölesi MKH'leri (WJ-MKH) olarak adlandırılmışlardır.



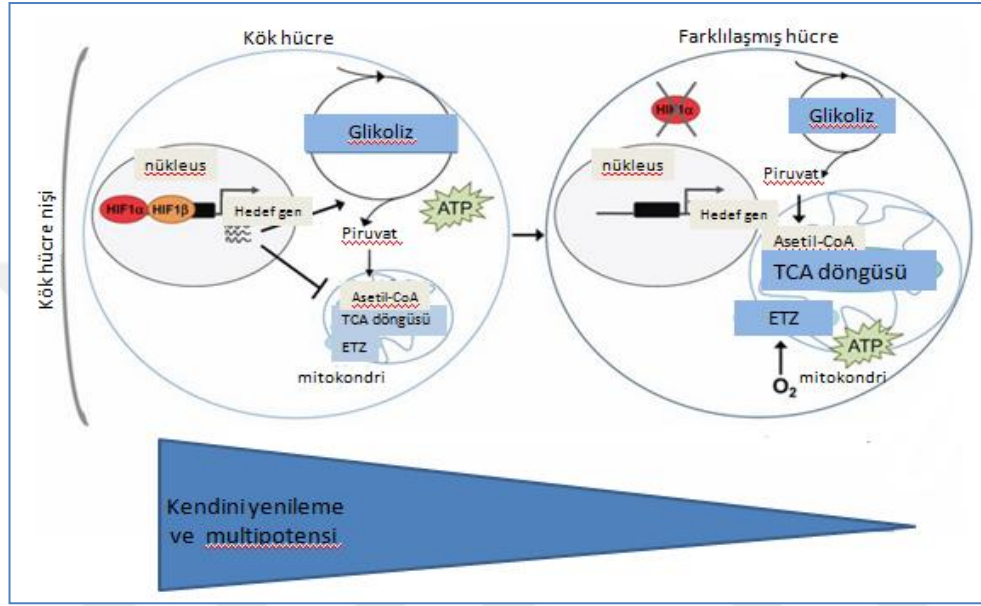
Şekil 2: İnsan göbek kordonu ve iç yapısı

Bu hücreler, embriyolojik gelişim sırasında aort-gonad-mezonefroz bölgesine göç ederken kordon etrafında kalmış olan primitif MKH'lerdir [28]. WJ-MKH'leri Uluslararası Hücre Tedavisi Derneği (International Society for Cellular Therapy; ICTS)'nin 2006'da yayınladığı minimal kök hücre kriterlerini taşımaktadırlar [25].

2.2.Kök Hücre Enerji Metabolizması

Memeli hücrelerinde hayati önemi olan biyosentetik yollar ve ATP üretimi temel olarak nükleer ve mitokondriyal DNA tarafından kodlanan proteinlerin uyumlu bir şekilde oksidasyonlarını sergilemesiyle gerçekleşmektedir. Kök hücreler proliferasyon için bölündüğünde, mitokondrilerin oluşan yavru hücreler arasındaki dağılımı asimetrik şekilde olmaktadır. Yani fizyolojik olarak daha olgun karakterdeki mitokondrilerin bir kısmı oluşan yeni yavru hücrelere aktarılırken, fizyolojik olarak daha aktif mitokondriler diğer yavru hücrelere aktarılmaktadır. Sonuç olarak genç mitokondrilere sahip olan grup kök hücre karakteristiğini korumaya devam ederken, diğer grup belirli bir hücre soyuna özelleşmiş karakteristik kazandığı vurgulanmaktadır [29]. Belirli bir hücre soyuna farklılaşma sırasında mitokondriyal biyogenezi desteklemek için mtDNA ve enerji gereksinimi kademeli olarak artmaktadır [30]. Kök hücrelerin farklılaşma sürecinde mitokondriler açısından değişim ele alındığında, küresel ve krista yapısı zayıf olan mitokondrilerin farklılaşan hücrelerde enerji metabolizması için gerekli ATP ihtiyacını garantilemek adına tubular yapıya ve belirginleşmiş kristallara sahip olduğu vurgulanmaktadır [31]. Bu değişim sürecinde eş zamanlı olarak mitokondriyal enzimlerin ve ROT'ların artışının yanı sıra glikoliz

ilişkili genlerin ifadesi ve antioksidan savunma sistemi baskılanmaktadır. Yüksek derecede proliferatif özellikteki kök hücrelerde enerji ihtiyacının büyük bir kısmı, piruvatın laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi aracılığıyla laktata dönüştürülmesiyle elde edilmektedir. Yani kök hücrelerde glukoz metabolizması, oksidatif metabolizmadan ayrı bir şekilde sürdürülmektedir (Şekil 3)[32].

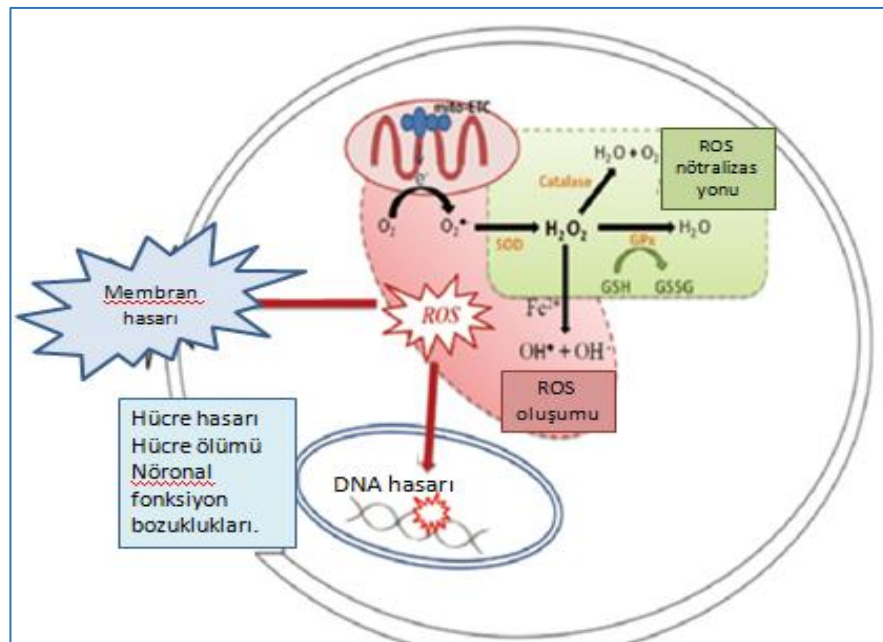


Şekil 3: Kök hücre enerji metabolizması

Ayrıca farklılaşma sürecinde doymuş/ doymamış yağ asitleri ve eikosanoid yolağı önemlidir çünkü ortama doymamış yağ asitlerinin eklenmesi eikosanoid yolağını bozarak farklılaşmayı inhibe etmektedir. Ayrıca yağ asidi oksidasyonu (FAO) metabolizmasında her döngüde bir molekül asetil koenzimA (AcCoA) ve son döngüde iki molekül AcCoA üretilirken, bunların indüklediği okzaloasetat NADPH üretimi için sitrata dönüşmektedir. FAO, ATP ve NADPH üretiminin sürdürülmesine etki ederek kök hücre metabolizmasında oksidatif stresi etkisiz hale getirmede önemli role sahiptir. Tüm bunlar ele alındığında metabolik döngüde rol alan amino asitler ve TCA ilişkili metabolizmanın kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma basamaklarında etkili olduğunu ortaya koymaktadır [33] [29]. [8], [31].

2.3.Kök Hücrelerde Farklılaşma Sürecinde Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücre içinde reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROT ve RNT)'nin düzenlenmesindeki bozukluklar sonucu hücrelerden uzaklaştırılamamıyla ortaya çıkan fizyolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır. MKH farklılaşması süresince ROT'lar, öncelikli olarak mitokondriyal kompleks I ve III ile NADPH oksidaz (NOX) ve izoformu olan NOX4 tarafından oluşturulmaktadır [34]. Hücre içinde serbest radikallerin birikimi büyük ölçüde tüm biyomoleküllere (nükleik asit, protein, lipid ve karbohidratlar) zarar vermektedir. Yüksek ROT seviyesi hücresel hasara ve işlev bozukluğuna neden olsa da, ROT'ların düşük bazal seviyesinin hücresel proliferasyon, farklılaşma ve sağkalım için gerekli olduğu düşünülmektedir [35]. Başlangıçta MKH'lerin düşük seviyede ROT ve yüksek seviyede glutatyona sahip olduğu rapor edilirken, diğer yayınlanan çalışmalarda MKH'lerin diğer farklılaşmış hücelere kıyasla, düşük antioksan aktiviteye sahip olup oksidatif strese daha hassas olduğu rapor edilmiştir [36]. MKH'lerde aşırı miktardaki ROT ve H_2O_2 muamelesinin, hücrelerin kendini yenileme, farklılaşma ve proliferasyon kapasitesini bozabileceği (Şekil 4), buna paralel olarak antioksidant muamelesinin de MKH proliferasyonunu tetiklediği vurgulanmaktadır [37].



Sekil 4: Kök hücrelerde oksidatif stres mekanizması

Osteojenik farklılaşma bakımından, pek çok çalışmayla ROT varlığının MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını inhibe ettiğini göstermiştir . İnsan MKH' lerinde *in vitro* osteogenez indüksiyonunun, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve oksidatif fosforilasyon enzimi alt ünitesi miktarı, süperoksit dismutaz-2 (SOD2) aktivitesi, katalaz oksijen tüketim oranı ve antioksidant enzimlerin miktarı ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır [34]. MKH' lerde yüksek oranda glikolitik enzim ve yüksek miktarda laktat üretimi gözlemlenmesi enerji ihtiyacı için glikolize yöneldiklerini gösterirken, MKH' lerden türevlenmiş osteoblastların ise daha çok oksidatif mitokondriyal metabolizmaya yöneldikleri ifade edilmiştir. Bu bulgular, ROT'lar ve oksidatif stresin osteojenik farklılaşmayı azaltıcı bir etkisinin olduğu iddiasını desteklemektedir.

MKH'lerin osteojenik farklılaşmanın aksine ROT' lar adipojenik farklılaşmayı arttırıcı yönde bir etki yarattığı ifade edilirken, ROT'lar mı adipojenik farklılaşmaya neden yoksa farklılaşma sonucu mu oluştuğu tam net olarak ifade edilememektedir [38]. İnsan MKH'lerinde adipojenik farklılaşma süresince SOD, katalaz ve GPx gibi antioksidant enzimlerinin yüksek oranda eksprese olduğu vurgulanmıştır [35]. İnsan ve murin MKH'lerinde ROT ve H₂O₂ muamelesinin adiposit öncüllerini ve adipogenezini indüklediği rapor edilmiştir [39]. Farklılaşma sürecinde mitokondriyal kompleks III tarafından üretilen ROT' ların, adipojenik transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu için zorunlu olduğu gösterilmiştir. Osteojenik farklılaşmaya benzer şekilde adipojenik farklılaşmada da mitokondriyal biyogenez ve oksijen tüketiminin önemli ölçüde arttığı ortaya konmuştur [40].

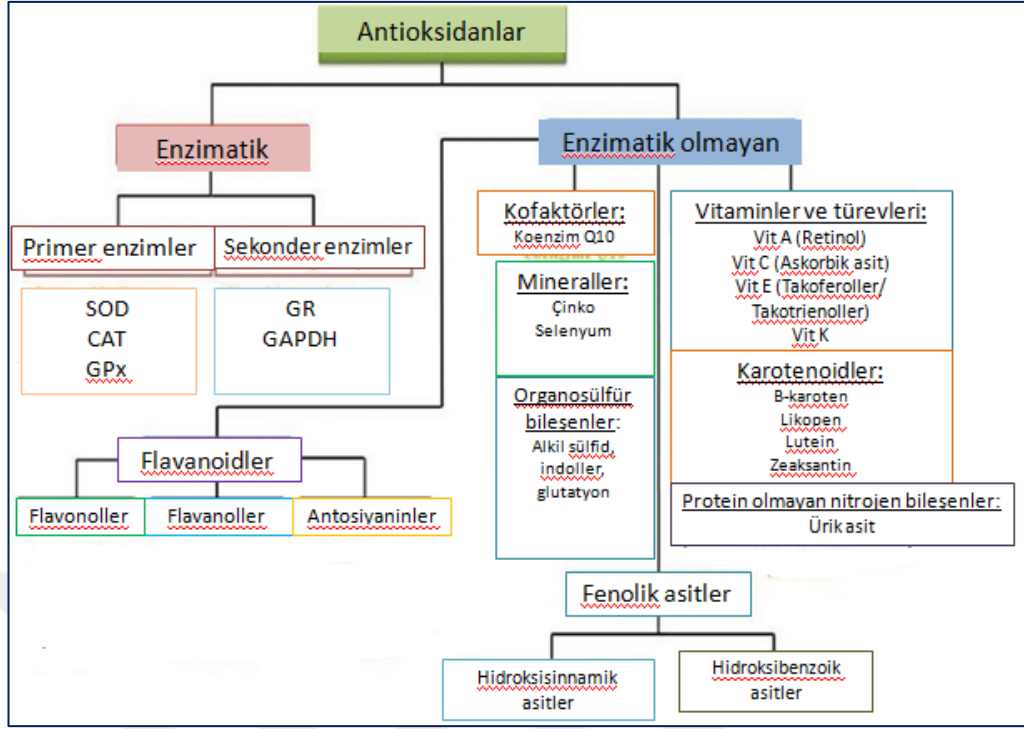
Genel olarak kondrojenik farklılaşmada da ROT miktarının arttığı ve NOX2 ve NOX4 tarafından üretilen ROT'ların, murin MKH' lerinde kondrojenik farklılaşma için gerekli olduğu ifade edilmiştir. Buna ilişkin olarak, kondrojenik farklılaşma sürecinde SOD3 seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir. Üstelik hücrelerdeki oksidatif stresi ortadan kaldırmak amacıyla kullanılan antioksidan bileşeni olan NAC'ın da kondrojenik farklılaşmayı bloke ettiği gösterilmiştir [40].

MKH' lerde oksidatif strese ilişkin bir diğer önemli bulgu, artan ROT miktarına bağlı oluşan oksidatif hasarın, MKH' lerin en önemli karakteristiğinden biri olan immünojenik düzenleme etkinliğinde azalmaya neden olması olarak ifade

edilmektedir. Yaşlı donörlerden izole edilen MKH'lerin, T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etme kapasitesinde azalmaya neden olduğu ileri sürülse de, bu konuya ilişkin yapılan bir araştırmada yaşları 13-80 aralığında değişen 53 donörden izole edilen MKH'lerin T hücrelerini baskılama kapasitesine ilişkin yaşa bağlı bir korelasyon olmadığı rapor edilmiştir [41]. Klinik alanda MKH'lerin kullanımında, immünojenik düzenleme yetenekleri önemli bir kriter olarak bilinmektedir. Buna istinaden ROT'lar ve oksidatif stresin MKH'lerin klinik kullanımını, *ex vivo* artışı ve immünojenik düzenlemelerini destekleyip desteklemediği ilerleyen araştırmalar için önemli bir kıstas olarak görülmektedir.

2.4. Antioksidan Bileşenler ve Kök Hücre Sağkalımı-Farklılaşması

Antioksidanlar hücrelerin yapı bütünlüğünü ve fizyolojik işlevlerini oksidatif strese karşı koruyan biyokimyasal bileşenlerdir. Antioksidanlar koruma görevini, serbest radikalleri nötralize ederek ve mitokondriyal membrandaki oksidatif reaksiyon zincirini sonlandırarak yerine getirmektedir [42]. Temelde enzimatik, enzimatik olmayan, endojen, ekzojen, suda çözünebilir (sitozol veya plazmada yer alan oksidanlarla etkileşime giren) ve yağda çözünebilir (hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonunu önleyen) antioksidanlar şeklinde sınıflara ayrılmaktadırlar (Şekil 5) [43]. On yılı aşkın süredir yapılan araştırmalarla, antioksidan moleküllerin hücre içi oksidatif stresi azaltarak kök hücre sağkalımını iyileştirmekle kalmayıp, aynı zamanda bu hücrelerin farklılaşma ve kendini yenileme potansiyellerini de etkilediği gösterilmiştir.



Şekil 5: Antioksidan moleküllerin sınıflandırması

Son dönemde yapılan birkaç çalışma, EKH ve MKH'lerin *ex vivo* [44], HKH'lerin ise *in vitro* artışının genomik kararsızlığa yol açabileceğini göstermiştir. Jang adlı araştırmacı ve ekibi HKH'ler ile yaptıkları seri implantasyon deneylerinde hücrelerde artan ROT seviyesinin, HKH'lerin kendini yenileyebilme yeteneğini azalttığını göstermiştir [45]. Bu yüzden oksijen konsantrasyonunun fizyolojik seviyeye çekilmesinin veya kültür ortamına optimum konsantrasyonda antioksidan ilavesinin *in vitro* kültür koşullarının indüklediği anöploidiyi azaltabileceği ve kök hücrelerde bölünme esnasında olabilecek genomik değişimleri sınırlayabileceği ortaya atılmıştır [46]. Ekzojen ve enzimatik olmayan antioksidanlar sınıfına giren NAC, AAP ve Selenyum oksidatif hasar ve antioksidan savunma mekanizması alanında en çok kullanılan ve başarılı sonuçlar alınan moleküllerdir. Bu konuda pek çok araştırmacı ve ekibi bu molekülleri, çeşitli kök hücre tiplerinde farklı konsantrasyonlarda deneyerek etkili sonuçlar elde etmiştir .

2.5. Endotelial Farklılaşma

Endotel hücreleri, dolaşım sisteminde kan bileşenleri ile etkileşime girip, damar yapısındaki düz kas hücrelerinin kasılmasını düzenleyen ve damar içini kuşatan yassı hücreler olarak tanımlanmaktadır. Bu hücrelerin en önemli işlevlerinden biri, dolaşıma katılacak olan küçük molekül ve proteinler için seçici geçirgen bir bariyer oluşturarak dolaşım homeostazisini korumaktır [47]. Wharton jölesinden ilk hücre izolasyon çalışması 1991’de rapor edilmiştir. Bu hücrelerle yapılan ilk çalışmalarla ilgili karakterizasyon makaleleri, H.S. Wang ve ekibi, Troyer ve Weiss adlı araştırmacılar tarafından 2004 ve 2008 yıllarında yayınlanmış olup, her üç germinal tabakaya (endoderm, mezoderm ve ektoderm) farklılaştıkları gösterilmiştir [1]. WJ-MKH’ nin osteojenik, kondrojenik, adipojenik, kardiyomiyojenik, anjiyojenik ve nöral hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiş, bunun için gerekli farklılaştırma ortamları ve yapılan çalışmalar bir derlemede açıklanmıştır [48]. WJ-MKH’ nin endotel hücrelerine farklılaşabildikleri, endotel hücre belirteçlerini eksprese ettikleri, matrigel yüzeyinde kapiller oluşturdıkları, yani damarlanma işlevine sahip oldukları gösterilmiştir [49]. Daha yakın tarihli bir çalışmada, WJ-MKH’ lerinden oluşturulan endotel öncü hücrelerin in vivo fare modelinde iskemiye bağlı ekstremitte hasarını azalttıkları gösterilmiştir [50]. Bu hücrelerin kardiyovasküler doku mühendisliğindeki kullanım yerleri ve potansiyelleri, yakın zamanda yayınlanan bir derlemede ayrıntılı olarak yer almıştır [51]. Bu amaçla te kapsamında göbek kordonu Wharton jölesinden izole edilen MKH’ lerin, planlanan deneyler dahilinde endotelial farklılaşma kapasiteleri değerlendirilecektir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel, *in vitro* hücre kültürü çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma literatür taraması ile Haziran 2016'da başlamış; Mayıs 2019'da tez savunmasıyla sonlanmıştır. Veri toplama aşaması Kasım 2016-Nisan 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Materyal olarak kullanılan göbek kordonu temini için Tepecik Kadın Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran 18–40 yaş arası normal miadında (37-40 haftalık) sezeryanla doğum yapan gebeler donör olarak belirlenmiştir. 20 gebeden alınan göbek kordonundan elde edilen kök hücreler araştırma evrenini oluşturmaktadır.

Donör dışlama kriterleri olarak, çoğul veya yardımcı üreme teknikleri yoluyla elde edilen gebelikler, bilinen genetik ve yapısal anomalisi olan fetüsler, annede diyabet, tiroit gibi bilinen rahatsızlıklara ek rahatsızlıkların olduğu durumlar, sürekli ilaç kullanımı, intrauterin gelişme geriliği (fetal ağırlık <2500 gr) olan gebeler çalışma dışı bırakılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada, Aralık 2016-Ocak 2019 tarihleri arasında Tepecik Kadın Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden sezeryan doğum sonrası temin edilen göbek kordonları ve bu kordonlardan izole edilen Wharton Jölesi mezenkimal kök hücreleri ile bu hücrelerden farklılaştırılmaya çalışılan endotel- öncülü hücreler kullanılmıştır.

3.5.Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken; farklılaşma ortamı uygulaması, hidrojen peroksit (H_2O_2), N-asetil-sistein (NAC), askorbik asit-2- fosfat (AAP) ve sodyum selenit (NaSe) uygulaması

Bağımlı değişkenler; hücre canlılığı, WJ-MKH ve endotel hücrelere özgü protein ve gen ekspresyonu, hücre içi total ROT üretimi, oksidatif strese özgü malondialdehit (MDA) analizi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonu

3.6.Veri Toplama Araçları

Tablo 1: Kullanılan cihazlar

Laminar Flow Hücre Kültürü Kabini	Thermo Sci, 2020
Karbondioksit İnkübatörü	Thermo Sci, Steri-Cycle i160
Ters Faz Işık Mikroskobu	Nikon Eclipse TS-100
Santrifüj	Eppendorf 5810 R
Derin Dondurucu	Thermo Forma Model 705
Plak Okuyucu	BioTek ELX 800
Sonikatör	Sonic Materials
Akış Sitometre Cihazı	BD Accuri C6
Floresan Mikroskobu	Olympus DP71
PZR Cihazı	BioRad Thermal Cycler, Qiagen Rotor Gene

Tablo 2: Kullanılan kimyasallar

DMEM/F12 Ortam	ThermoFisher Scientific (11320)
M199 Ortam	Capricorn (M199-A)
Fötal Sığır Serum	ThermoFisher Scientific (16000-36)
L-glutamin	PAN Biotech (P0480100)
Penisilin/Streptomisin	PAN Biotech (P0607100)
Akutaz (Stempro Accutase)	Cegrogen (N0100-710)

Tripsin	ThermoFisher Scientific (25300-054)
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü	Biovision (4363-10)
Epidermal Büyüme Faktörü	Biovision (7135)
İnsülin	Biochrome (K3620)
Hidrokortizon	Sigma (H0888)
Heparin	Koparin 25.000 U/5 ml
Agaroz	Sigma (A5093)
N-asetil Sistein	Sigma (A7250)
Askorbik Asit-2-Fosfat	Sigma (49752)
Sodyum Selenit	Sigma (214485)
Hidrojen Peroksit	Sigma (H1009)
WST-1	Dojindo (W201)
Karboksimetil-Dikloroflorasein diasetat	ThermoFisher Scientific (C6827)
CD90 primer antikor	Abcam (ab225)
CD44 primer antikor	Abcam (ab6124)
CD31 primer antikor	ThermoFisher Scientific (MA1-19769)
CD34 primer antikor	Abcam (ab81289)
DAPI	CST (8961S)
Anti-mouse sekonder antikor	Jackson Immuno Research (115-095-003)
Anti-rabbit sekonder antikor	Jackson Immuno Research (111-095-003)

Tablo 3: Kullanılan kitler

BCA Protein Tayini Kiti	ThermoFisher Scientific (23225)
Akış Sitometrisi Kiti	BD Biosciences (562245)
SOD Aktivite Ölçüm Kiti	Bivision (K335-100)
GPx Aktivite Kolorimetrik Ölçüm Kiti	Biovision (K762-100)
CAT Aktivite Kolorimetrik/Florometrik Aktivite Ölçüm Kiti	Biovision (K773-100)

RNA İzolasyon Kiti	Macherey Nagel (740-955.250)
Qiagen RT2 First Strand Kit	Qiagen (330404)
Qiagen RT2 SYBR Green Mastermix	Qiagen (330600)
Cell titer 96 AQueous One Solution Hücre Proliferasyon Kiti	Promega (G358)
İnsan Mezenkimal Kök Hücre İşlevsel Tanımlama Kiti	R&D Systems (SC006)

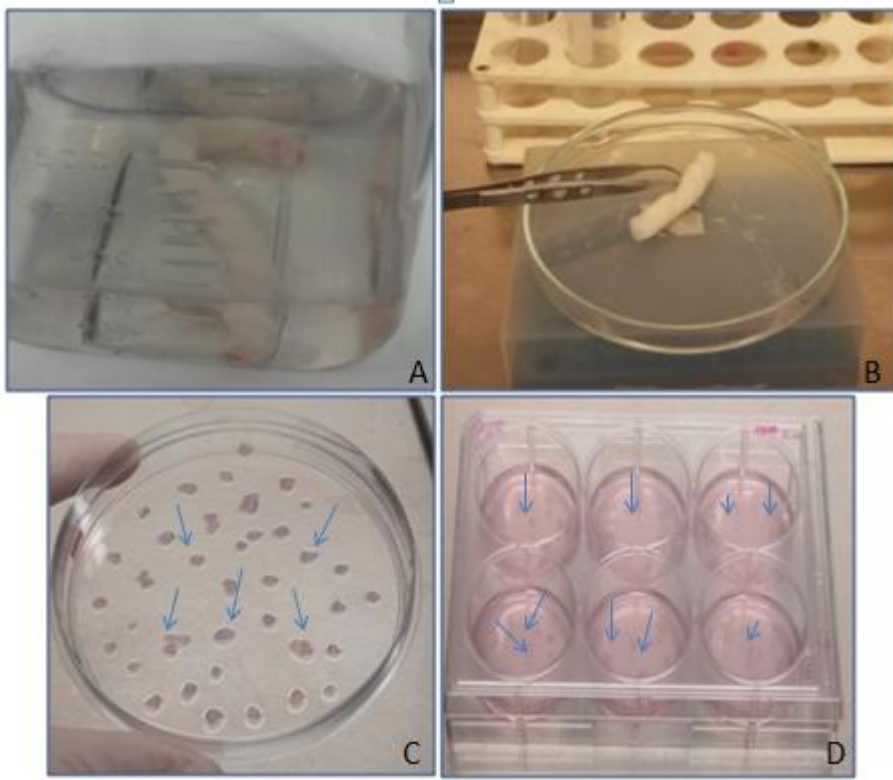
3.6.1.Göbek Kordonunun Temini

Sezeryan doğum gerçekleştikten sonra bebeğin göbek kordonu plasentadan belli bir mesafe uzaklıktan klemp ile hizalanıp kesilerek bebek çocuk doktoruna teslim edilir. Bu esnada fetal kısma yakın olacak yerden yaklaşık 10-20 cm uzunluğunda kordon kesilerek yüzeyindeki ve içindeki fazla kan temizlenir. Steril bir şekilde temizlenen kordon, içeriğinde 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin bulunan +4 derecede muhafaza edilmiş steril fosfat tamponu (PBS) içine konularak çok fazla bekletilmeden Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya AD hücre kültürü laboratuvarına transfer edilerek kök hücrelerin izolasyonuna başlanır.

3.6.2.WJ-MKH'lerin İzolasyonu

Eksplant Yöntemi: Göbek kordonu hücre kültürü laboratuvarına transfer edildikten sonra steril olarak hazırlanan hücre kültürü kabine alındı. Transfers tamponundan çıkartılan kordon steril cam petri içine alınarak steril PBS ile birkaç kez yıkanarak temizlendi. Temizlenen kordon çok fazla bekletilmeden steril bistüri yardımıyla boylamasına disekte edilerek damarlarından arındırılıp mukoz tabakayı (Wharton jölesi) içeren kısım 0,2-0,3 cm büyüklüğünde olacak şekilde küçük parçalara (eksplant) ayrıştırıldı. Eksplant haline getirilen kordon parçaları, altı kuyucuklu steril hücre kültürü kaplarının her bir kuyucuğuna yönüne dikkat edilerek yerleştirildi. Bu şekilde tüm kuyucuklara ortalama 4-5 eksplant yerleştirildikten sonra kültür kapları kuru bir şekilde kabin içinde yaklaşık 40-45 dakika kadar eksplantların

yüzeye iyice tutunmaları için bekletildi. Süre bitiminde eksplantların beslenmesi için kuyucuklara %10 serum (FBS), %1 L-glutamin ve %0,1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 ortamı eklenerek kültür kapları 37°C ayarlı %5 CO²li inkübatöre kaldırıldı (Şekil 6). Kültür kaplarının üzerine izole edilen kaçıncı kordon olduğu ve işlem tarihi yazılarak kodlama yapıldı. Eksplantlara üç günde bir ortam yenilemesi yapılarak sürekli beslenmeleri sağlandı. Eksplantlardan hücre çıkışı ortalama 9-11 gün sonra gözlemlendiği için bu döneme yaklaşıldıkça kültür kapları ters faz ışık mikroskopunda sık sık incelendi.



Şekil 6: Eksplant kültür yöntemi (A) ve (B); kordonun genel görüntüsü; Göbek kordonundan elde edilen eksplantlar petri kabında (C) ve 6 kuyucuklu kültür kaplarına (D) ekildi.

Enzimatik Yöntem: Çalışma kapsamında enzimatik yöntem ile WJ-MKH eldesi için kollajenaz ve tripsin enzimleri kullanıldı. Steril taşıma solüsyonu (%0,1 penisilin/streptomisinli PBS) içinde soğuk bir şekilde hücre kültürü laboratuvarına transfer edilen kordon steril PBS ile birkaç kez yıkanarak etrafındaki ve iç kımındaki fazla kandan arındırıldı. Kordon eksplant yönteminde olduğu gibi steril bistüri

yardımıyla boylamasına disekte edilerek damarlarından ayrıştırıldı. Geriye kalan mukoz kısım (Wharton jölesi) yaklaşık 0.5 cm³ lük parçalara ayrıldıktan sonra serumsuz DMEM/F12 ile karıştırılıp 250g de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra pellet kollagenaz enzimi ile 37°C' de 18 saat muamele edildi. İnkübasyon sonrası mukoz pellet steril PBS ile yıkandıktan sonra %2,5 tripsin ile 37°C' de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde enzimli pelletlerin üzerine %10 FBS' li DMEM/F12 büyüme ortamı eklenerek enzimin nötralizasyonu sağlandı. Ardından bu karışım tekrardan santrifüj edilerek oluşturulan süpernatant kısmı steril kültür kaplarına aktararak doku parçalarından enzimatik yöntemle ayrıştırılan hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunmaları ve çoğalmaları sağladı.

3.6.3.WJ-MKH'lerinin Kültürü

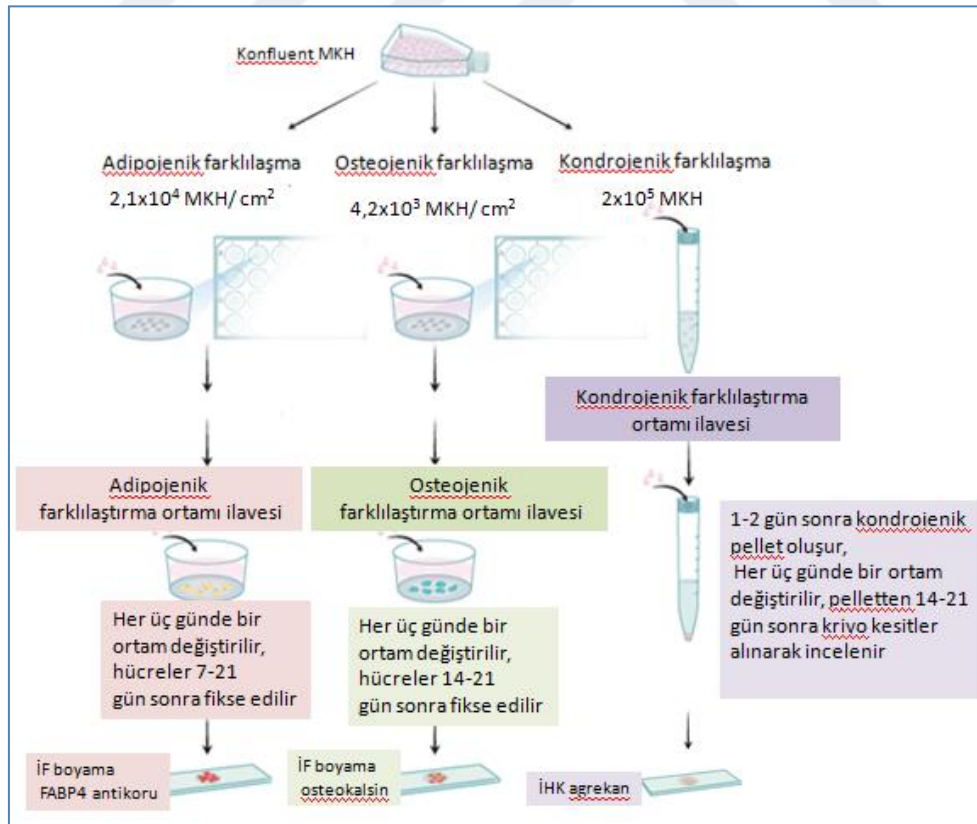
Enzimatik veya eksplant yöntemi ile izole edilen WJ-MKH'leri, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0.1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 ortamı eklenen uygun hücre kültürü kaplarında 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde idame ettirildi. Hücrelerin verimli bir şekilde beslenip çoğalabilmesi için üç günde bir ortam değişimi yapıldı. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinde konfluent hale gelip gelmediğini anlamak için ışık mikroskopunda gözlem yapıldı. Konfluent olan hücreleri pasajlamak için önce kullanılmış ortam çekilip atılarak hücreler 1 kez steril PBS ile yıkandı. Hücreleri yüzeyden nazikçe kaldırmak için Accutase enzimi kullanıldı. Enzimin hücrelere etki edebilmesi için kültür kapları 2-3 dakika kadar inkübatörde tutuldu. Süre bitimi ışık mikroskopunda tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra enzim aktivitesini durdurmak için kaplara enzim hacminin 3 katı kadar ortam eklenerek enzim nötralizasyonu sağlandı. Bu haliyle ortamdaki tüm solüsyon çekilerek steril falkon içine aktarılıp 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak dibe çöken hücre pelleti üzerine taze ortam eklenerek köpürtmeden nazikçe resüspanse edilip yeni steril hücre kaplarına homojen bir şekilde dağıtıldı. Bu aşamada eğer deney seti kurulacaksa hücreler yeni kaplara aktarılmadan önce Neuber lamında sayımı yapılarak uygun miktarda hücre ekimi yapıldı. Deney seti kurulmayıp hücreler sadece idame ettirilecekse konuldukları hücre

kültür kabının yüzey alanına göre 1:2 veya 1:3 oranında bölünerek pasajlandı. Hücrelerin çoğalma hızı ve verimine göre taze hücre dondurma ortamı hazırlanarak aynı zamanda bir miktarı dondurulup sonraki basamaklar için kullanmak üzere hücre stoğu da hazırlandı.

3.6.4.Karakterizasyon Deneyleri

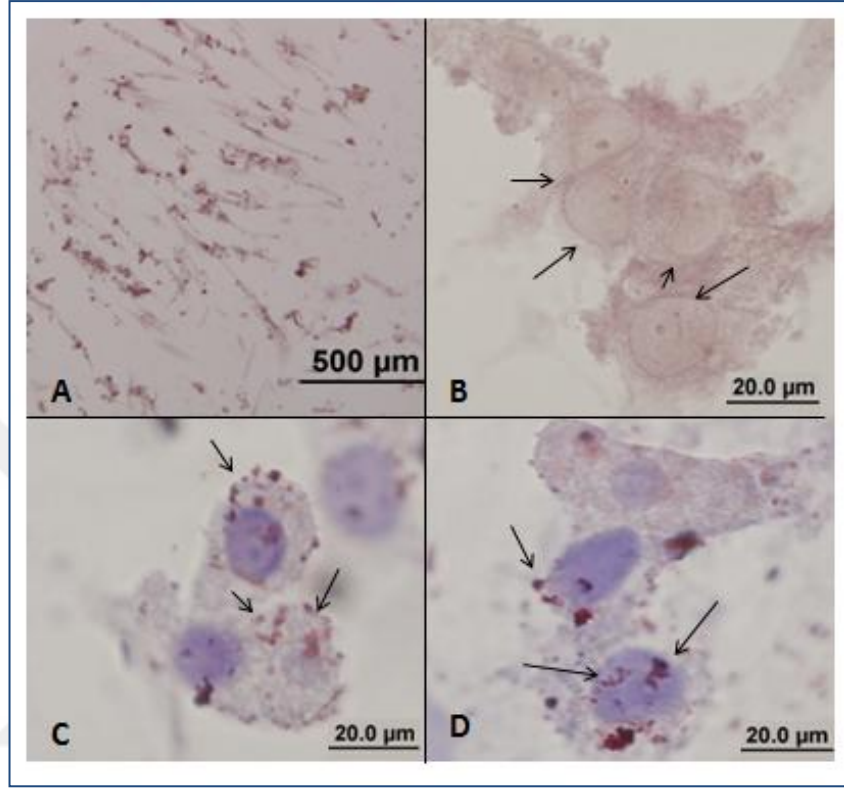
MKH'lerin Osteojenik, Adipojenik ve Kondrojenik Farklılaşması:

Araştırma kapsamında izole edilen WJ-MKH'lerinin MKH karakteristiği taşıdığını kanıtlamak adına "insan MKH fonksiyonel tanımlama kiti(R&D Systems, Cat:SC006)" kullanılarak kemik, yağ ve kıkırdak dokusuna farklılaştırma deneyleri yapıldı. Farklılaştırma için erken pasaj dönemindeki WJ-MKH'leri 12 kuyucuklu hücre kaplarına üzeri poli-D-lisin kaplanmış lameller üzerine ve 15 ml'lik falkona kit protokolünde yer alan hücre sayısına göre ekildi. Hücreler 37°C'de, %5 CO²'li inkübatörde osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma için kit protokolünde belirtilen süre ve koşullara göre idame ettirildi (Şekil 7).



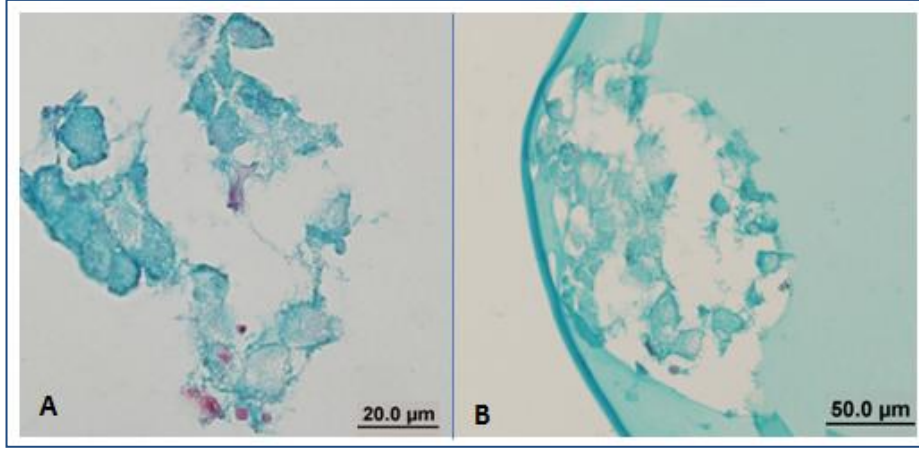
Şekil 7: insan MKH fonksiyonel tanımlama kit protokolü

Farklılaşma süresinin bitiminde osteojenik ve adipojenik farklılaşma grubu hücreleri saf metanol ile fikse edilerek histokimyasal (alizarin red ve oil red boyaması) (Şekil 8) ve immünflorasan boyama ile gösterildi.



Şekil 8: WJ-MKH'lerinin osteojenik ve adipojenik farklılaşmasına ait histokimyasal boyama görüntüleri. (A: 10X büyütme) ve (B: 100X büyütme); osteojenik farklılaşma grubu (Alizarin red boyaması), (C: 100X büyütme) ve (D: 100X büyütme); adipojenik farklılaşma grubu (Oil red boyaması)

Kondrojenik farklılaşma grubu ise süspanse kültür ortamında pellet formunda olduğu için süre bitiminde fikse edilip agara gömülerek kriyo kesitleri alınıp histokimyasal olarak alcian blue boyaması ile gösterildi (Şekil 9) .



Şekil 9: WJ-MKH'lerinin kondrojenik farklılaşmasına ait histokimyasal boyama görüntüleri. (A: 100X büyütme) ve (B: 20X büyütme); kondrojenik farklılaşma (Alcian blue boyaması)

İmmüno Floresan (İF) Boyama: Çalışmamızda WJ-MKH'lerinin kök hücre karakteristiğini doğrulamak için mezenkimal kök hücrelere özgü CD44 ve CD90 yüzey antijeni antikorları, endotelyal farklılaşmayı göstermek için ise CD31 ve CD34 yüzey antijeni antikorları kullanılarak immüno floresan işaretleme yapıldı. İF deneyi için öncelikle 12 kuyucuklu hücre kaplarına önceden steril edilmiş olan 18 mm çapındaki yuvarlak lameller yerleştirilerek %0,6 jelatin ile kaplandı. Kaplama işlemi sonrası kuyucuk başına $3-4 \times 10^3$ hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra deney farklılaştırma protokolüne uygun olarak başlatıldı. Farklılaştırma deneyi 12 gün sürdüğü için her üç günde bir hücrelerin ortamı değiştirilerek hücrelerin beslenmesi sağlandı. Deney süresi bitiminde hücrelerin fiksasyonu için -20°C 'de soğutulmuş metanolden her kuyucuğa 1'er ml eklendi ve -20°C 'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda PBS ile yıkama yapılarak lameller İF boyama protokolü için hazır hale getirildi. Lameller dikkatle temiz bir pens yardımıyla kuyucuklardan çıkartılarak zemin yüzeye alındı. Deney grubuna göre her bir lamelin üzerine 80 µl kadar %0,2'lik TritonX-100 içeren PBS eklenerek 5 dakika kadar bekletildi ve hücre membranlarının bu şekilde permeabilize olması sağlandı. Bu basamak sonrası 3 tur PBS ile yıkama yapılan lameller, üzerine 80 µl kadar %1 BSA içeren PBS'li bloklama tamponu eklenerek 30 dakika kadar bekletildi ve tekrardan 3 tur PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası hücreler (bloklama tamponuyla 1:100 dilüe edilmiş) CD90, CD44, CD31 ve

CD34 primer antikorları ile muamele edilerek 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitimi lameller tekrardan 3 tur PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası lameller, primer antikorlara uygun olarak seçilmiş sekonder antikorlarla (bloklama tamponuyla 1:100 dilüe edilmiş) 1 saat kadar karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitimi lameller tekrar 3 tur PBS ile yıkandıktan sonra 6-7 ul DAPI boyası damlatılmış temiz lamalar üzerine hücreler DAPI boyası ile yüzleşecek şekilde kapatılarak preparatlar 1 gece boyunca karanlıkta tutulup iyice kurumaları sağlandı. Bu şekilde bir süre kuruması beklenen preparatların, Olympus DP71 floresan mikroskopunda DP Manager ve DP Controller programları kullanılarak 10X, 20X ve 40X' te görüntüleri alındı.

Akış Sitometri Analizi: WJ-MKH'lerinin hücre yüzey belirteçleri açısından karakterizasyonu için akış sitometri deneylerinde BD Accuri C6 Cytometer cihazı ve bu cihazla uyumlu BD Stemflow Human MSC Analysis kiti kullanıldı. Kit protokolüne göre hücreler kültür kaplarının yüzeyinden scraper yardımıyla kaldırılarak 1300 prm'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Pellet üzerine 600 µL PBS eklenerek resüspanse edildi. Kit içeriğinde yer alan 4 farklı (CD44, CD73, CD90 ve CD105) MKH CD antijeni antikorları, izotip kontrol kokteyli ve negatif kontrol için 6 farklı tüpe her birinde 100'er µL PBS içinde 1×10^6 hücre olacak şekilde bölüştürüldü. Tüplere dağıtılan hücre süspansiyonlarına kit protokolünde belirtildiği şekilde MKH CD antijenlerine özgü olan CD44, CD73, CD90 ve CD105 antikorları veya izotip kontrol kokteyli eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol olarak herhangi bir antikor eklenmemiş hücre süspansiyonu kullanıldı. İnkübasyon sonunda ortamdaki bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için hücreler 1300 prm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantları uzaklaştırılıp, aynı hacimde PBS eklenerek resüspanse edildi. Ardından akış sitometre tüplerine aktararak (son hacim 500 µL olacak şekilde) BD Accuri C6 Cytometer cihazında negatif kontrol ve izotip kontrole göre kapılama yapılarak her bir örneğin CD antijen yüzdesi analiz edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Karakterizasyon deneyleri kapsamında, izole edilen WJ-MKH'lerinin yüzey antijenlerinin ekspresyonunu belirlemek için PZR deneyleri yapıldı. PZR için gerekli olan total RNA, MN Nucleospin II RNA izolasyon kiti ile elde edildi. Elde edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Thermo NanoDrop 2000 cihazı ile ölçüldü. cDNA sentezi için Qiagen cDNA sentez kiti kullanıldı. İzole edilen total RNA'lar, her iki (RT-PZR ve qPZR) PZR deneyinde kullanılmak üzere kit protokolüne uygun şekilde 2µg cDNA'ya çevrildi (Tablo 4 ve 5).

Tablo 4: cDNA sentezi genomik DNA eliminasyon basamağı

Bileşenler	Miktar
RNA	25 ng- 5 ug
Buffer GE	2 ul
DNAz/RNAz'sız su	Değişken
Total Hacim	10 ul

Tablo 4'de yer alan bileşenler toplam hacim 10 ul olacak şekilde karıştırıldıktan sonra tüpler 42°C'de 5 dk inkübe edilip, ardından en az 1 dk olacak şekilde buz üzerinde tutulur. Ardından tüplere Tablo 5'de yer alan bileşenler belirtilen hacimlerde ilave edilerek, tüm bileşenlerin iyice karışması sağlanır. Tüp içerisindeki 20 ul' lik karışım 42°C 'de 15 dk inkübe edilip ardından reaksiyonu sonlandırmak için 95°C 'de 5 dk inkübe edildikten sonra PZR deneyleri için hazır hale gelir.

Tablo 5: cDNA sentezi reverse transkripsiyon mix basamağı

Bileşenler	1 reaksiyon için hacim
5X Buffer BC3	4 ul
Kontrol P2	1 ul
RE 3 Reverse Transkriptaz Mix	2 ul
DNAz/RNAz'sız su	3 ul
Total Hacim	10 ul

Reverse Transkriptaz PZR (RT-PZR) ve Agaroz Jel Elektroforezi: RT-PZR deneyleri ile WJ-MKH'lerinin kök hücre karakterizasyonu için CD90, CDH2 gibi

MKH yüzey antijen ekspresyonlarının kalitatif analizi yapıldı. Bunun için bakıldı. Bu 10X PZR tamponu, 25 mM MgCl₂, 25mM dNTP karışımı, 0,2 µM reverse ve forward primer çifti (Tablo 6), DNAz/RNaz'sız su ve Taq polimeraz enzimi içeren PZR karışımı hazırlandı. cDNA içeren 0,2 ml'lik PZR tüplerine son hacim 25µl olacak şekilde PZR master mix karışımı eklendi.

Tablo 6: RT-PZR için kullanılan primer sekansları ve T_m değerleri

Gen	T _m	Forward Primer Sekansı	Reverse Primer Sekansı
GAPDH	60°C	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTGAG
CD90	59 °C	GGACTGAGATCCCAGAACCA	ACGAAGGCTCTGGTCCACTA
CDH2	62 °C	CCACGCTGAGCCCCAGTATC	CCCCCAGTCGTCAGGTAATCA

Bu aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. PZR deneyleri için BioRad thermal Cycler cihazı kullanıldı. Cihazın programlama kısmına primerlerin hedeflenen gen bölgelerine doğru bağlanabilmesi için kataloglarında belirtilen T_m sıcaklığı ve reaksiyonun tekrar sayısı gibi veriler girildikten sonra reaksiyon başlatıldı. PZR deneyi sonrası tüpler buz üzerine alınarak, agaroz jel elektroforezine geçildi. PZR'de kullanılan primer çiftlerinin baz büyüklüğüne göre agaroz jel konsantrasyonu %1-2 olacak şekilde hazırlandı. Jel elektroforezinde yürütme tamponu olarak önce 10X'lik stok TAE (Tris base, Glasial asetik asit, EDTA, distile su) tamponu hazırlanıp, 1X TAE tamponu olarak seyreltildi. %1-2'lik jel için agaroz tartıldıktan sonra 1X'lik TAE tamponu içinde çözündürülüp, etidyum bromür (EtBr) eklenerek elektroforez tankına döküldü. Jel polimerleştikten sonra tanka 1X'lik TAE tamponu dökülerek, jel kuyucuklarına yükleme boyası ile karıştırılmış cDNA örnekleri sırayla yüklendi. Jel tankı güç kaynağına bağlandıktan sonra 100-120 watt ve 1-1,5 saatlik süre ayarlaması yapıp elektroforez başlatıldı. Süre bitiminde jelin görüntüsü alındı.

Kantitatif PZR (qPZR) : Reverse Transcriptaz-PZR deneyleri ile ön sonuçlar elde edildikten sonra, gen ekspresyonlarının kantitatif analizi için qPZR deneyleri gerçekleştirildi. Bu deneyler, Qiagen Rotor Gene cihazı, Qiagen RT² SYBER Green Mastermix kiti ve 10 µM'lık reverse ve forward primer çiftleri (Tablo 7) kullanılarak yapıldı.

Tablo 7: qPZR için kullanılan primer sekansları

Gen	Tm	Forward Primer Sekansı	Reverse Primer Sekansı
GAPDH	60°C	AGAAAAACCTGCCAAATATGATGAC	TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC
HPRT1	58 °C	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
CD90	59 °C	GGACTGAGATCCCAGAACCA	ACGAAGGCTCTGGTCCACTA
CD105	60°C	AACACCATCGAGCCGGG	GAACTCGGAGACGGATGGG
CD34	62 °C	AATGAGGCCACAACAAACATCACA	CTGTCCTTCTTAACCTCCGCACAGC
CD31	59 °C	ACAGCCTTCAACAGAGCCAAC	AAGAATGACTCTGACTGTCAGTATT
SOD1	59.6°C	GGTGGGCCAAAGGATGAAGAG	CCACAAGCCAAACGACTTCC
SOD2	57.9°C	GGGGATTGATGTGTGGGAGCACG	AGACAGGACGTTATCTTGCTGGGA
CAT	59.4°C	TGGGATCTCGTTGGAAATAACAC	TCAGGACGTAGGCTCCAGAAG
GPx	60°C	TATCGAGAATGTGGCGTCCC	TCTTGGCGTTCTCCTGATGC

PZR deneyi için Tablo 8’de yer alan tüm bileşenler karıştırılıp 0,1 ml’ lik PZR tüplerine paylaştırılarak örnekler hazırlandı. Ardından cihazın programlaması (Tablo 9) yapılarak deney başlatıldı.

Tablo 8: qPZR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 ul
cDNA	1 ul
RT ² qPCR Primer Assay (10 uM stok)	1 ul
RNase free water	10,5 ul
Total hacim	25 ul

Tablo 9: qPZR için sıcaklık ve tur sayısı ayarlaması

Tur Sayısı	Süre	Sıcaklık	
1	10 dk	95°C	HotStart Taq Polimeraz Aktivasyonu
40	15 sn 30 sn	95°C 60°C	Amplifikasyon ve Florasan Data Birikimi

3.6.5.WJ-MKH'lerine Antioksidan Molekül ve H2O2 Uygulaması

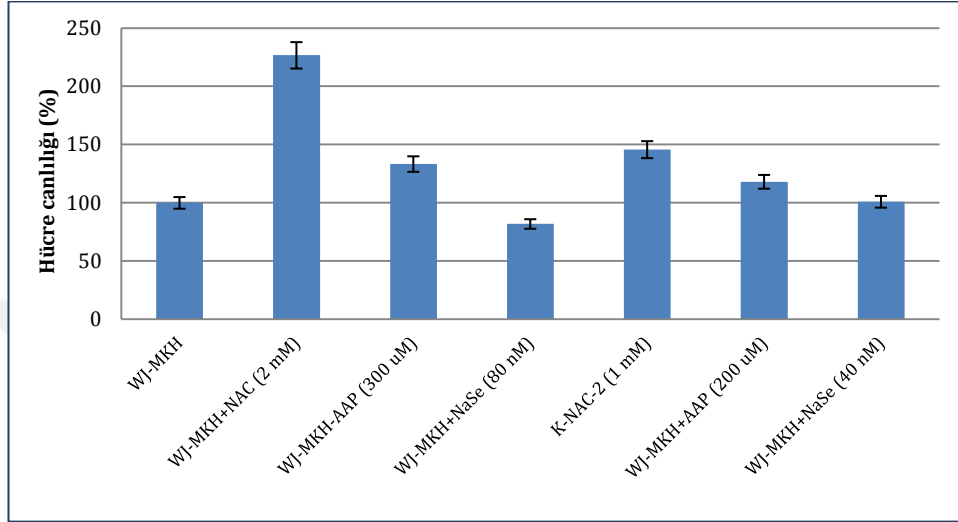
N-Asetil Sistein (NAC) Uygulaması: Erken pasaj dönemindeki WJ-MKH'lerine kültür ortamında 7 gün süreyle değişik konsantrasyonlarda NAC uygulaması yapıldı. Ön deney olarak WJ-MKH' lerinin canlılığı üzerine en etkin NAC konsantrasyonunu ayarlamak için 0,50-3 mM arası 4 farklı konsantrasyon (0,50; 1; 2; 3 mM) çalışıldı. 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 2×10^3 hücre ekilerek, üç günde bir ortamları yenilenmek üzere belirlenen 4 farklı konsantrasyonda NAC ilave edilmiş taze ortam (%10 FBS'li DMEM/F12) ile idame edildi. Deney süresi tamamlandıktan sonra, NAC' ın hücre canlılığı üzerine etkisini analiz etmek için WST-1 hücre canlılık testi yapılarak spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Konsantrasyon grupları kendi içinde en az beş tekrarlı çalışıldı.

Askorbik asit-2-Fosfat (AAP) Uygulaması: Erken pasaj dönemindeki WJ-MKH'lerine kültür ortamında 7 gün süreyle değişik konsantrasyonlarda AAP uygulaması yapıldı. WJ-MKH' lerinin canlılığı üzerine en etkin AAP konsantrasyonunu ayarlamak için 100-300 μ M arası 3 farklı konsantrasyon (100; 200; 300 μ M) denendi. 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 2×10^3 hücre ekilerek, üç günde bir ortamları yenilenmek üzere belirlenen 3 farklı konsantrasyonda AAP ilave edilmiş taze ortam (%10 FBS' li DMEM/F12) ile idame edildi. Deney süresi tamamlandıktan sonra, AAP' nin hücre canlılığı üzerine etkisini analiz etmek için WST-1 hücre canlılık testi yapılarak spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Konsantrasyon grupları kendi içinde en az beş tekrarlı çalışıldı.

Sodyum Selenit (NaSe) Uygulaması: Erken pasaj dönemindeki WJ-MKH'lerine kültür ortamında değişik konsantrasyonlarda NaSe uygulaması yapıldı. WJ-MKH' lerinin canlılığı üzerine en etkin NaSe konsantrasyonunu ayarlamak için 40 ve 80 nM olmak üzere iki farklı NaSe konsantrasyonu belirlenerek uygulama yapıldı. Bunun için 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 2×10^3 hücre ekilerek üç günde bir ortamları yenilenmek üzere hücreler belirlenen 2 farklı konsantrasyonda NaSe içeren taze ortam (%10 FBS' li DMEM/F12) ile idame edildi. Deney süresi tamamlandıktan sonra, NaSe'in hücre canlılığı üzerine etkisini analiz etmek için WST-

1 canlılık testi spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Konsantrasyon grupları kendi içinde en az beş tekrarlı çalışıldı.

Sonuç olarak elde edilen ön çalışma verilerine göre (Şekil 10) deneyler NAC (2mM), AAP (300uM), NaSe (40nM) konsantrasyonları ile tamamlandı.



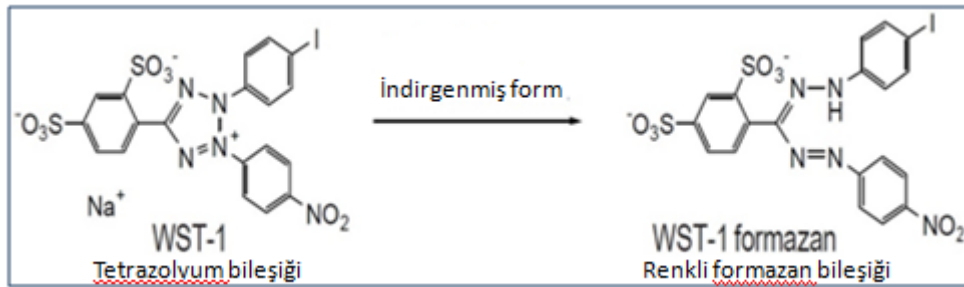
Şekil 10: NAC, AAP ve NaSe'nin konsantrasyonunu belirlemek üzere yapılan hücre canlılığı ön çalışma verileri Sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu x100) formülü ile canlılık (%) olarak hesaplanmıştır.(* Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek , $p < 0,05$, sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=3$).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) Uygulaması: Antioksidan moleküllere ek olarak WJ-MKH'lerinde oksidatif stres yaratmak için ajan olarak H_2O_2 kullanıldı. Çeşitli literatür taramalarından yola çıkılarak planlanan ön deneylerde 50-300 μM arası H_2O_2 konsantrasyonunun uygun aralık olmasına karar verildi. Buna paralel olarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 2×10^3 hücre ekilerek, gruplara göre sırasıyla 50, 100, 200 ve 300 μM H_2O_2 uygulaması yapıldı. En uygun konsantrasyon aralığını belirlemek için ise WST-1 canlılık testleri yapıldı. 200 μM üzerindeki konsantrasyonların hücre canlılığını %70'in üzerinde azaltması nedeniyle tez çalışması kapsamında hem kontrol (WJ-MKH), hem de endotelial farklılaşma (EF) grubuna 200 μM H_2O_2 ile ön muamele yapıp 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra deneyler gerçekleştirildi. Belirlenen H_2O_2 konsantrasyonlarının ve uygulama süresinin hücrelerde (kontrol ve farklılaşma grubunda) ne düzeyde bir oksidatif stres yarattığını

anlamak için hücrelerdeki total ROT miktarı ölçüldü. En uygun konsantrasyon aralığını belirlemek için ise WST-1 canlılık testleri yapıldı.

3.6.6. Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testleri

Tez çalışması kapsamında belirlenen antioksidan moleküller (NAC, AA ve NaSe) ve oksidatif stres ajanı olan H₂O₂'nin WJ-MKH' leri ve endotele farklılaşma sürecindeki hücreler üzerindeki etkisini analiz etmek için WST-1 canlılık testleri (**Dojindo, Cat:W201,Japan**) kiti kullanılarak, üreticinin önerileri doğrultusunda yapıldı. Bu testler için 96 kuyulu hücre kültürü kaplarına kuyu başına 2×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılarak deney başlatıldı. Deney süresi bitiminde kuyucuk başına 100 µl DMEM/F12 ortamına 10 µl WST-1 probu eklenecek şekilde oran hesabı yapılarak deney planlandı. Kuyucuklara WST-1 probu eklendikten sonra kültür kabı ışık görmeyecek şekilde 37°C'de inkübe edildi. Probun çalışma prensibi kolorimetrik absorbans ölçümüne dayalı olup, inkübasyonun birinci saatinden sonra her saat başı (ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde) 460 nm dalga boyunda plak okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı. Sonuçlar kontrol grubuna %100 denilerek, %canlılık olarak hesaplandı.

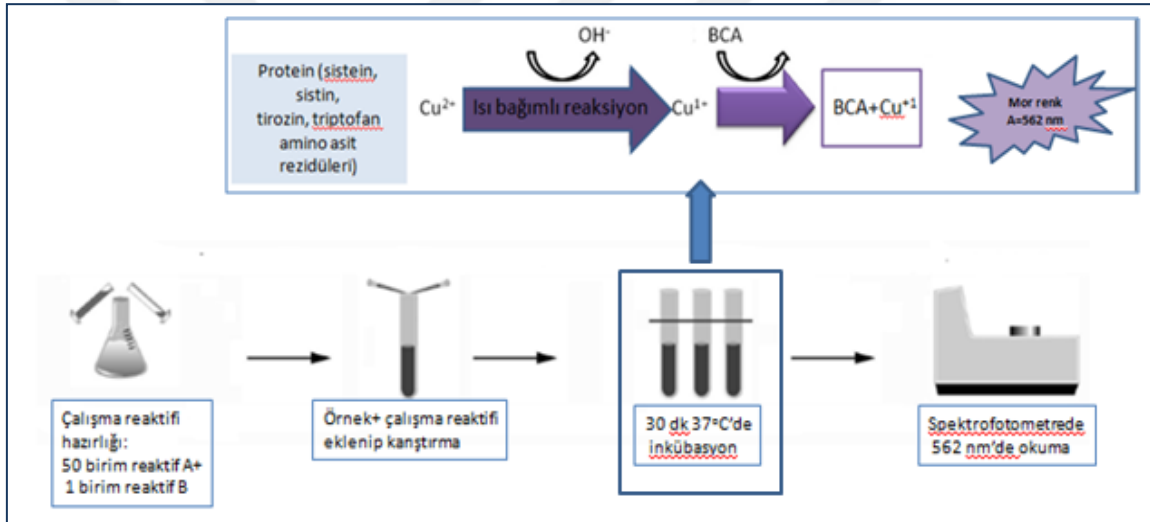


Şekil 11: WST-1 kit probunun dönüşümü

Kitin içeriğinde bulunan MTS tetrazolyum bileşiği (Owen'ın reaktifi) hücreler tarafından hücre kültürü ortamında çözünür olan renkli bir formazan ürününe indirgenir (Şekil 11). Bu dönüşüm, metabolik olarak aktif hücrelerde dehidrojenaz enzimleri tarafından üretilen NADPH veya NADH ile gerçekleştirilir.

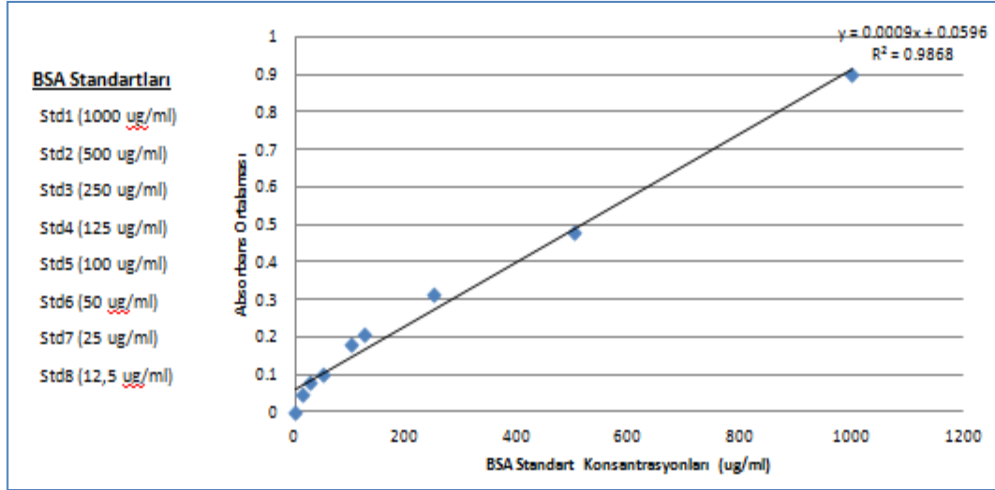
3.6.7. BCA Protein Tayini

Çalışma kapsamında yapılan enzim aktivite, MDA ve total ROT düzey ölçüm sonuçlarının normalize edilebilmesi için kullanılan hücre lizatlarının BCA yöntemi ile protein miktarı ölçüldü. Bu sayede yapılan analizlerin sonuçları “mg/ml protein” şeklinde verildi. Kitin çalışma prensibi; alkalik ortamda bulunan proteinlerin Cu^{+2} iyonunu indirgemesi (biüret reaksiyonu) sonucu oluşan kuproz bakır iyonunun (Cu^{+1}), BCA (biçinkoninik asit) reaktifi ile şelatlanmasıyla suda çözünebilen mor renkli bileşenin oluşması ve 562 nm’de absorbansının ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 12). Bu şekilde ortamdaki renk değişimi yoğunluğuna bağlı olarak protein miktarı (20-2000 ug/ml) ölçülmüş olur.



Şekil 12: BCA protein tayini için örnek hazırlığı, BCA reaktifi ve Cu^{+1} ile reaksiyonu

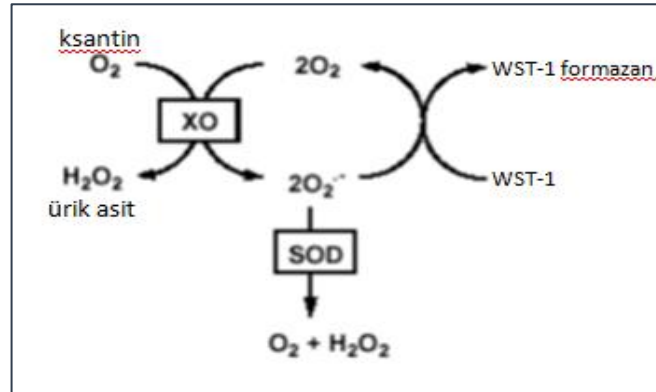
BCA protein tayinine göre protein konsantrasyonu genellikle BSA gibi konsantrasyonu bilinen bir protein standardı referans alınarak belirlenir. Referans olarak kullanılacak BSA protein standartları seri dilüsyonlar halinde hazırlanır. BCA ile inkübasyonu sonrası absorbans ölçümüne göre bir standart eğri grafiği oluşturulur (Şekil 13). Grafikte yer alan eğim formülünde, miktar tayini yapılacak protein örneklerinin absorbansları yerine konularak hesaplamaları yapılır ve “mg/ml protein” şeklinde elde edilir.



Şekil 13: BSA standart eğri grafiği

3.6.8. Antioksidan Enzim Aktivite Ölçümü

SOD Aktivite Ölçümü : SOD, süperoksit anyonunun (O_2^-) H_2O_2 ve O_2 'ye dismutasyonunu katalizleyen en önemli antioksidan enzimlerden biridir. Hücrelerde açığa çıkan bu zararlı O_2^- , ksantin oksidaz (XO) enziminin ksantin ve O_2 varlığında katalizlediği bir reaksiyondur. SOD ise bu oksidasyon reaksiyonunu indirgeyerek oluşan serbest radikali daha az zararlı H_2O_2 ve O_2 'ye çevirmektedir. Bu enzimin aktivite ölçümü için BioVision SOD Activity Assay (Kat:K335-100) kiti kullanıldı. Kitin çalışma prensibi; hücrelerin sahip olduğu SOD enzimi yardımıyla O_2^- 'nin O_2 'ye indirgenmesi sırasında kit içeriğindeki WST-1 bileşeninin de suda çözünebilen formazan yapısına dönüşmesi ve oluşan bu formazan boyasının yoğunluğunun 450 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 14). Bu sayede SOD'un inhibisyon aktivitesi kolorimetrik olarak ölçülmektedir.



Şekil 14: SOD ölçüm prensibinin şematize gösterimi

Aktivite ölçümü için kitin protokolüne göre WST çalışma solüsyonu, enzim çalışma solüsyonu hazırlandı. Enzim aktivite ölçümü yapılacak olan hücre lizatını hazırlamak için ise, öncelikle lizis tamponu (0,1 M Tris-HCl pH: 7,4, %0,5' lik TritonX-100, 5mM β -ME ve 0,1 mg/ml PMSF içeren) hazırlandı. Hücreler 1-2 ml PBS ile scraper yardımıyla kültür kabından kaldırılarak 15 ml'lik falkona aktarılarak 5 dakika 1300 rpm' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine soğuk olarak bekletilen lizis tampon eklenerek hücreler 30 saniye kadar buz üzerinde sonike edildi. Sonikasyon sonrası hücre lizatı, 14.000 g' de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar aktivite ölçümü için kullanılmak üzere buz üzerinde bekletildi. Aynı gün içinde ölçüm yapılamayacaksa -80°C'ye kaldırıldı. Tüm solüsyonlar hazırlandıktan sonra ölçüm protokolüne göre örnek ve enzim çalışma solüsyonu 20 μ l, WST çalışma solüsyonu 200 μ l olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kaplarına sırasıyla eklendi. Potokol şemasına göre tüm solüsyonlar kuyucuklara eklendikten sonra kültür kabı 37°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Absorbans sonuçları elde edildikten sonra, kitte yer alan formüle göre SOD aktivitesi %inhibisyon olarak hesaplandı (Şekil 15).

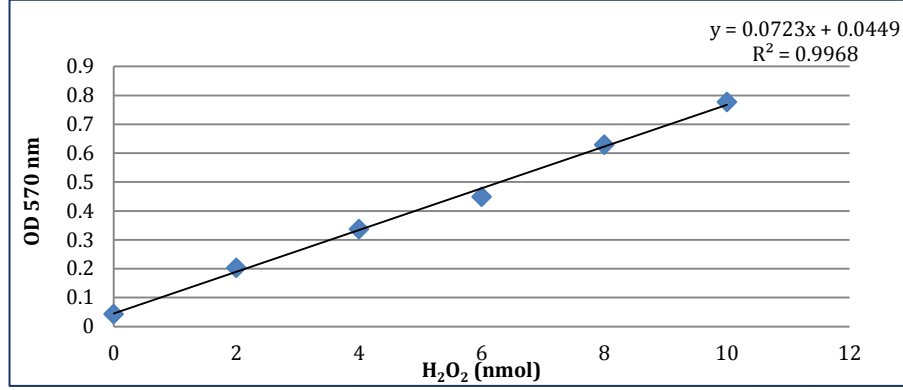
$$\text{SOD Aktivitesi (inhibisyon oranı \%)} = \frac{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3}) - (\text{Asample} - \text{Ablank2})}{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3})} \times 100$$

Şekil 15: SOD aktivite hesaplaması

Katalaz Aktivite Ölçümü : Katalaz (KAT), hemen hemen tüm organizmalarda yaygın olarak bulunan bir antioksidan enzimdir. Hücrelerdeki görevi, zararlı bir bileşen olan H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye çevirmektedir. Bu enzimin aktivite ölçümü BioVision CAT Activity Colorimetric/Fluorometric Assay (Kat:K773-100) kiti kullanılarak yapıldı. Kitin çalışma prensibi; KAT ile hücre içinde dönüştürülemeden kalan H_2O_2 'nin kit bileşeni olan OxiRed probu ile reaksiyona girerek 570 nm'de absorbans veren renkli bir bileşene dönüşmesi ve bu bileşenin kolorimetrik ölçümüne dayanmaktadır.

Aktivite ölçümü için kitin protokolüne göre OxiRed probu, HRP ve pozitif kontrol solüsyonları hazırlandı. Enzim aktivite ölçümü yapılacak olan hücre lizatını hazırlamak için öncelikle 1×10^6 hücre 1-2 ml PBS ile scraper yardımıyla kültür kabından kaldırılarak 15 ml'lik falkona aktararak 5 dakika 1300 rpm' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine soğuk olarak bekletilen 0,2 ml assay tamponu eklenerek 30 saniye kadar buz üzerinde sonike edildi. Sonikasyon sonrası hücre lizatı, 10.000 g' de 15 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar aktivite ölçümü için kullanılmak üzere buz üzerinde bekletildi. Aynı gün içinde ölçüm yapılamayacaksa -80°C 'ye kaldırıldı. Tüm solüsyonlar hazırlandıktan sonra ölçüm protokolüne göre hücre lizatı (2-78 μl) ve kontrol solüsyonu (1-5 μl) son hacim 78 μl olacak şekilde, 96 kuyucuklu hücre kaplarına sırasıyla eklendi. Aktivite ölçümünde iç kontrol olması amacıyla hücre lizatları aynı hacimde diğer kuyucuklara eklenip (son hacim 78 μl olacak şekilde) üzerlerine 10 μl stop solüsyonu ilave edilerek KAT aktivitesi durduruldu. H_2O_2 standart eğrisinin hazırlanması için ise, kit içeriğindeki 0,88 M'lık H_2O_2 , distile su ile önce 20 mM'lık ara stok, sonrasında da 1 mM'lık son konsantrasyona getirilerek kuyucuklara sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl olacak şekilde eklendi. Üzerlerine son hacim 90 μl olacak şekilde assay tamponu ve sonrasında üzerlerine 10 μl stop solüsyonu ilave edilerek her bir kuyucukta son konsantrasyon 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/kuyucuk olacak şekilde standartlar oluşturuldu. KAT reaksiyonu için, hücre lizatı, pozitif kontrol ve iç kontrol kuyucuklarına 12'şer μl 1 mM H_2O_2 eklenip kültür kabı 25°C 'de 30 dakika inkübasyona bırakılarak reaksiyon başlatıldı. Süre bitiminde üzerlerine 10 μl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Renk değişimini sağlayacak prob karışımı için ise, kuyucuk başına 50 μl olacak şekilde karışım (46 μl assay tamponu, 2 μl OxiRed ve 2 μl HRP) solüsyonu eklenerek, kültür kabı 25°C 'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre bitimi 560 nm' de absorbands ölçümü yapıldı. Absorbans sonuçları elde edildikten sonra H_2O_2 standart eğrisinin hazırlanması için kitte yer alan formüle göre ΔA hesaplandı (Şekil 16). KAT aktivitesi 30 dakikada örnek hacmi başına nmol olarak dönüştürülen H_2O_2 'nin dilüsyon faktörüyle çarpılması sonucu nmol/dk/ml (mU/ml) olarak hesaplandı.

1 Ünite KAT: pH:4,5 25°C'de dakika başına 1 µmol H₂O₂'yi H₂O ve O₂'ye dönüştüren katalaz miktarı olarak tanımlanmaktadır.



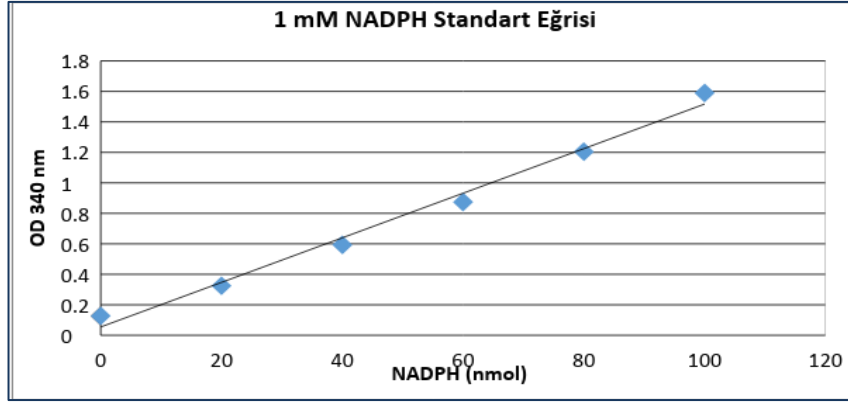
Şekil 16: Örnek bir H₂O₂ standart eğrisi

GPx Aktivite Ölçümü :GPx antioksidan enzim ailesinin bir diğer önemli üyesi olup, organizmaların oksidatif hasara karşı korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. GPx, indirgenmiş glutasyonu (GSH), oksidize glutatyona (GSSG) dönüştürürken, lipid hidroperoksitlere karşılık gelen alkoller veya serbest H₂O₂'ler de H₂O'ya dönüştürülür. Hücresel yerleşim bölgelerine göre farklı substrat spesifitesine sahip olan birkaç GPx izozimi bulunmaktadır. Bu enzimin aktivite ölçümü BioVision GPx Activity Colorimetric Assay (Kat:K762-100) kiti kullanılarak yapıldı. Kitin çalışma prensibi; hücre içi GSH GSSG'ye oksidize olurken, GPx kit bileşeni olan kümen hidroperoksiti indirgemektedir. Oksidize olan GSSG, glutasyon redüktaz (GR) tarafından NADPH tüketimi GSH'a indirgenir. NADPH'ın azalması (340 nm'de kolayca ölçülebilmektedir), GPx aktivitesi ile orantılıdır. Dolayısıyla 340 nm' de absorbans veren kolorimetrik ölçümle ortamda tüketilen NADPH miktarı baz alınarak GPx aktivitesi hesaplanmaktadır.

Aktivite ölçümü için kitin protokolüne göre NADPH, GSH, GRx pozitif kontrol solüsyonları hazırlandı, GR ve kümen hidroperoksid solüsyonları ise dilüe edildi. Enzim aktivite ölçümü yapılacak olan hücre lizatını hazırlamak için öncelikle 1x10⁶ hücre 1-2 ml PBS ile scraper yardımıyla kültür kabından kaldırılarak 15 ml'lik falkona aktararak 5 dakika 1300 rpm' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak

pellet üzerine soğuk olarak bekletilen 0,2 ml assay tamponu eklenerek 30 saniye kadar buz üzerinde sonike edildi. Sonikasyon sonrası hücre lizati, 10.000 g' de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Aynı gün içinde ölçüm yapılamayacaksa -80°C'ye kaldırıldı. 96 kuyucuklu hücre kültür kabının kuyucuklarına 2-50 µl hacminde hücre lizati eklenerek son hacim assay tamponuyla 50 µl'ye tamamlandı. NADPH standart eğrisi için, 40 mM'lık NADPH ana stok solüsyonu distile su ile 1 mM'lık son konsantrasyona getirilerek kuyucuklara sırasıyla 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µl olacak şekilde eklendi. Üzerlerine son hacim 100 µl olacak şekilde assay tamponu ilave edilerek her bir kuyucukta son konsantrasyon 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/kuyucuk olacak şekilde standartlar oluşturuldu. Kuyucuklardaki bu standartların 340 nm'de absorbansı ölçülerek bir NADPH standart eğrisi oluşturuldu (Şekil 17). Opsiyonel olarak 5-10 µl pozitif kontrol bileşeni bir kuyucuğa yüklenerek son hacim assay tamponuyla 50 µl'ye tamamlandı. Diğer bir kuyucuğa ise sadece 50 µl assay tamponu eklenerek reaktif körü (reagent blank) oluşturuldu. Reaksiyon karışımı için ise, kuyucuk başına 40 µl olacak şekilde karışım (33 µl assay tamponu, 3 µl 40mM NADPH solüsyonu, 2 µl GR solüsyonu ve 2 µl GSH solüsyonu) solüsyonu eklenerek, kültür kabı 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre bitimi her kuyucuğa 10 µl kümen hidroperoksit eklenerek GPx reaksiyonu başlatıldı. Kültür kabı çalkalayıcıda iyice çalkalandıktan sonra kitin ölçüm protokolüne göre 340 nm' de birinci (T1) absorbans ölçümü (A1) yapıldı. Ölçüm sonrası kültür kabı 25°C'de 5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra ikinci (T2) absorbans ölçümü (A2) yapıldı. Absorbans sonuçları elde edildikten sonra NADPH standart eğrisinin hazırlanması için kitte yer alan formüle göre ΔA hesaplandı. GPx aktivitesi (T2-T1) zaman aralığında örnek hacmi başına nmol olarak azalan NADPH miktarının dilüsyon faktörüyle çarpılması sonucu nmol/dk/ml (mU/ml) olarak hesaplandı.

1 Ünite GPx: 25°C'de kitin çalışma koşulları altında dakika başına 1 µmol NADPH'ı, NADP⁺'ye dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 17: Örnek bir NADPH standart eğrisi

3.6.9.WJ-MKH'lerinin Endotelial Hücre Farklılaşması ve Progenitör Endotelial Hücre Eldesi

Endotelial hücreye farklılaştırma deneyleri için erken pasaj dönemindeki WJ-MKH'leri kullanılarak, steril olarak hazırlanmış %0,6'lık jelatin kaplı kültür kaplarına hücre ekimi yapıldı. Deney süresinin optimizasyonu için farklı inkübasyon süreleri (7-12 gün) denendi. WJ-MKH'lerinde endotel hücrelerine farklılaşmasının indüklenmesi amacıyla literatürlerde yer alan endotelial farklılaştırma ortamı hazırlandı. Ortamın içeriği ilk olarak,%10 FBS, L-glutamin ve penislin/streptomisinli DMEM/F12 içine; 10 µl hidrokortizon/ 10 ml, 2 µl VEGF/ 10 ml, 1 µl EGF/ 10 ml ve 1 µl insülin/ 10 ml olacak şekilde hazırlandı. İlerleyen deney setlerinde farklılaştırma için, serumun kendi içeriğindeki doğal büyüme faktörlerinin kendi eklediğimiz farklılaştırmayı indükleyici büyüme faktörleriyle girişim yapmaması adına FBS oranı %10'dan %2'ye düşürülerek, L-glutamin ve penislin/streptomisinli DMEM/F12 (içeriği 10 µl insülin/10 ml, 2 µl VEGF/10 ml ve 1 µl EGF/10 ml) kullanıldı. Çalışma kapsamında ilerleyen dönemlerde ise farklılaşma veriminin güçlendirilmesi için endotelial hücrelerin fizyolojik ihtiyaçlarına uyumlu olması amacıyla M199 ortamı kullanıldı. M199 ortamına, DMEM/F12 ortamındaki gibi aynı konsantrasyonda büyüme faktörleri ve %2 FBS eklendi. İlerleyen aylarda farklılaştırma deneylerine devam edilirken VEGF ve EGF miktarları sırasıyla; 10 µl/10ml ve 5 µl/10ml olarak değiştirilip, ek olarak 10 µl/10ml heparin de ortama ilave edildi. 10 günlük uygulamadan sonra **"progenitör endotelial hücreler"** elde edildi.

3.6.10.Endotelyal Farklılaşma Sürecinde Total ROT Ölçümü

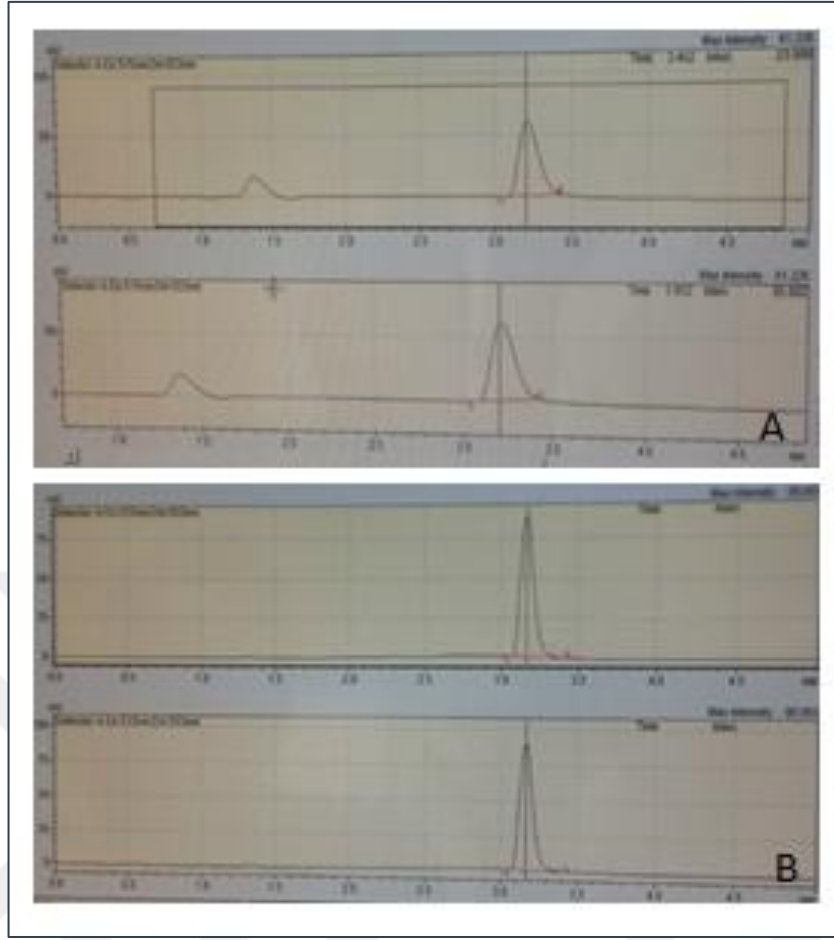
WJ-MKH'lerinin endotelyal hücrelere farklılaşma sürecinde oksidatif stres ajanı olarak ortama eklenen H_2O_2 'nin hücrelerde oluşturduğu oksidatif strese bağlı total ROT miktarını belirlemek amacıyla *in vitro* çalışmalarda en sık kullanılan prob olan diklorofloresein diasetat (DCF-DA) kullanıldı. Bu prob ışığa ve havada bulunan oksijene çok duyarlı olup çabuk bozulabilen bir molekül olduğu için çevresel koşullardan en az oranda etkilenmesi adına daha kararlı bir formu olan CM- H_2 DCFDA probu kullanıldı. Tez kapsamında kullanılan NAC, AAP, NaSe ve H_2O_2 'nin hücreleri ne yönde etkilediğini anlamak için 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 2×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra belirlenen konsantrasyonlarda sırasıyla 200 μM H_2O_2 eklenip hücreler 2 saat kadar inkübe edildikten sonra sırasıyla gruplara 2 mM NAC, 300 μM AAP, 40 nM NaSe ayrı ayrı eklenerek protokole uygun bir şekilde 12 günlük farklılaştırma deneyine başlandı. Bu esnada kontrol grubu ve farklılaşma grubu için sırasıyla %2 FBS içeren DMEM/F12 ve M199 (içeriğinde farklılaştırma protokolüne göre eklenmiş büyüme faktörlerini içeren) ortamları kullanıldı. Ortamlar her üç günde bir değiştirilerek hücrelerin beslenmesi sağlandı. Deney süresi bitiminde CM- H_2 DCFDA probu kataloğunda yazan protokole uygun olarak önce 1 ml DMSO ile çözündürülerek 90 μM 'lık bir ana stok hazırlandı. Ardından probun çalışma konsantrasyon aralığı kataloğunda 1-10 μM olarak belirtildiği için önceden ısıtılmış steril PBS ile 10 μM 'lık prob hazırlandıktan sonra çok bekletilmeden ışık görmeyecek şekilde içindeki tüm ortamı uzaklaştırılmış kuyucuklara 100'er μl eklenerek 37°C'de 1 saat kadar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitimi prob kuyucuklardan çekilerek uzaklaştırılıp, yerine taze DMEM/F12 ve M199 ortamları eklenerek hücrelerin içeriğindeki esteraz enzimlerinin işlevsel olarak kendini toparlayabilmesi için 30 dakika kadar daha 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde 96 kuyucuklu kültür kabı plak okuyucuda dalga boyu Ex/Em; 495/527 nm olacak şekilde florometrik ölçüm gerçekleştirildi.

3.6.11.WJ-MKH'lerinde ve Endotelyal Hücrelerinde MDA Analizi

Fizyolojik olarak sağlıklı hücrelerde metabolik anlamda yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri denge halindedir. Hücresel solunum ve metabolizma sonucu

oluşan ROT'lar hücrelerin doğal savunma sistemini oluşturan antioksidan enzimler ve moleküller aracılığıyla hücrelerden uzaklaştırılırlar. Antioksidan savunma sisteminin yokluğunda ROT'lar hücrelerin yapısal bileşenleriyle reaksiyona girmeye başlarlar. ROT'ların özellikle hücre mebranındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girmesi lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına yol açmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitleriyle gerçekleşen reaksiyon sonucu hücrelerde malondialdehit (MDA) ve/veya 4-hidroksinoneal oluşmaktadır. Bu ikinci lipid peroksidasyon ürünlerinin DNA'nın yapısındaki nükleik asitlerle (adenin veya guanin) reaksiyona girmeleri, hatalı transkriptlerin oluşmasına yol açarken, proteinlerle reaksiyona girmeleri ise, yapısal değişimlere veya işlev kaybına yol açmaktadır.

Tez çalışması kapsamında hücrelere H₂O₂ muamelesi sonrası oluşan lipid peroksidasyonuna bağlı MDA'nın analizi için Immuchrom GmbH MDA Assay kit kullanıldı. Bu kit protokolüne göre hazırlanan hücre lizatı örnekleri HPLC analizine uygun olup, MDA'nın kolay, hızlı ve hassas bir şekilde ölçülmesi sağlandı. Kitin çalışma prensibi; hücrelerde oluşan MDA'yı ölçebilmek için kit içeriğindeki DERIVAT solüsyonu ile 95°C'de 1 saat türevlendirme (hücre lizatı, kalibratör, kontrol ve/veya kör) yapıldı. Bu sayede proteinlerin bağlanabileceği hale gelen MDA hidroliz edilerek floresans prob haline dönüştürüldü. Sonrasında türevlendirilen bu MDA içeriği (floresans prob) soğutulup (2-8°C'ye) 10.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantın bir kısmı kit içeriğindeki REAL solüsyonu ile ayrı bir tüpte karıştırılıp moleküler analizi için HPLC sistemine enjekte edildi. HPLC analizinde ters faz kolonu kullanılarak, 30°C'de izokratik ayrıştırma tekniğine göre ayırım yapıldı. HPLC sistemindeki floresans dedektör yardımıyla her bir örnek için 4'er dakikalık analiz sonucu kromatogramlar oluşturuldu (Şekil 18). Floresan okuma için dedektör uygun dalga boyuna (Ex/Em: 515/553 nm) ayarlandı. Kantifikasyon kit içeriğindeki kalibratör aracılığıyla gerçekleştirilirken, MDA konsantrasyonu (µmol/L) kromatogram piklerinin yüksekliğinin entegrasyonu kullanılarak hesaplandı.



Şekil 18: MDA analizi sonrası kromatogram görüntüleri (A); MDA kalibratör kromatogramı, (B); WJ-MKH lizati kromatogramı

3.7.Araştırma Planı ve Takvimi

	Haziran- Eylül2016	Ekim -Aralık 2016	Aralık 2016- Şubat 2017	Mart- Mayıs 2017	Haziran- Ağustos 2018	Eylül-Kasım 2018	Aralık2018- Ocak 2019	Şubat-Mart 2019	Mart-Nisan 2019
Literatür Taraması									
Etik Kurul, Tez Önerisi ve BAP Proje Formunun Hazırlanması									
Kök Hücre İzolasyonu									
Kök Hücre Karakterizasyonu									
Endotelyal Farklılaşma ve Karakterizasyon									
Metabolit Analizleri									
Sonuçların Analizi									
Tez Yazımı									

3.8.Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçlarının analizleri SPSS 24.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verildi. Gruplar arası karşılaştırma yapmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Deney sonuçlarının istatistiksel anlamlılığı tüm analizler için $p<0.05$ olarak kabul edildi.

3.9.Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmada materyal olarak kullanılan insan göbek kordonu Wharton jölesi mezenkimal kök hücreleri karakterizasyon ve farklılaştırma deneyleri için çok ileri pasajlarda kullanılamamasından (en fazla 5-6. pasaja kadar) ötürü analiz tekrarları sınırlı sayıda kalmıştır.

3.10.Etik Kurul Onayı

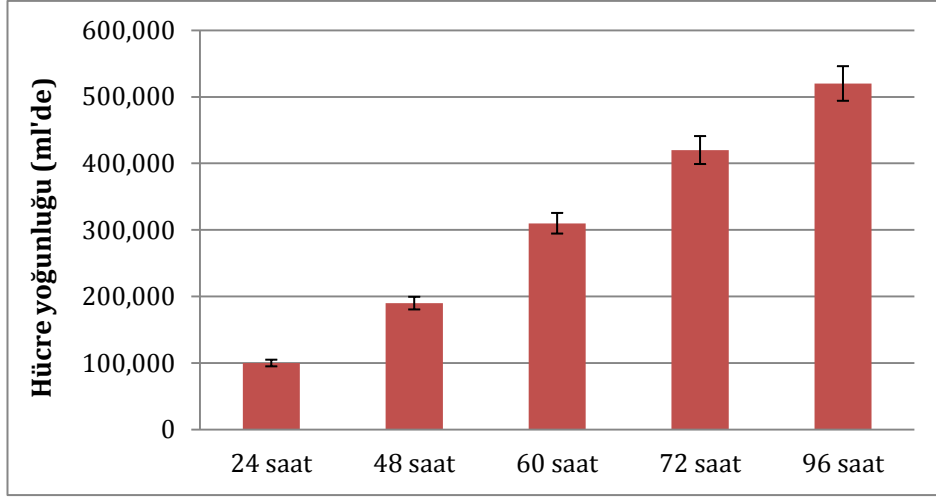
Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulu tarafından 3012-GOA protokol ve 2016/29-18 karar numarasıyla uygun bulunmuştur.



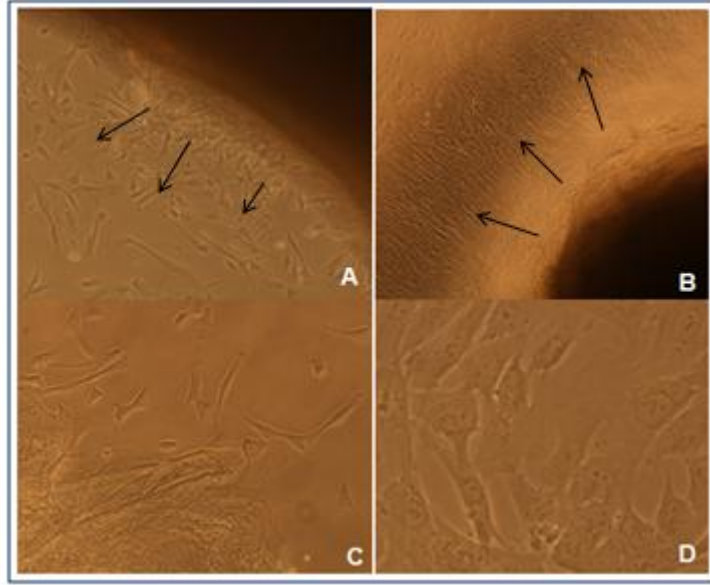
4.BULGULAR

4.1.WJ-MKH'lerin İzolasyon Süreleri ve Proliferasyon Hızları

Tez çalışmasında materyal olarak kullanılan göbek kordonu, eksplant ve enzimatik yöntem kullanılarak izole edildi. Enzimatik yöntem (kollajenaz ve tripsin) hem maliyetli hem de hücre izolasyonu açısından verimi düşük olduğu için, laboratuvar koşullarımızda eksplant yöntemi optimize edilerek WJ-MKH izolasyonuna bu şekilde devam edildi. Ters faz ışık mikroskobu ile yaptığımız gözlemlerimize göre eksplant yönteminde proliferasyon hızının daha yüksek olduğu görüldü. Özellikle bu hızın pasaj 2-3 hücrelerinde daha da yükseldiği pasaj 5 ve sonraki pasajlarda ise, bu hızın kademeli olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 19). Hücrelerin iki katına çıkma zamanı (population doubling time; PDT) eksplant hücrelerinde yaklaşık 48-72 saat iken, enzimatik hücrelerde yaklaşık 96-120 saati buldu. Eksplant yöntemi ile WJ-MKH'lerinin en erken 6. gün, en geç 21-22. günde eksplantlardan çıkmaya başladıkları gözlemlendi (Şekil 20). 21-23 günden sonra hiçbir şekilde hücre çıkışı gözlemlenmeyen eksplantlar deney dışı bırakıldı. Hücre çıkışının gözlemlendiği eksplantlar, kollajenolitik ve proteolitik enzim solüsyonu olan akütaz ile muamele edilerek etrafındaki WJ-MKH'leri toplandı. Pelleti yoğunluğuna göre WJ-MKH'leri, 6 kuyucuklu veya 25 cm²'lik kültür kaplarına ekilerek, %10 FBS'li DMEM/F12 ortamı ile kök hücre idamesine devam edildi.



Şekil 19: Eksplant yöntemi ile izole edilen WJ-MKH'lerinin periyodik zaman aralıklarında pasajlanması sonucu hücre miktarındaki değişimler (sonuçlar ort $\pm$ SEM olarak verilmiştir, $p>0.05$; $n=3$)



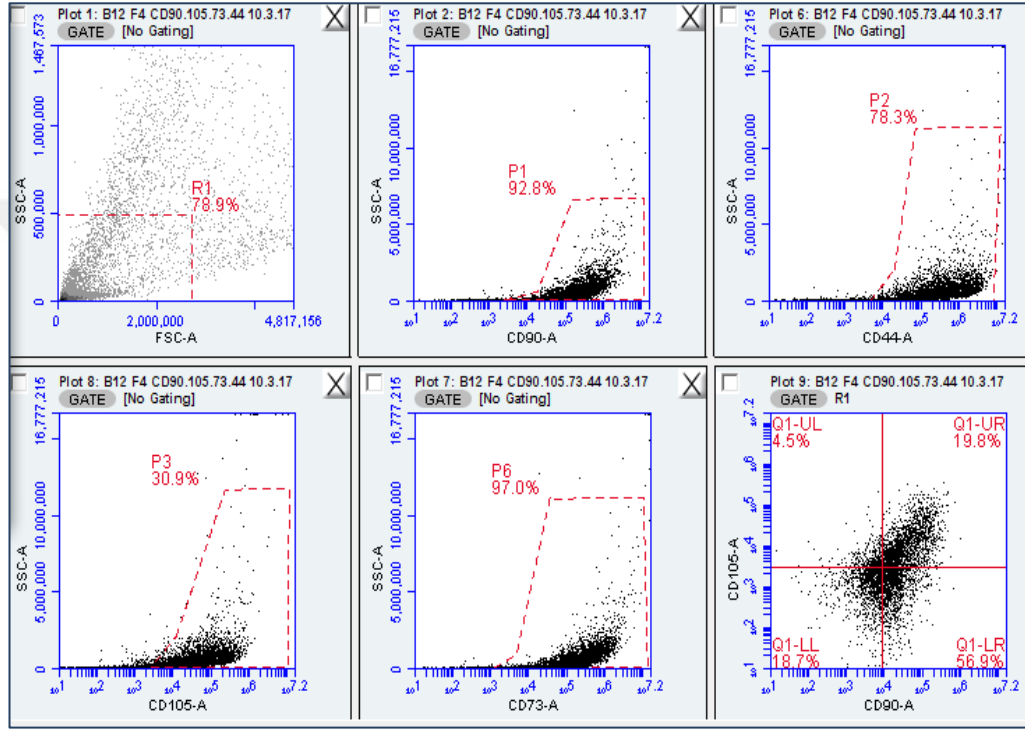
Şekil 20: Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH'lerinin eksplantlardan 9-10. günde ilk çıkışları (A); 10X büyütme (B); 4X büyütme ve genel görüntüleri (C); 10X büyütme, (D); 40X büyütme

4.2.WJ-MKH Karakterizasyonu

4.2.1.Akış Sitometri Sonuçları

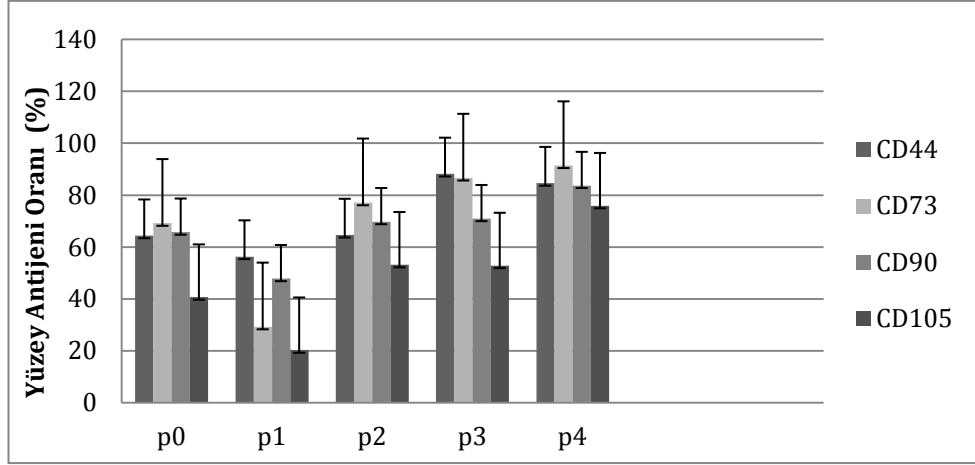
Eksplant yöntemi ile izole edilen WJ-MKH'lerinin karakterizasyonu için yüzey antijenlerini belirlemek amacıyla akış sitometri deneyleri yapıldı. Farklı dönemlerde temin edilen göbek kordonlarından eksplant yöntemiyle izole edilen WJ-MKH'leriyle

karakterizasyon için farklı deney setleri kuruldu. Deney sonuçlarında elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduklarını teyit edecek sonuçlar elde edildi. Yapılan akış sitometri analizleri sonucunda MKH belirteci olan CD 90 yüzey antijeninin yüzdesinin ortalama %80-90, CD105 yüzey antijeninin yüzdesinin ortalama %70-80, CD73 yüzey antijeninin yüzdesinin ortalama %85-90, CD44 yüzey antijeninin yüzdesinin ise ortalama %72-80 oranında olduğu bulundu (Şekil 21).



Şekil 21: Örnek bir akış sitometri verisi, WJ-MKH'lerine ait bir flow örneğindeki CD 90, CD44, CD105, CD73 yüzey antijenlerinin yüzde oranları

Yapılan akış sitometri analizleriyle, WJ-MKH'leri için hücre yoğunluğunun ve pasajlanma sıklığının kök hücre karakteristiğine önemli ölçüde etki ettiği saptandı. Hücreler kültür kabında fazla yoğunlaştığında veya idamesi düzgün yapılmadığında bununla orantılı bir şekilde MKH'lere özgü olan CD yüzey antijeni ekspresyonlarında azalma olduğu saptandı. Hatta erken pasaj (p1-p3) ve geç pasaj (p5-p7) WJ-MKH'lerinin CD belirteçlerine bakıldığında pasaj sayısı ilerledikçe kök hücre karakteristiğinden sapma olduğu anlaşıldı. Bu nedenle 4. pasajdan sonraki WJ-MKH'lerinin planlanan deneyler için kullanılmaması kararlaştırıldı (Şekil 22).



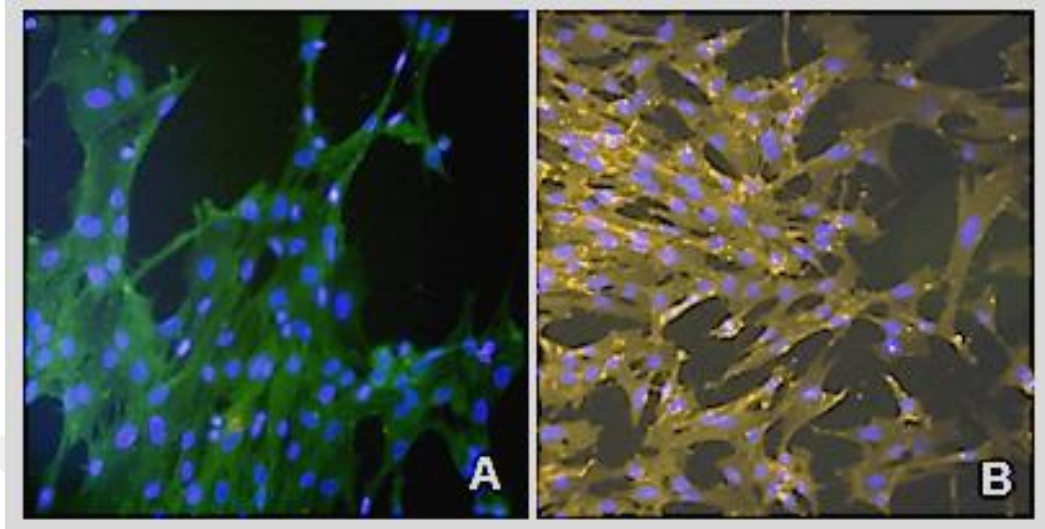
Şekil 22: Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH'lerinin pasaj sayısına göre yüzey antijeni yüzde değişimleri, eksplant yöntemiyle izole edilen ve idame ettirilen WJ-MKH'lerinin CD 90, CD 44, CD 105 ve CD 73 yüzey antijenlerinin 2,3 ve 4. pasajlarındakida yüzey

Endotel öncülü hücrelere farklılaştırılmaya çalışılan WJ-MKH'lerinde 7, 10 ve 12 günlük inkübasyonlar sonucunda yapılan akış sitometri analizlerinde, CD yüzey antijenlerinde önemli değişimler olduğu saptandı. Bununla beraber endotelyal hücreye farklılaştırma protokolünün optimizasyon kısmında, bu hücrelere özgü olan CD31 yüzey antijeni oranında çok yüksek olmasa da kademeli bir artış olduğu saptandı. Ayrıca farklılaşma grubuyla kurulan her deney setinde, MKH belirteci olan CD yüzey antijenleri açısından farklı yüzdesel sonuçlar elde edildi.

4.2.2.WJ-MKH'lerinin İF Mikroskop ile Değerlendirilmesi

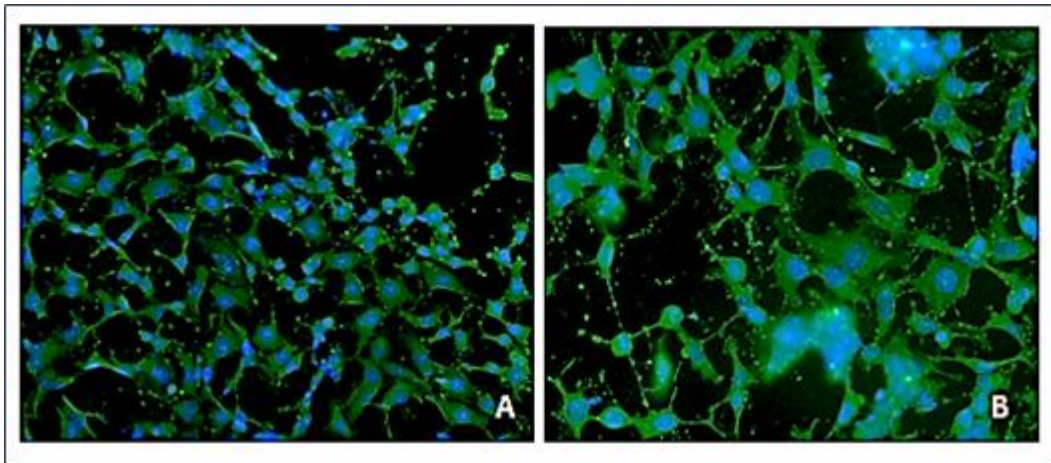
Hücre kültüründe karakterizasyon araştırmaları için en sık kullanılan tekniklerden birisi olan İF işaretleme ve görüntüleme tekniği tez kapsamında WJ-MKH'lerinin karakterizasyonu içinde kullanıldı. Protokolüne uygun bir şekilde primer ve sekonder antikorlarla işaretlenen preparatlar Olympus marka florasan mikroskopunda uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. Hücrelere doğru bir tanımlama yapılabilmesi için antikor uygulamasından ayrı DAPI ile hücre nükleuslarında boyanması ve görüntülenmesi sağlandı. MKH karakterizasyonu için erken pasaj ve geç pasaj hücreleriyle farklı deney setleri kurularak oluşturulan preparatların florasan görüntüleri alındı. WJ-MKH'lerinde pasaj sayısı ilerledikçe veya kültür koşulları yetersizleştikçe kök hücre özelliklerini kademeli olarak kaybettikleri gözlemlendi.

Düzenli bir şekilde idamesi yapılan WJ-MKH'lerinde, MKH'lere özgü olan CD90 ve CD44 gibi yüzey antijenlerinin yaptığı florasan ışıma varlığı gösterilmiştir(Şekil 23).

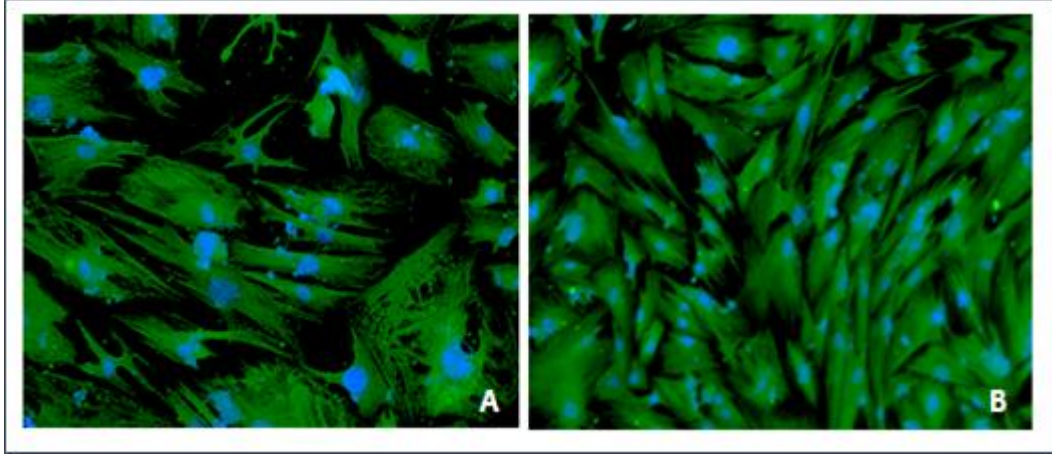


Şekil 23: WJ-MKH'lerinin karakterizasyonu için elde edilen hücre yüzey antijenlerin immunfloresans görüntüleri (A); FITC işaretli (yeşil) CD90 antikorlu ışıma görüntüsü, nükleus (mavi;DAPI), (B); Fikoeritrin işaretli (turuncu) CD44 antikorlu ışıma görüntüsü, nükleus (mavi;DAPI), (10X'lik büyütme), (A)(B); WJ-MKH pasaj-2

Diğer yandan eksplant kültür yöntemiyle izole ettiğimiz WJ-MKH'lerinin MKH karakteristiği taşıdığını göstermek adına insan MKH işlevsel farklılaştırma kiti (R&D Systems, Cat:SC006) ile yapılan deney sonrası immünflorasan boyama ile WJ-MKH'lerinin osteojenik (Şekil 24) ve adipojenik farklılaşmaları (Şekil 25) gösterildi.



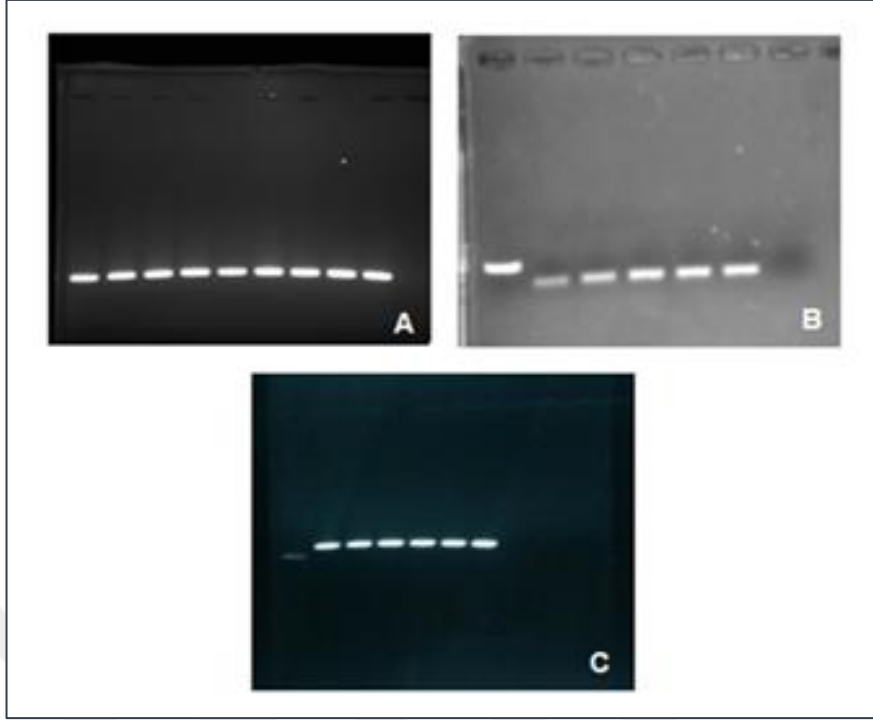
Şekil 24: WJ-MKH'lerinin osteojenik farklılaşması, (A); 10X'lik büyütme, (B); 20X'lik büyütme, sitosol: FITC (yeşil), nükleus: DAPI (mavi)



Şekil 25: WJ-MKH'lerinin adipojenik farklılaşması, (A); 20X'lik büyütme, (B); 10X'lik büyütme, sitozol: FITC (yeşil), nükleus: DAPI (mavi)

4.2.3.WJ-MKH'lerinin RT-PZR ile değerlendirilmesi

WJ-MKH'lerinde gen ekspresyonu açısından karakterizasyon deneylerine RT-PZR ile başlandı. Hedef gen bölgelerine uygun primer çiftleri ve uygun Tm sıcaklıkları belirlenerek protokolüne uygun bir şekilde PZR deneyleri gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri, primer çiftlerinin baz büyüklüğüne göre konsantrasyonunu %1,5-2 olacak şekilde hazırlanan agaroz jelde yürütülerek jel görüntüsü alınıp incelendi. PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsünü en iyi şekilde alabilmek için farklı Tm sıcaklıklarında farklı MgCl₂ ve dTNP konsantrasyonlarında deney setleri kuruldu. Bu şekilde MKH karakterizasyonu için CD90, CDH2, gibi MKH'lere özgü gen bölgelerine bakıldı (Şekil 26). Kontrol olarak ise tüm koşullarda ifade olabilen GAPDH (housekeeping) geni kullanıldı. Yapılan RT-PZR deneyleri ve sonrasında agaroz jel elektroforezi ile çeşitli cDNA örneklerinde GAPDH, CD90 ve CDH2 genleri için PZR ürünlerine ait bantlar gözlemlendi.

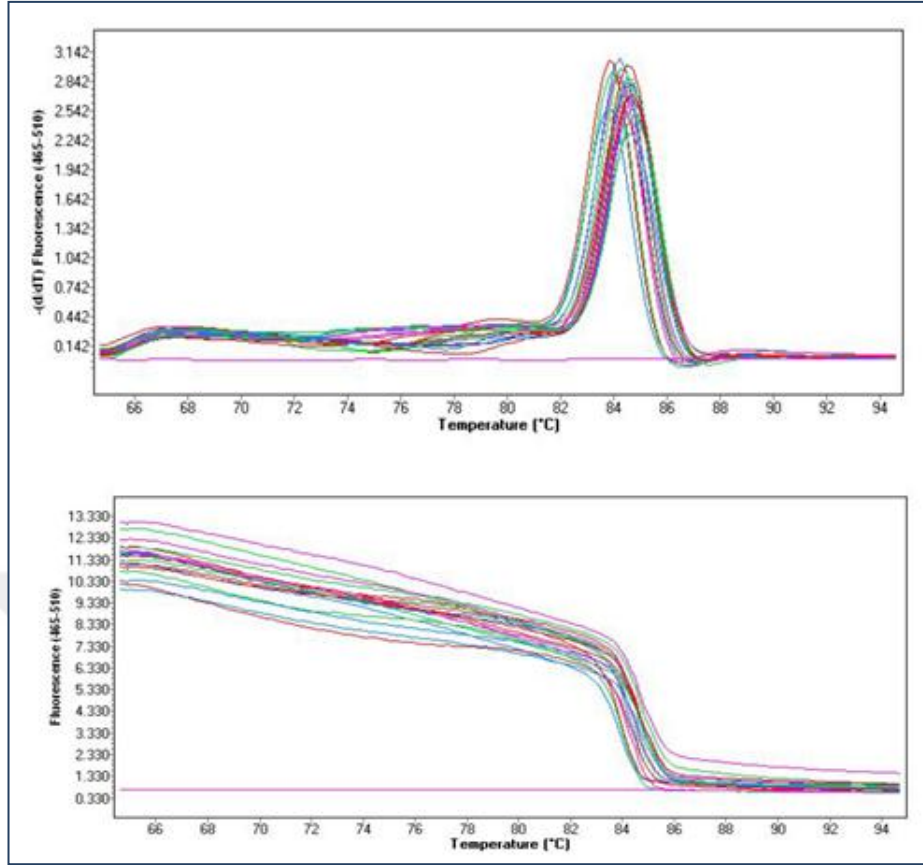


Şekil 26: GAPDH, CD90 ve CDH2 genleri için agaroz jel elektroforezi görüntüleri MKH karakterizasyonu için izole edilen cDNA örnekleri ile GAPDH, CD90 ve CDH2 genleri için elde edilen PCR ürünlerinin varlığı %2'lik agaroz jel elektroforezinde de gösterilmiştir. (A); Farklı pasaj dönemlerine ait cDNA örnekleri kullanılarak yapılan GAPDH genine ait PZR ürünleri, (B); CD90 genine ait PZR ürünleri (C); CDH2 genine ait PZR ürünleri, (D); CDH2 geni için artan MgCl₂ konsantrasyonuna ile elde edilen jel elektroforezi görüntüleri

4.2.4.WJ-MKH'lerinin kantitatif PZR ile değerlendirilmesi

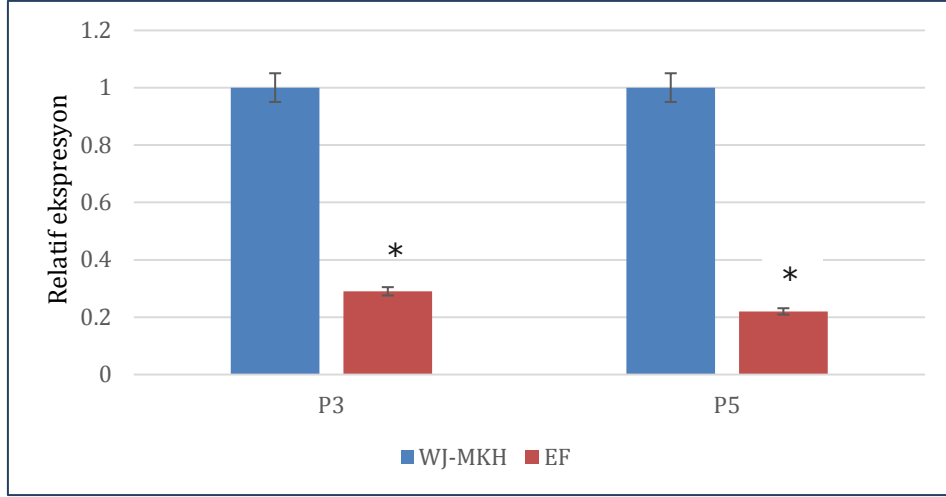
4.2.4.1.WJ-MKH'lerinin karakterizasyonunun kantitatif PZR sonuçları

WJ-MKH'lerinin karakterizasyon deneylerinde MKH'lere özgü yüzey antijenlerinin gen ekspresyon düzeylerinin RT-PZR deneyleri ile kalitatif analizleri yapıldıktan sonra kantitatif analizlerine geçildi. Bu amaçla MKH' lere özgü olan CD90, CD44, CD105 ve farklılaştırma protokolü sonrasında endotelyal hücrelere özgü olan CD31 ve CD34 gibi yüzey antijenlerinin gerçek zamanlı PZR (real time PCR, qPCR) deneyleri yapıldı. Böylelikle WJ-MKH'lerinden elde edilen cDNA örneklerinin uygun primerler ve uygun T_m sıcaklıkları kullanılarak erime pikleri ve eğrileri oluşturuldu (Şekil 27). Bu amplifikasyon eğrilerinden elde edilen eşik döğüsü (C_t) değerleri, analizi yapılacak olan hedef gen bölgesinin bu hücrelerde ne kadar yoğunlukta eksprese edildiğini bize eş zamanlı olarak ifade etmiştir.



Şekil 27: WJ-MKH'leri ile yapılan CD105 genine özgü primerler kullanılarak yapılan bir kantitatif PZR deneyi sonrası örneklerin erime eğrileri ve pikleri (Tm değerleri)

Oluşan PZR ürünlerinin kantitatif analizi, GAPDH, HPRT, YWHAZ gibi önemli housekeeping genlerin Ct değerlerine göre normalize edilerek $\Delta\Delta Ct$ hesaplamasından "kat değişiklikleri" hesaplanarak yorumlandı. Analizi yapılacak hedef genler için relatif ekspresyon seviyeleri ise deney setlerindeki kontrol grubunun kat değişiklik sonuçlarından yararlanılarak hesaplandı. Böylece farklı deney grupları arasında gen ekspresyon değişimleri kantitatif olarak saptandı (Şekil 28). Kantitatif PZR için WJ-MKH'leri ile kurulan deney setlerinin bazı gruplarında MKH'lere özgü CD gen ekspresyon düzeyleri anlamlı çıkarken, bazı gruplardaki gen ekspresyon düzeyleri anlamsız olarak kabul edildi.



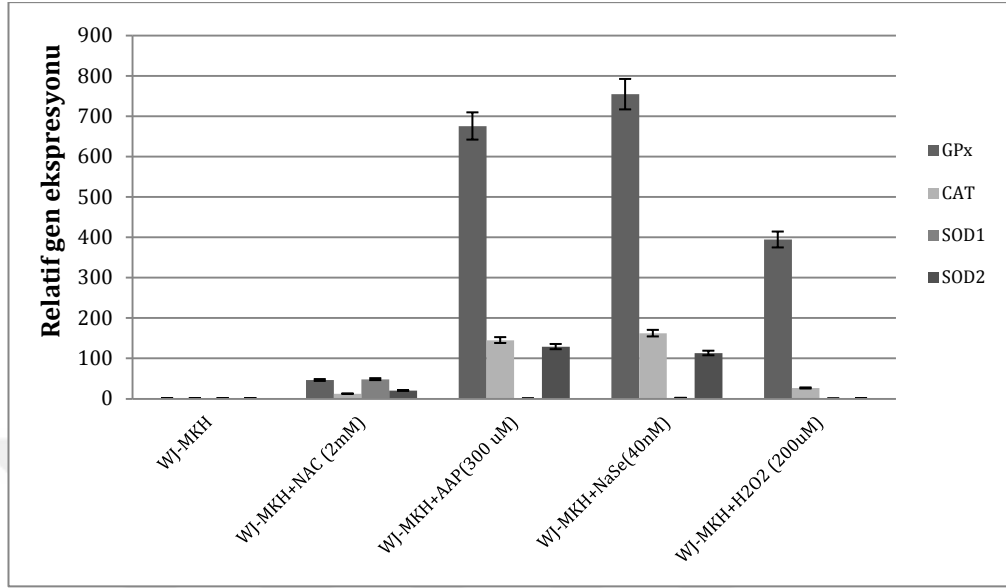
Şekil 28: WJ-MKH'lerinde koşula bağlı CD90 gen ekspresyon değişimleri. WJ-MKH'lerinde pasaj grupları arasında koşula bağlı CD90 gen ekspresyonlarını farklılaşması indüklenmiş hücrelerde 10. Günü sonunda belirgin olarak azaldığı bulundu (* kontrole göre anlamlı azalma $p < 0.05$, sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, $n=3$).

WJ-MKH'lerine farklılaştırma protokolünün uygulanması sonrası hücre karakteristiğini gen ekspresyonu düzeyinde belirlemek için PZR deneyleri yapıldı. Bu noktada endotelial hücrelere özgü olan CD31 ve CD34 yüzey antijenlerinin gen ekspresyonlarına kantitatif PZR ile bakıldı. Diğer yandan pozitif kontrol grubu olarak kullanılan HUVEC grubunda da bu genlerinin ekspresyon seviyelerinin yüksek olması beklenirken, Ct değerleri tanımsız olarak kabul edilmesi analitik bir hata olarak değerlendirildi. Ancak bütçe ve zaman kısıtlılığı nedeni ile deneyler tekrarlanamadı.

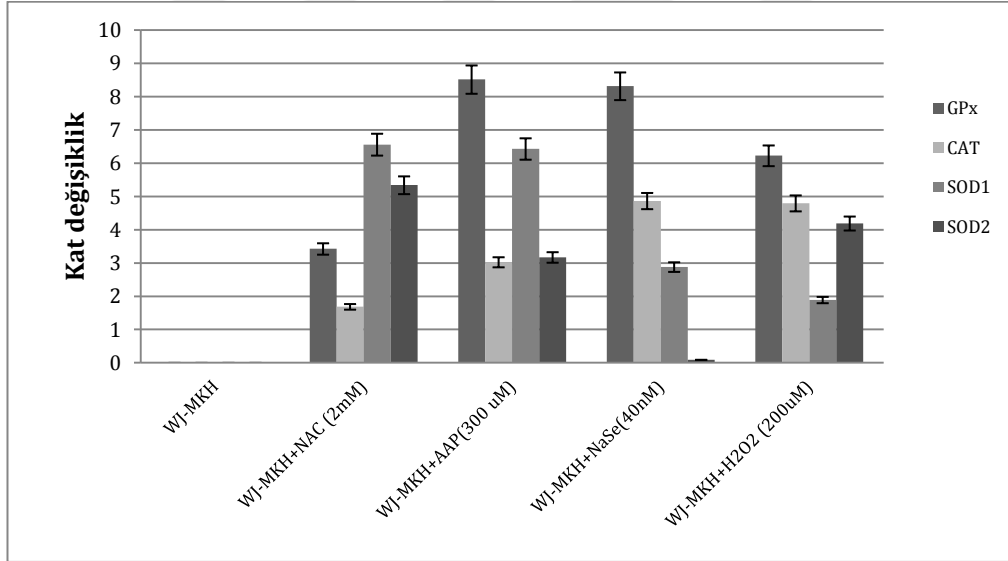
4.2.4.2.Endotelial farklılaşma sürecinde antioksidan enzim aktivitelerinin kantitatif PZR sonuçları

Endotelial farklılaşma sürecinde antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarındaki değişikliğin belirlenmesi için WJ-MKH ve EF grubu hücrelerinden izole edilen RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi sonrası SOD, GPx ve katalaz primer çiftleri kullanılarak kantitatif PZR deneyleri yapıldı. Her iki grupta da enzim genlerine ait farklı sonuçlar elde edildi. WJ-MKH grubunda 2 saatlik H_2O_2 muamelesi ve antioksidan molekül uygulaması sonrası en etkin gen ekspresyon değişiminin GPx enzim geninde olduğu gösterildi(Şekil 29) (Şekil 30). Benzer şekilde EF grubunda da 2 saatlik H_2O_2

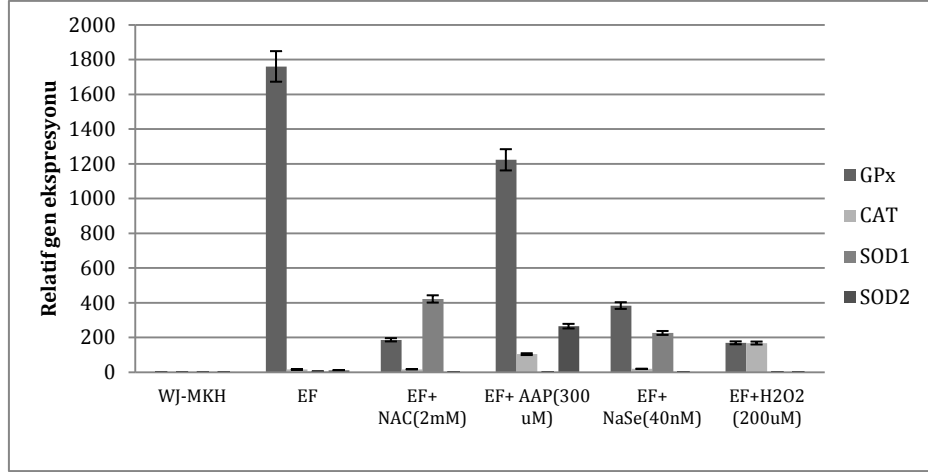
muamelesi ve antioksidan molekül uygulaması sonrası en etkin gen ekspresyon değişiminin GPx enzim geninde olduğu gösterildi(Şekil 31) (Şekil 32).



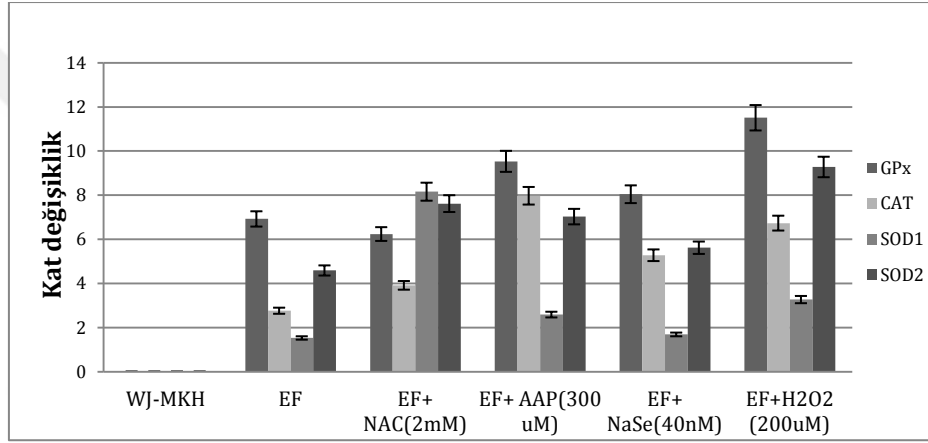
Şekil 29: WJ-MKH grubunda antioksidan enzimlerine ait relatif gen ekspresyon değişimleri



Şekil 30: WJ-MKH grubunda antioksidan enzim genlerine ait kat değişikliği



Şekil 31: EF grubunda antioksidan enzimlerine ait relatif gen ekspresyon değışimleri

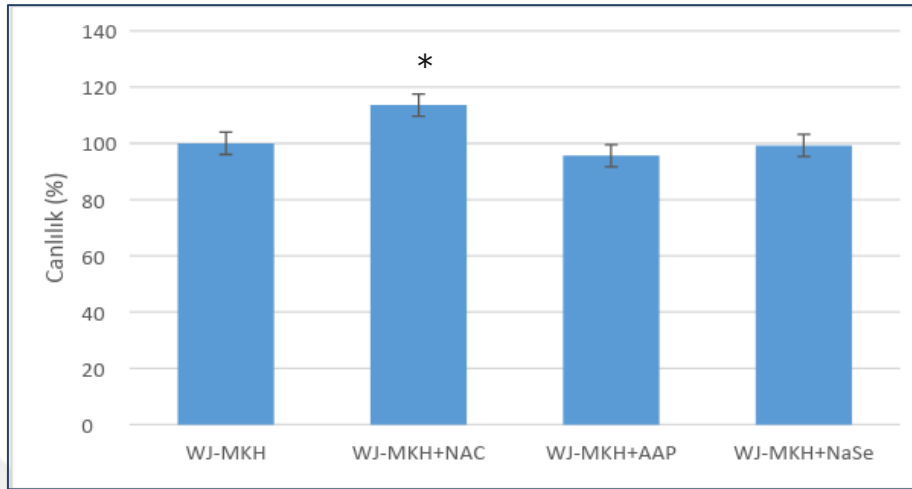


Şekil 32: EF grubunda antioksidan enzim genlerine ait kat değışikliği

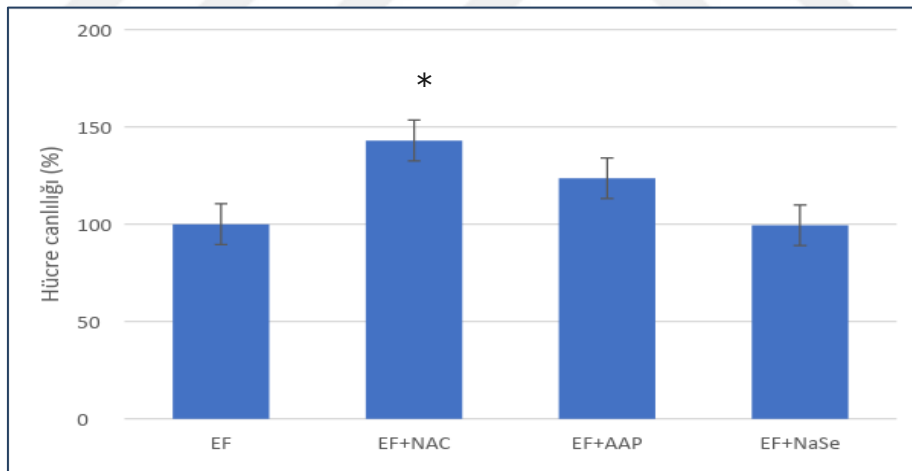
4.3.Canlılık ve Proliferasyon Testi Sonuçları

Tez çalışması kapsamında WJ-MKH'lerinin hem idame, hem de farklılaştırma deneyi koşulların kültür ortamına uygulanan antioksidan moleküllere (NAC, AAP, NaSe) ve H₂O₂'ye karşı verdiği yanıtı anlamak için WST-1 canlılık testi yapıldı. Bu kapsamda kurulan deney setlerine uygulanan antioksidan moleköl konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi WST-1 absorbans sonuçları "% canlılık" hesaplaması ile yorumlandı. WJ-MKH'lerinde NAC (2mM) hücre canlılığı artırdığı gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil 33). Benzer şekilde endotelial farklılaşması indüklenen progenitör hücrelerde de NAC uygulaması hücre canlılığı %43 oranında artırdı. Bunun yanı sıra WJ-MKH grubunda AAP uygulamasının hücre canlılığını %23

artırdığı gözlemlendi (Şekil 34). NaSe uygulamasının hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine olumlu bir etkisi görülemedi (Şekil 33 ve 34).



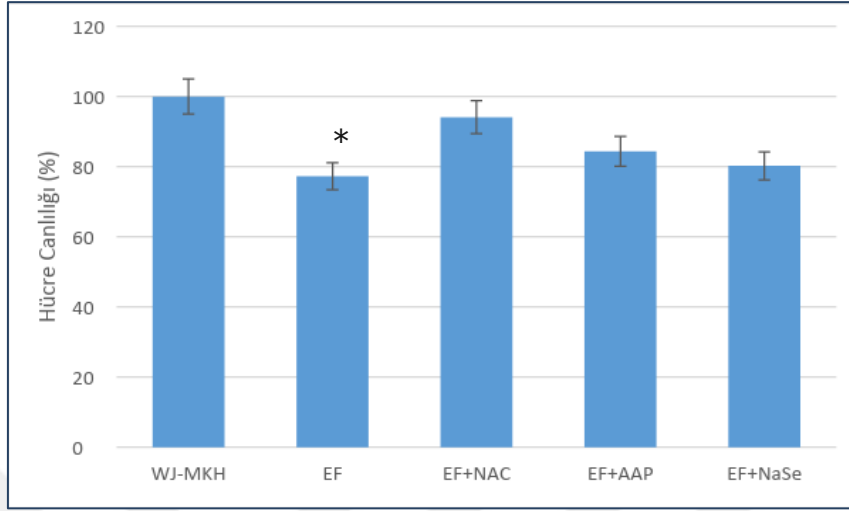
Şekil 33: WJ-MKH'lerinde 10 günlük NAC, AAP ve NaSe uygulamasının hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi. Sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu x100) formülü ile canlılık (%) olarak verilmiştir.(* Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek , $p < 0,05$, sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, NAC (2mM), AAP (300uM), NaSe (40nM) , $n=5$).



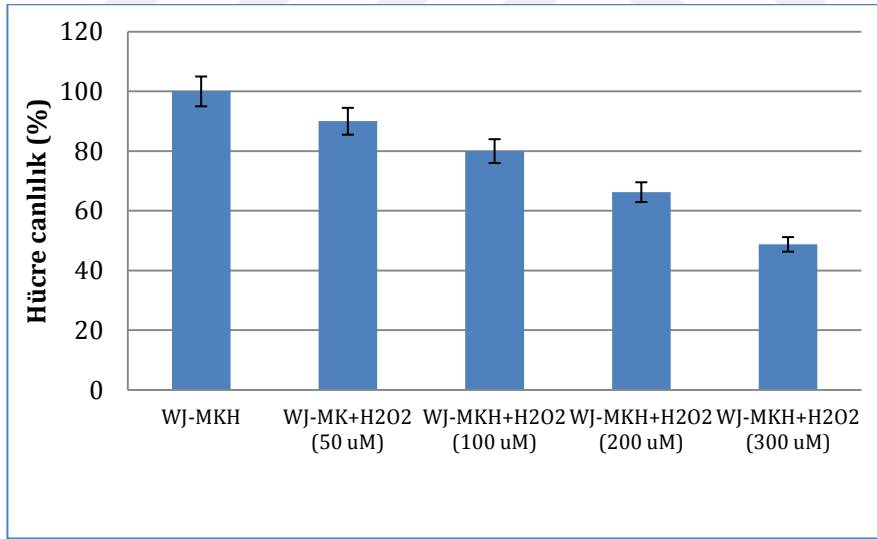
Şekil 34: Progenitor endotel hücrelerinde NAC, AAP ve NaSe'nin hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu x100) formülü ile canlılık (%) olarak verilmiştir (* EF grubuna göre anlamlı yüksek , $p < 0,05$, sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, NAC (2mM), AAP (300uM), NaSe (40nM) $n=10$).

WJ-MKH grubuna göre antioksidan muamelesi sonrası EF grubunun hücre canlılığı karşılaştırıldığında, antioksidan takviyesi almayan EF grubunda antioksidan takviyesi alan (2 mM NAC ve 300 uM AAP) EF gruplara hücre canlılığının azaldığı görüldü (Şekil 35). Diğer yandan WJ-MKH'lerinde artan H_2O_2 konsantrasyonuyla

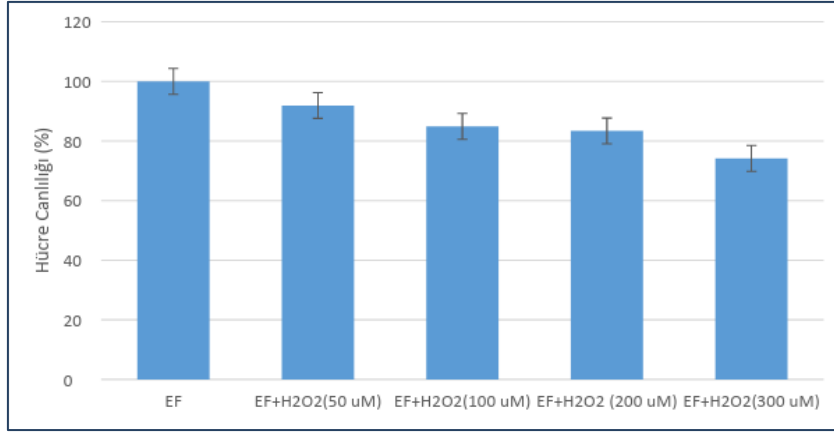
beraber oluşan oksidatif stresin hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı bulundu (Şekil 36). Benzer etkinin EF grubu hücrelerinde de olduğu gösterildi (Şekil 37).



Şekil 35: Endotelial farklılaşma sürecinde hücre canlılığı ve proliferasyonunun WJ-MKH lere göre değişimi. Sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu x100) formülü ile proliferasyon (%) olarak verilmiştir (*WJ-MKH grubuna göre anlamlı fark , $p < 0,05$, sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir, NAC (2mM), AAP (300uM), NaSe (40nM) $n=10$).



Şekil 36: WJ-MKH'lerinde 2 saatlik H2O2 uygulamasının hücre canlılığı üzerine uygulama dozuna bağlı etkisi



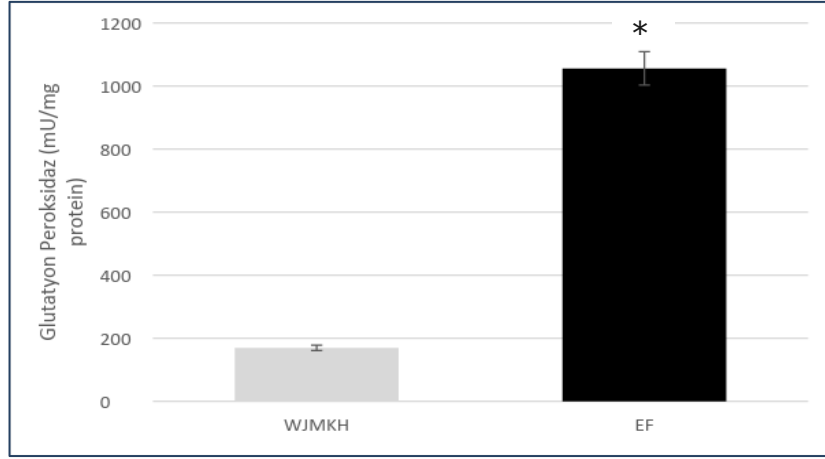
Şekil 37: EF hücrelerinde 2 saatlik H₂O₂ uygulamasının hücre canlılığı üzerine uygulama dozuna bağlı etkisi

4.4.Antioksidan Enzim Aktivite Sonuçları

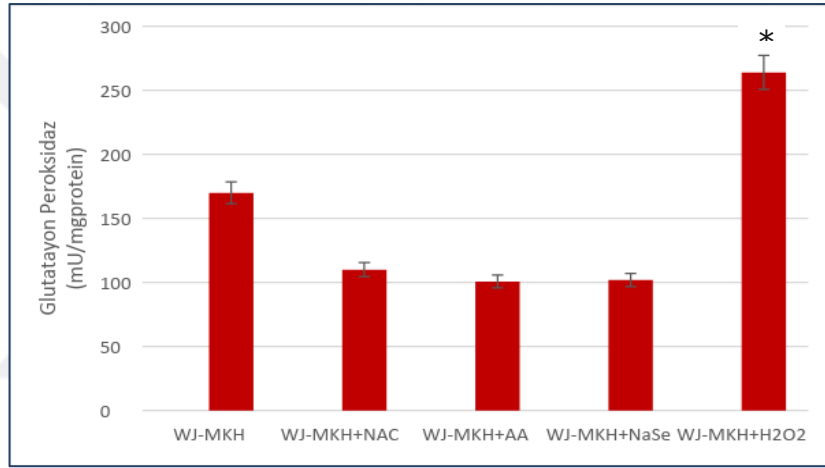
WJ-MKH'leri ve EF grubundaki antioksidan enzim aktivitesini saptamak amacıyla deney setlerinden elde edilen hücre lizatları kullanılarak yapılan enzim aktivite ölçümlerinden farklı sonuçlar elde edildi. WJ-MKH'lerine endotelial farklılaşma sürecinde uygulanan antioksidan moleküller ve H₂O₂'nin, hücrelerin antioksidan savunma sistemi üzerinde farklı etkileri olduğu saptandı. Yapılan ölçümlerin anlamlı hale getirilmesi ve bir ünite enzim aktivite tanımlaması için, BCA protein tayini yapılarak elde edilen sonuçlar mg/ml protein başına verilerek anlamlı hale getirildi.

GPx Enzim Aktivite Sonuçları

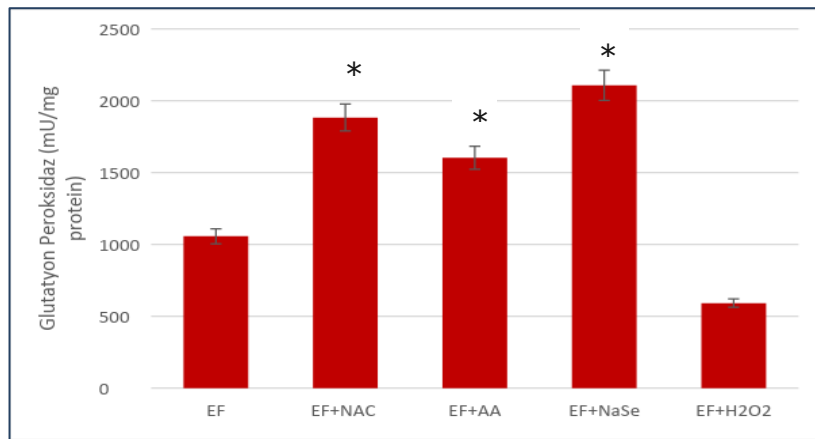
GPx enzim aktivite ölçümü sonuçlarına göre, kontrol grupları açısından WJ-MKH ve EF grubu karşılaştırıldığında farklılaşma sürecinde GPx aktivitesinin anlamlı artış gösterdiği bulundu (Şekil 38). WJ-MKH grubu kendi içinde karşılaştırıldığında antioksidan molekül muamelesinin GPx enzim aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı azalttığı, H₂O₂ uygulamasının ise GPx enzim aktivitesini anlamlı arttırdığı saptandı (Şekil 39). EF grubunda ise antioksidan molekül ve H₂O₂ muamelesinin GPx enzim aktivitesi üzerine etkisinin WJ-MKH grubuna göre tam tersi olduğu gösterildi (Şekil 40).



Şekil 38: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde GPx enzim aktivite düzeyi (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p < 0,05$ $n=6$)

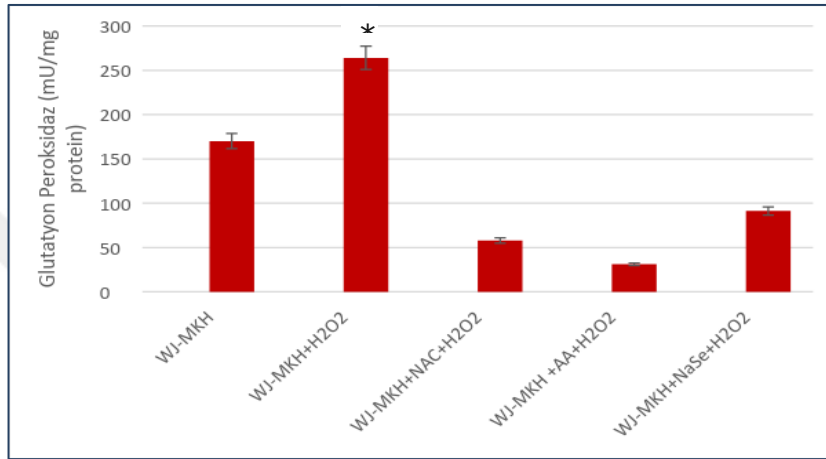


Şekil 39: WJ-MKH'lerinde GPx enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH+ H2O2 grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p < 0,05$ $n=6$, GPx: glutathione peroxidase)

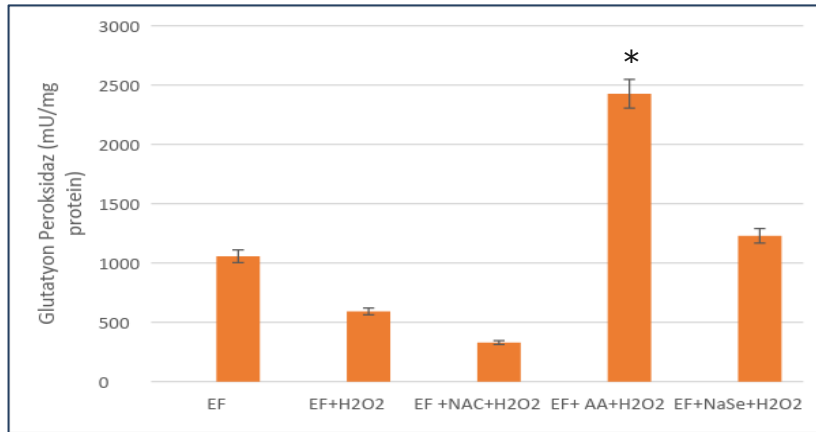


Şekil 40: EF grubu hücrelerinde GPx enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*EF grubuna göre anlamlı yüksek $p < 0,05$ $n=6$)

Diğer taraftan, WJ-MKH grubunda 2 saatlik H₂O₂ uygulaması sonrası antioksidan moleküllerin ortama eklenmesiyle gerçekleştirilen deney sonrası GPx enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı saptandı. Sadece H₂O₂ uygulaması yapılarak idame ettirilen WJ-MKH'lerinde ise GPx enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı gösterildi (Şekil 41). EF grubunda ise benzer etki gözlemlenirken, 2 saatlik H₂O₂ uygulaması sonrası AAP verilen grupta GPx enzim aktivitesinin hem diğer gruplara hem de kontrol grubuna göre anlamlı arttığı bulundu (Şekil 42).



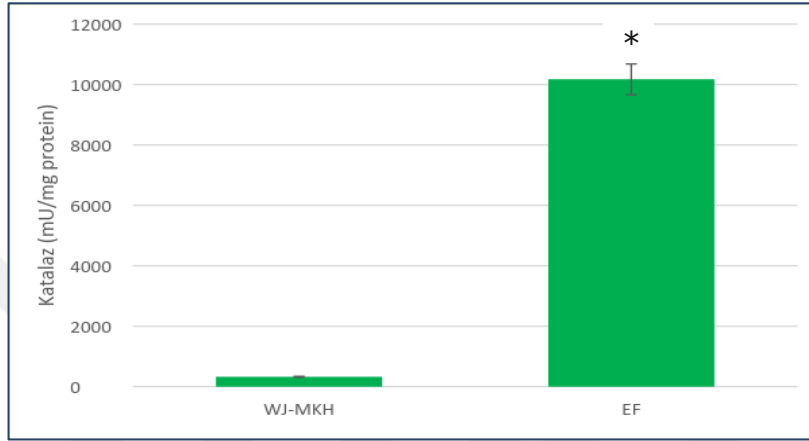
Şekil 41: WJ-MKH'lerinde 2 saatlik H₂O₂ uygulaması sonrası GPx enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH+ H₂O₂ grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek, ** WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük; p<0,05)



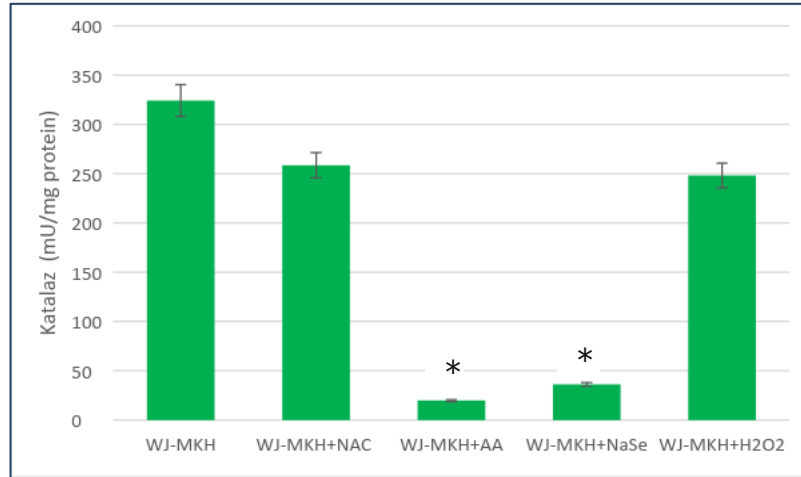
Şekil 42: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H₂O₂ uygulaması sonrası GPx enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*EF+AA+H₂O₂ grubunda EF grubuna göre anlamlı yüksek p<0,05 n=6)

Katalaz Enzim Aktivite Sonuçları

Katalaz enzim aktivite ölçüm kitine göre, hücre lizatlarıyla yapılan kolorimetrik ölçüm sonucunda, katalaz aktivitesinin farklılaşma sürecinde WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek olduğu bulundu (Şekil 43). WJ-MKH'lere uygulanan antioksidan moleküllerden AAP ve NaSe'nin katalaz aktivitesini önemli ölçüde azalttığı, NAC ve H₂O₂'nin ise katalaz aktivitesi üzerine benzer etki yaptığı bulundu (Şekil 44).



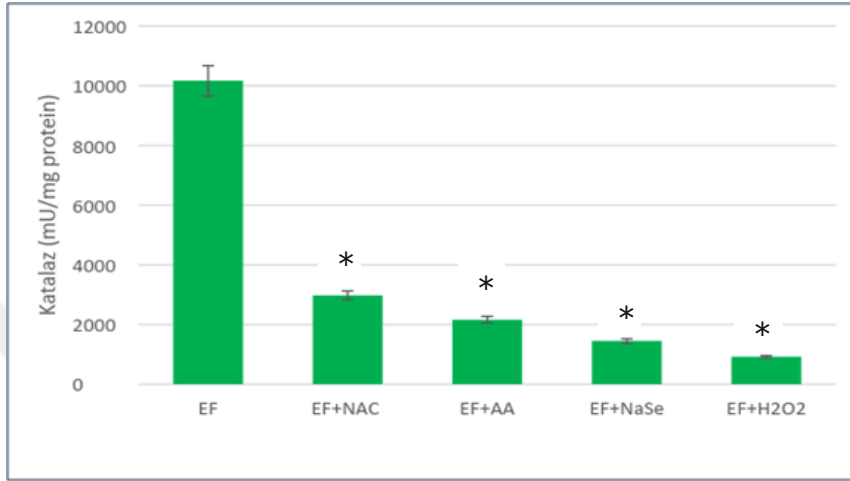
Şekil 43: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde katalaz enzim aktivite düzeyi (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p<0,05$ $n=6$)



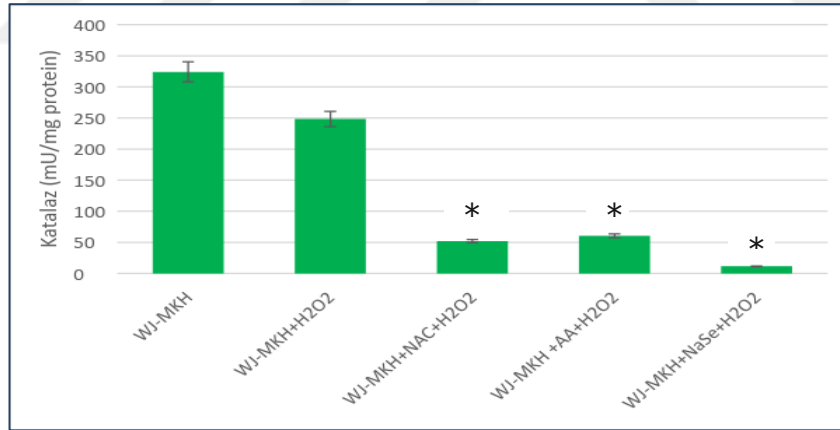
Şekil 44: WJ-MKH'lerinde Katalaz enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük $p<0,05$ $n=6$)

EF grubunda, katalaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre her üç antioksidan molekül uygulanan grupta ve H₂O₂'li grupta anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu (Şekil 45). WJ-MKH grubunda ise 2 saatlik H₂O₂ uygulamasının ardından

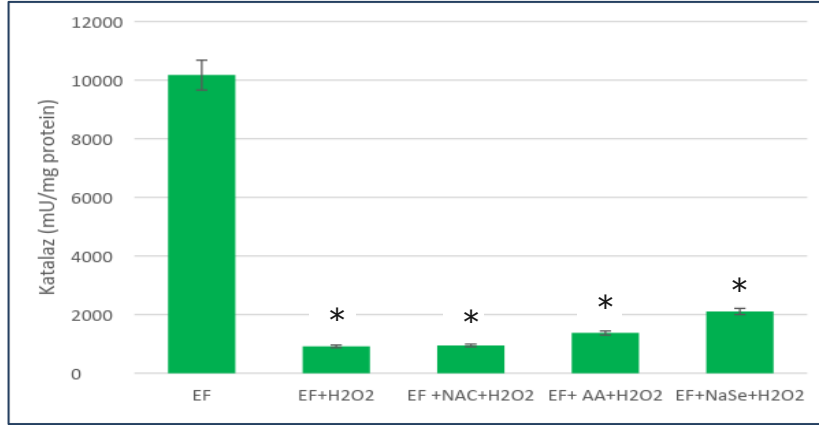
antioksidan molekül muamelesi sonrası katalaz enzim aktivitesinin her üç antioksidan molekülü içeren grupta kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı bulundu (Şekil 46). EF grubunda da H_2O_2 ve antioksidan molekül muamelesi sonrası benzer etki görülürken ek olarak sadece H_2O_2 uygulamasının da enzim aktivitesini anlamlı azalttığı gösterildi (Şekil 47).



Şekil 45: EF grubu hücrelerinde Katalaz enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*EF grubuna göre anlamlı düşük, $p < 0,05$ $n=6$)



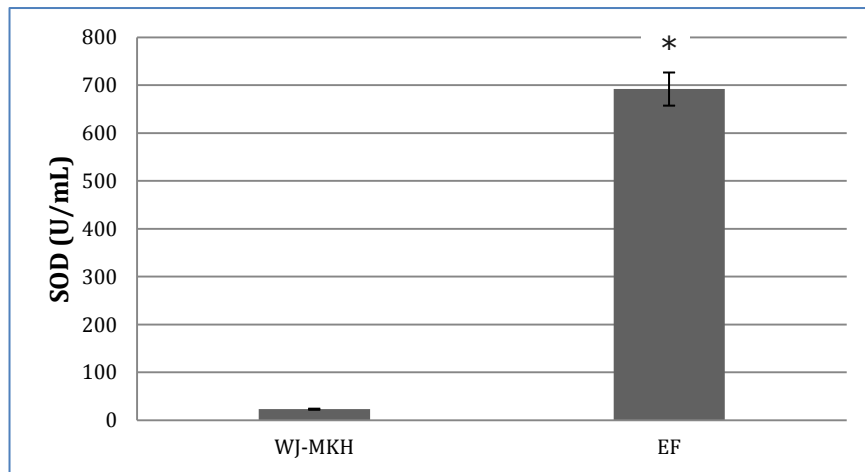
Şekil 46: WJ-MKH'lerinde 2 saatlik H_2O_2 uygulaması sonrası katalaz enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH+ H_2O_2 grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük, ** WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük; $p < 0,05$ $n=6$)



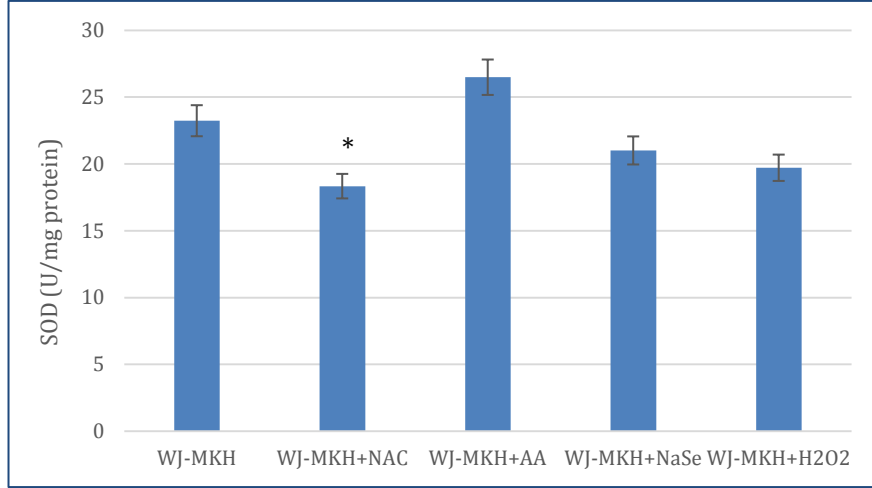
Şekil 47: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H₂O₂ uygulaması sonrası katalaz enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (* EF grubuna göre anlamlı düşük; p<0,05 n=6)

SOD Enzim Aktivite Sonuçları

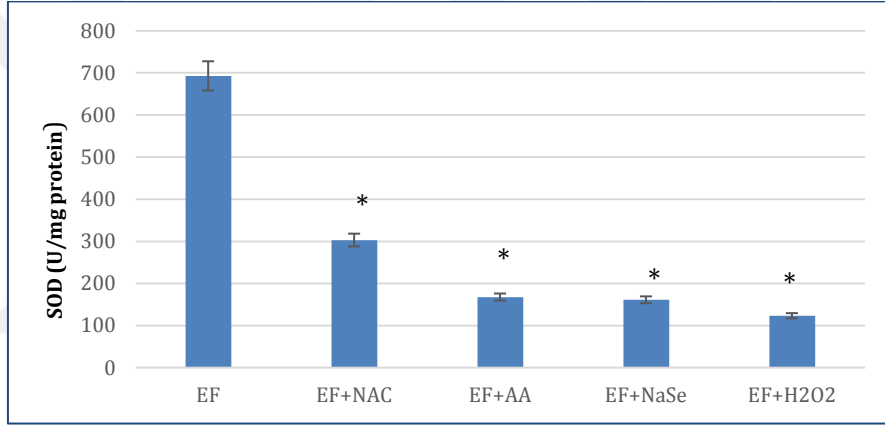
SOD enzim aktivite ölçüm kitine göre, hücre lizatlarıyla yapılan kolorimetrik ölçüm sonucunda, enzim aktivitesinin farklılaşma sürecinde WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek olduğu bulundu (Şekil 48). WJ-MKH'lere uygulanan antioksidan moleküllerden AAP'nin SOD aktivitesini diğer antioksidan moleküllere göre anlamlı arttırdığı, NAC, NaSe ve H₂O₂'nin ise azalttığı gösterildi (Şekil 49). EF grubunda ise uygulanan antioksidan moleküllerin her birinin enzim aktivitesini kontrole göre anlamlı azalttığı saptandı (Şekil 50).



Şekil 48: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde SOD enzim aktivite düzeyi (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek p<0,05 n=6)

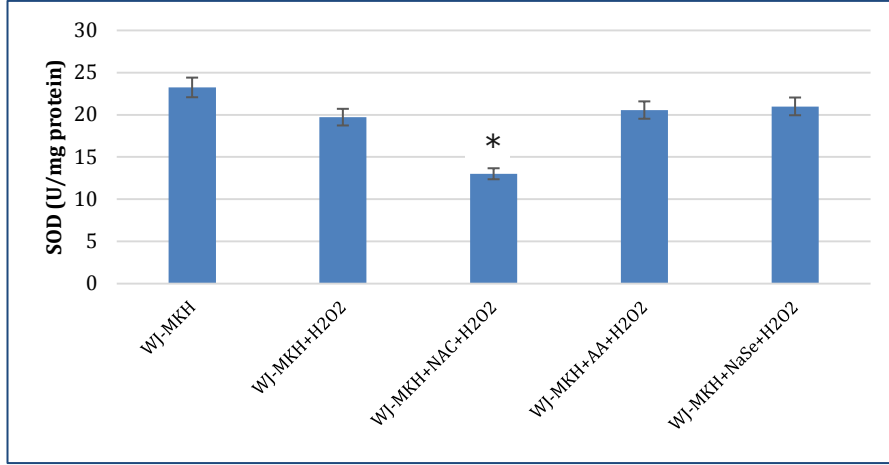


Şekil 49: WJ-MKH'lerinde SOD enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük $p<0,05$ $n=6$)

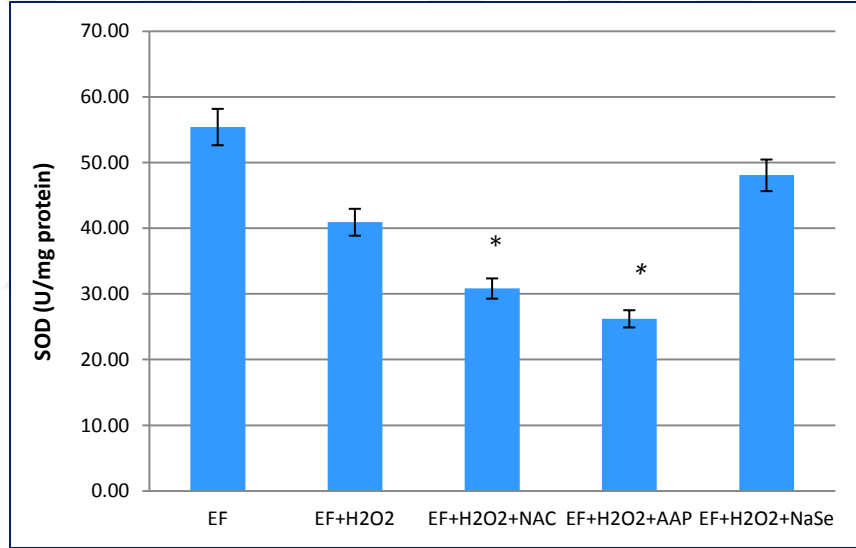


Şekil 50: EF grubunda SOD enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*EF grubuna göre anlamlı düşük $p<0,05$ $n=6$)

WJ-MKH grubunda 2 saatlik H_2O_2 ön muamelesi sonrası antioksidan molekül uygulaması yapıldıktan sonra kontrol grubuna göre SOD enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında NAC uygulanan grupta diğer gruplara göre anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 51). EF grubunda ise 2 saatlik H_2O_2 ön muamelesi sonrası antioksidan molekül uygulaması yapıldıktan sonra kontrol grubuna göre tüm gruplarda SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir azalma olduğu saptandı (Şekil 52).



Şekil 51: WJ-MKH'lerinde 2 saatlik H2O2 uygulaması sonrası SOD enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (*WJ-MKH grubuna göre anlamlı düşük, $p < 0,05$ n=6)

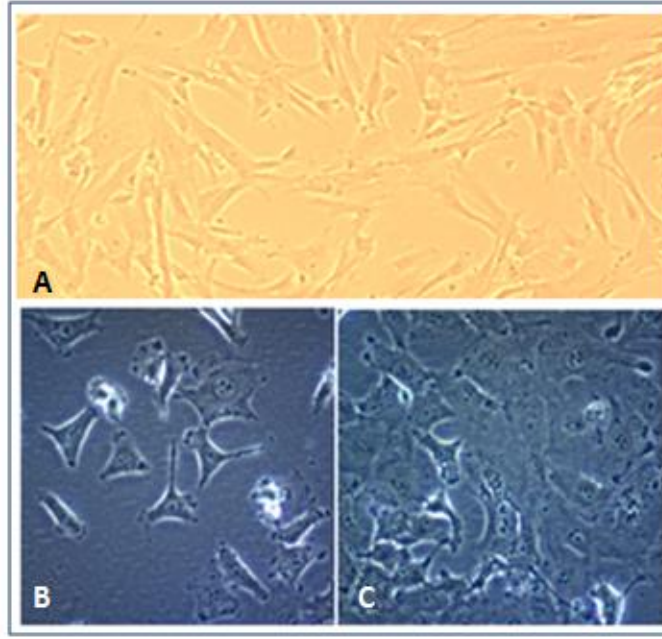


Şekil 52: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H2O2 uygulaması sonrası SOD enzim aktivitesine antioksidan moleküllerin etkisi (* EF grubuna göre anlamlı düşük; $p < 0,05$ n=6)

4.5.Endotelyal Farklılaşma Sonrası Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları

WJ-MKH'lerini endotel öncülü hücrelere farklılaştırma deneylerinde, taranan literatürlere istinaden farklı süreler (1 hafta, 10 gün, 12 gün) denendi. Farklılaştırma protokollerinde yazan konsantrasyonlarda büyüme faktörleri eklenmiş büyüme ortamıyla (%2 FBS'li M199) inkübe edilen WJ-MKH'lerinde, 7, 10 ve 12. gün sonunda çok belirgin bir morfolojik değişim gözlemlenmedi. Fakat deney süresi bitiminde farklılaşma grubunun karakterizasyon amacıyla gen ekspresyonlarına ve yüzey

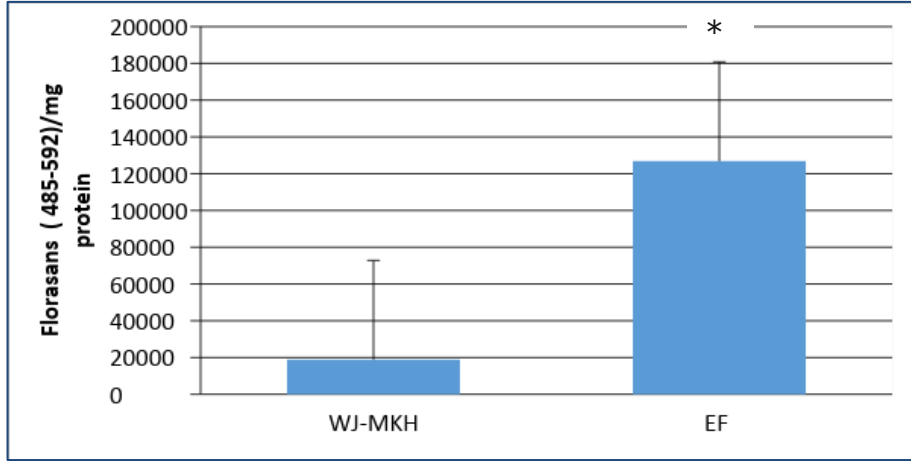
antijenlerine bakıldığında kontrol grubuna göre (WJ-MKH'leri) değişimler saptandı. Ayrıca farklılaştırma deneylerinin karakterizasyonu açısından gen ve protein ekspresyon düzeylerinin incelenmesi kısmında pozitif kontrol grubu olarak insan göbek kordonu arteriyel endotel hücrelerinden (HUVEC) yararlanıldı (Şekil 53).



Şekil 53: Ters faz ışık mikroskopik görüntüler Endotelial farklılaşma amaçlı rich medium uygulaması sonrası 3 .gün ters faz ışık mikroskobu görüntüsü. **(A);** (10X büyütme, WJ-MKH pasaj-2 hücreleri), **(B)** ve **(C),** Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan HUVEC'lere ait ters faz ışık mikroskobu görüntüleri (10X)

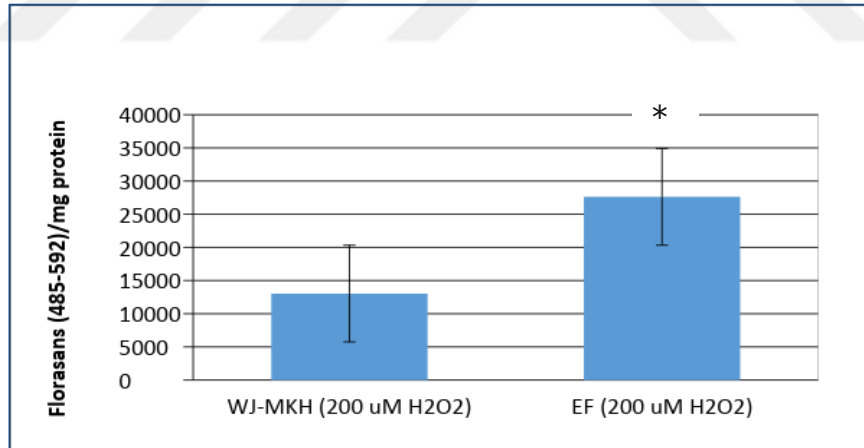
4.6.Endotelyal Farklılaşma Sürecinde Total ROT Ölçümü

Endotelyal farklılaştırma sürecinde WJ-MKH'lerine oksidatif stres ajanı olarak uygulanan H_2O_2 'nin, hücrelerde ne düzeyde bir hasar yarattığını tespit etmek amacıyla canlılık testlerine ek olarak, CM- H_2DCFDA probu kullanılarak total ROT miktarının ölçümü yapıldı. Bu prob kullanılarak yapılan ölçümlerde, WJ-MKH ve endotelyal farklılaşma grubu hücrelerinin hem antioksidan molekülleri, hem de H_2O_2 eklenmiş halleri ayrı ayrı ele alındı. Yapılan ölçümler sonrası kontrol grubu olarak WJ-MKH'leri ve endotelyal farklılaşma grubu hücreleri birbiriyle kıyaslandığında, total ROT miktarı farklılaşma grubunda anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$) (Şekil 54).



Şekil 54: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde total ROT miktarı (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p < 0,05$ $n=6$)

H_2O_2 uygulaması yapılan WJ-MKH'leri ve endotelial farklılaşma grubu hücreleri birbiriyle kıyaslandığında ise, total ROT miktarı farklılaşma grubunda WJ-MKH'lerine göre yine yüksek bulundu. Buna ek olarak, H_2O_2 uygulamasının WJ-MKH'lerinde de kontrol grubuna kıyasla total ROT miktarını belirgin bir düzeyde arttırdığı saptandı (Şekil 55).

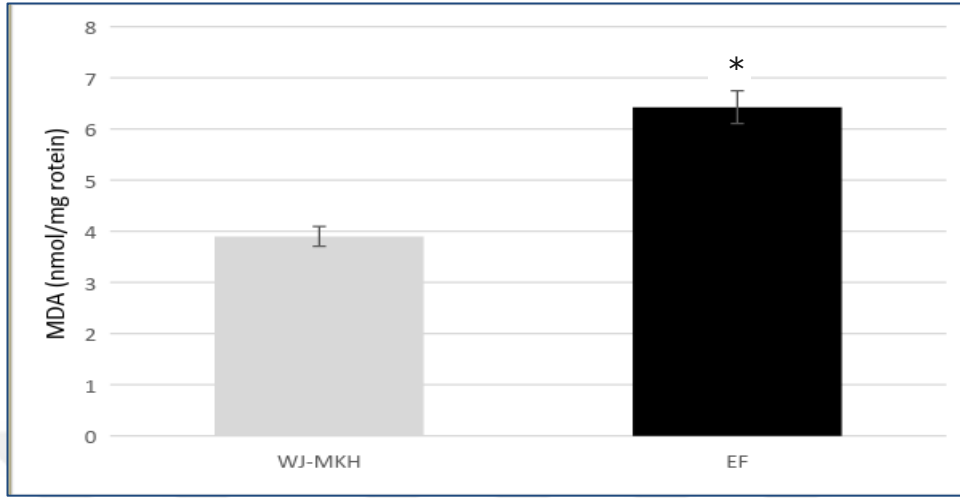


Şekil 55: WJ-MKH'leri endotelial farklılaşma grubu hücrelerinde 2 saatlik H_2O_2 uygulaması sonrası oksidatif strese bağlı total ROT miktarı (*EF+ H_2O_2 grubunda WJ-MKH+ H_2O_2 grubuna göre anlamlı yüksek $p < 0,05$ $n=6$)

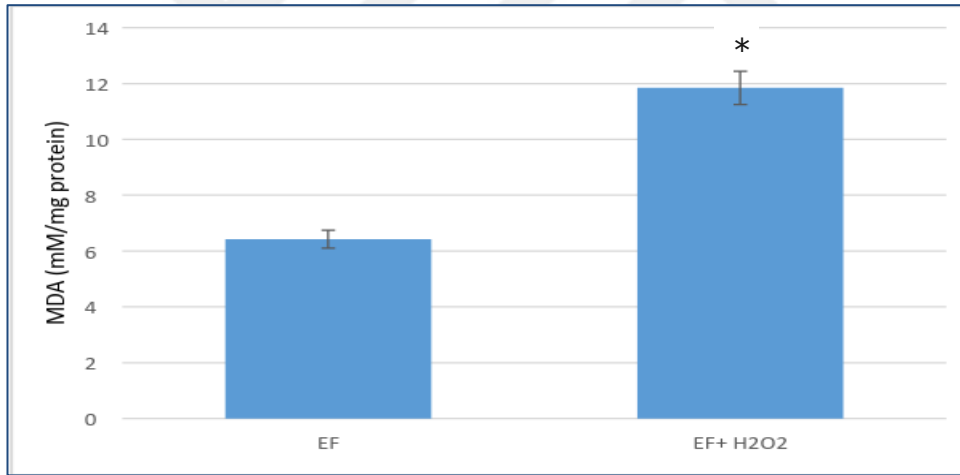
4.7. Endotelial Farklılaşma Sürecinde MDA Analizi Sonuçları

WJ-MKH ve EF grupları total MDA miktarı yönünden karşılaştırıldığında, farklılaşma sürecinde artan ROT düzeyine bağlı olarak EF grubunda MDA miktarının artış gösterdiği saptandı (Şekil 56). Benzer şekilde EF grubuna H_2O_2 muamelesi

sonrası hücresel MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı arttığı bulundu (Şekil 57).

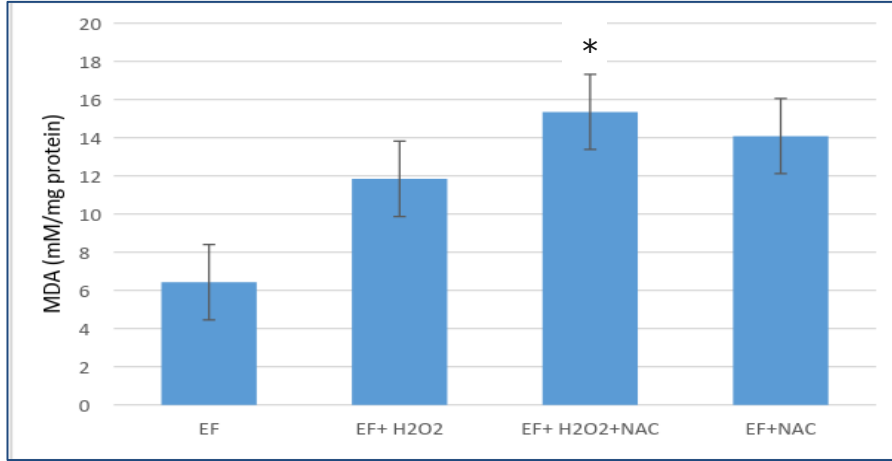


Şekil 56: WJ-MKH'leri ve EF grubu hücrelerinde total MDA miktarı (*EF grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek $p < 0,05$ $n=6$ MDA: malondialdehit)

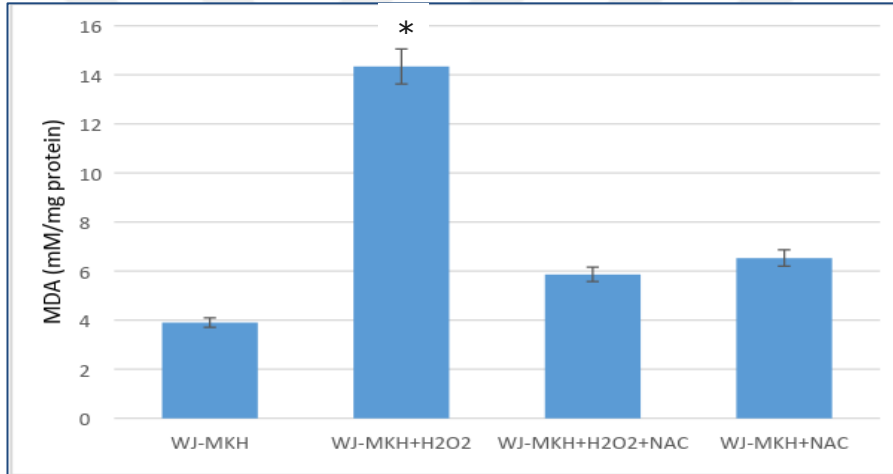


Şekil 57: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H_2O_2 uygulaması sonrası oksidatif strese bağlı total MDA miktarı (*EF+ H2O2 grubunda EF grubuna göre anlamlı yüksek $p < 0,05$ $n=6$ MDA: malondi aldehit)

EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H_2O_2 ön muamelesi sonrası uygulanan NAC molekülünün kontrol grubu ve diğer gruplara göre hücresel oksidatif stresi destekler nitelikte bir etki yarattığı gösterildi (Şekil 58). WJ-MKH grubu hücrelerinde ise 2 saatlik H_2O_2 ön muamelesi sonrası uygulanan NAC molekülünün kök hücrelerde oksidatif stresi azaltıcı yönde etki yaptığı saptandı (Şekil 59).



Şekil 58: EF grubu hücrelerinde 2 saatlik H₂O₂ uygulaması ardından antioksidan molekül muamelesi sonrası oluşan oksidatif strese bağlı total MDA miktarı (*EF+ H₂O₂+NAC grubunda EF grubuna göre anlamlı yüksek p<0,05 n=6 MDA: malondi aldehit)



Şekil 59: WJ-MKH grubu hücrelerinde 2 saatlik H₂O₂ uygulaması ardından antioksidan molekül muamelesi sonrası oluşan oksidatif strese bağlı total MDA miktarı (*WJ-MKH+ H₂O₂ grubunda WJ-MKH grubuna göre anlamlı yüksek p<0,05 n=6 MDA: malondi aldehit)

5.TARTIŞMA

Çalışmamız ile laboratuvar koşullarında insan göbek kordonu Wharton jölesinden MKH izolasyonu gerçekleştirilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Benzer şekilde elde edilen kök hücreler endotelyal progenitör hücrelere farklılaştırılmıştır. Farklılaşma sürecinden sonra MKH'lere spesifik yüzey antijenlerinde belirgin azalma olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte WJ-MKH'leri ile yapılan hem kök hücre, hem de endotelyal farklılaşma sürecine dair karakterizasyon deneylerinde birbirinden farklı oranlarda yüzey antijen ekspresyonları elde edilmiştir. Kurulan her bir deney setinde aynı deney protokolleri uygulanmasına karşın farklı sonuçların elde edilmesi farklı donörlere ait primer kök hücre kültürü çalışmasına bağlanmıştır. Kök hücre karakterizasyon çalışmalarında pek çok araştırmacının karşılaştığı bu sorun veya rejeneratif tıp uygulamalarında kısıtlayıcı faktörlerden en önemlisinin, primer kök hücrelerin uygulanan kültür koşullarına farklı yanıtlar vermesi şeklinde ifade edilmektedir [24]. Bu nedenle kök hücre uygulamalarında donör özelliklerinin gelecekteki çalışmalarla daha detaylı değerlendirilmesi gerekebilir.

Kök hücrelerdeki doğal antioksidan savunma mekanizması ve hücrel oksidatif stres düzeyi çoğunlukla denge halinde tutulmaya çalışılsa da bazı durumlarda bu denge iki taraftan birinin aleyhine olacak şekilde gelişmektedir. Ancak bu durum bazen olumsuz gibi görünse de bir takım önemli hücrel fizyolojik değişimleri tetikleyebileceği savunulmaktadır [41]. Kök hücrelerde oksidatif stresle ilgili taranan literatür bilgilerine paralel olarak, tez kapsamında kullanılan H_2O_2 'nin WJ-MKH'lerinde hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine olumsuz etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur.

Endotelyal farklılaşma sürecinde uygulanan H_2O_2 'nin hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkisinin olduğu savunulmaktadır [52]. Oksidatif stres ajanı ile yapılan ön muamelenin kök hücrelerde apoptoza karşı koruyucu olan proteinlerin ekspresyonunu ve hücre göçünü azalttığı yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur [53]. Bunun da hem WJ-MKH'lerinin hem de endotelyal farklılaşma hücrelerinin H_2O_2 'li gruplarında yaptığımız canlılık ölçümleriyle korele olduğu görüldü.

Kİ-KH' leri üzerine yapılan araştırmalarda, ROT düzeyi ve oksidatif stresin kompleks etki mekanizması bazı durumlarda paradoksal olarak görölmüştür. Diğeryandan tez içeriğinde kullanılan antioksidan moleküllerin farklılaşma ve oksidatif stres üzerine farklı etkileri olduğu anlaşılmıştır [54]. Ek olarak költür ortamında kullanılan büyüme faktörleri veya ekzojen antioksidan moleküllerin (NAC, AAP gibi) progenitör hücrelerde kendini yenileme kapasitesini desteklediğı ve hücresel oksidasyonu indirgediğı, bunun tersi olarak sinyal moleküllerinin hücrelerde oksidasyonu arttırarak farklılaşmayı hızlandırdığı belirtilmiştir [55].

Oksidatif stres metabolizmasının baskılanmasının kemik iliğı progenitör hücrelerinin endotelial hücrelere farklılaşmasını azalttığı gösterilmiştir [56]. Bununla birlikte bir antioksidan enzim olan GPx eksikliğinin anjiogenezi olumsuz yönde etkilediğı belirtilmektedir [57]. Bizim çalışmamızda oksidatif stres modeli olarak H₂O₂'nin WJ-MKH endotelial hücrelere farklılaşma sürecinde, hücre canlılığı üzerine etkisi bakılmış, hücre canlılığı ve proliferasyonunu uygulama konsantrasyonuna bağılı olarak azalttığı gösterilmiştir. GPx enzim aktivitesi, WJ-MKH'de H₂O₂ uygulaması ile belirgin olarak artırılabilirken, endotelial hücrelerde ise belirgin olarak azaltılmıştır. WJ-MKH'leri kendi kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerinde farklı stres yanıtları göstermiştir. Endotelial hücrelerde oksidatif stres ile GPx enzim aktivitesinin azalması, ileride planlanabilecek rejeneratif uygulamalarda anjiogenez açısından olumsuz bir etki olarak değeriendirilebilir.

İnsan kaynaklı indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH)'lerde, genom süreyansının iki yolla, apoptoza aşırı duyarlılık ve çok düşük DNA lezyonu birikimi ile elde edildiğı ileri sürölmektedir [58]. Gen profili ile birkaç antioksidan proteinin mRNA ekspresyonunun iPKH'lerde oldukça sıkı düzenlendiğı tespit edilmiştir. GPx-2'nin yıkılması ve glutatyonun tükenmesi, DNA lezyonlarına karşı korumanın bozulmasına neden olabilir. Bizim çalışmamızda kök hücrelerin kendi kendini yenileme sürecinden ziyade, endotelial farklılaşma sürecinde oksidatif strese daha duyarlı olup, bununla birlikte antioksidan enzim ekspresyonlarının da daha yüksek olduğı gösterilmiştir. Diğeryaraftan H₂O₂ ile oksidatif stres uyarısına karşı progenitör endotelial hücrelerde, WJ-MKH'lerine göre özellikle GPx yanıtının diğeryantioksidan enzimler olan katalaz ve

SOD'a göre daha baskın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda NaSe ve AAP uygulamasının hücrelerde SOD ve katalaz aktivitesini belirgin olarak baskıladığı gösterilmiştir [59].

Araştırmanın kısıtlılıkları bakımından farklılaştırma sürecinde oksidatif stresi göstermek için hücresel total ROT miktarının belirlenmesi basamağında arka plan sorunları yaşanması nedeniyle deney tekrar sayısı az tutularak, güvenilirliği arttırmak amacıyla ek deneyler (hücresel MDA analizi) yapıldı. Mali kısıtlamalardan dolayı RT-PZR deneylerinde de tekrar sayısı düşük tutulmak durumunda kaldı. Bu kısıtlamaları gidermek adına tezin amaç ve hedeflerine uygun olarak diğer alternatif biyokimyasal yöntemler kullanılarak elde edilen verilen desteklenmesi sağlanmıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız ile insan göbek kordonundan elde edilen MKH sınıfına giren multipotent WJ-MKH'lerin endotelial hücrelere farklılaşma sürecindeki ROT düzeylerinin ve antioksidatif enzim aktivite değişimlerinin belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca oksidatif stres üzerinde etkili olabilecek uygulamaların hücre canlılığı ve farklılaşma sürecine etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra, WJ-MKH'lerinin izolasyonu, endotelial hücrelere farklılaşması ve karakterizasyonu için uygulanabilir etkin bir protokolün kendi laboratuvar koşullarımızda oturtulması da hedeflendi.

Bu tez çalışması ile Wharton jölesinden eksplant yöntemi ile MKH'ler elde edilerek, proliferasyon kapasiteleri karşılaştırıldı. Bu hücrelerde kök hücre karakterizasyonu için CD44, CD90, CD105 gibi MKH'lere özgü yüzey antijenlerinin gen ve protein ekspresyon düzeyleri RT-PZR, İF ve akış sitometrisi yöntemleri ile gösterildi. Uluslar arası Hücresel Tedavi Derneği'nin MKH tanımlamasında minimal kriter olarak öngördüğü osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma süreci, tez kapsamında buna uygun bir kit ile denenerek hem histokimyasal hem İF yöntemle gösterildi. WJ-MKH'lerinin farklılaşması sürecinde hücresel MDA, total ROT miktarı ve antioksidan enzim aktivite düzeylerinin belirgin bir şekilde arttığı belirlendi. Ayrıca endotelial farklılaşma sırasında NAC, AAP ve NaSe uygulamasının etkileri değerlendirilerek, NAC'in hem kök hücre kendi kendini yenileme hem de farklılaşma sürecinde hücre canlılığını, diğer uygulamalara göre daha fazla arttırdığı belirlendi.

Antioksidan enzimlerin gen ekspresyon düzeyleri kantitatif PZR ile değerlendirildi. Kök hücrelerin endotelial hücre farklılaşma sürecinde oksidatif stres düzeyi ile birlikte KAT, GPx ve SOD enzimlerinin aktiviteleri ele alındığında bu süreçte en yüksek aktivite değişiminin GPx enziminde olduğu saptandı. NAC uygulamasının ise WJ-MKH'lerinde oluşan oksidatif stresi azaltıcı yönde etki yaptığı, hücre canlılığı ve proliferasyonunu arttırdığı gösterildi. Endotelial farklılaşma sürecinde ise oksidatif strese bağlı olarak oksidan aktivitenin arttığı saptandı.

Çalışmamız ile elde edilen veriler ve protokollerin, daha sonra planlanabilecek rejeneratif tıp uygulamaları kapsamındaki projeler için temel bir basamak oluşturabilecek kapasitede olduğu düşünülmektedir. Araştırmalarımız ile elde edilen sonuçların, MKH'lerin oksidatif stres koşullarına ne düzeyde bir yanıt verdiği anlaşılmaya çalışılarak, hedefe yönelik kök hücre tedavi stratejilerinin güçlendirilmesine de olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak literatür taramalarımıza göre bu tez çalışması ile ilk kez NaSe, AAP ve NAC uygulamalarının WJ-MKH'lerinin kendi kendini yenilemesi ve endotelial farklılaşma süreci üzerine etkileri değerlendirildi.



7.KAYNAKLAR

- [1] H. Abdulrazzak, D. Moschidou, G. Jones, and P. V. Guillot, "Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues," *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, no. SUPPL. 6, 2010.
- [2] C. Sancricca, "Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy," *World J. Stem Cells*, vol. 2, no. 4, p. 81, 2010.
- [3] Y. Liu and T. Ma, "Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application," *Biotechnol. Prog.*, vol. 31, no. 2, pp. 468–481, 2015.
- [4] C. M. Kolf, E. Cho, and R. S. Tuan, "Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2007.
- [5] M. J. Hoogduijn and F. J. M. F. Dor, "Mesenchymal stem cells in transplantation and tissue regeneration," *Front. Immunol.*, vol. 2, no. DEC, pp. 1–2, 2011.
- [6] I. Kalaszczynska and K. Ferdyn, "Wharton ' s Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance," vol. 2015, 2015.
- [7] J.-Y. Hsieh, H.-W. Wang, S.-J. Chang, K.-H. Liao, I.-H. Lee, W.-S. Lin, C.-H. Wu, W.-Y. Lin, and S.-M. Cheng, "Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis.," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e72604, Jan. 2013.
- [8] K. Ito and T. Suda, "Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 4, pp. 243–256, 2014.
- [9] F. Atashi, A. Modarressi, and M. S. Pepper, "The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation:

- A Review," *Stem Cells Dev.*, vol. 24, no. 10, pp. 1150–1163, 2015.
- [10] A. J. Becker, E. A. McCulloch, and J. E. Till, "Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells," *Nature*, vol. 197, no. 4866, pp. 452–454, 1963.
 - [11] VD Roobrouck, F Ulloa, and CM Verfaillie, "Self- Renawal and Differentiation Capacity of Young and Aged Stem Cells," *Exp Cell Res* , vol. 9, no. 314, pp. 1937-44, 2008.
 - [12] V. Aidinopoulou and D. G. Sampson, "An action research study from implementing the flipped classroom model in primary school history teaching and learning," *Educ. Technol. Soc.*, vol. 20, no. 1, pp. 237–247, 2017.
 - [13] F. Ulloa-Montoya, C. M. Verfaillie, and W.-S. Hu, "Culture systems for pluripotent stem cells," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, no. 1, pp. 12–27, 2005.
 - [14] J. M. Thomson, J. A., ItsKovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swierhiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts," *Science*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–1147, 1998.
 - [15] D. M. Gilbert, "The future of human embryonic stem cell research: addressing ethical conflict with responsible scientific research," *Med Sci Monit*, vol. 10, no. 5, pp. 99-103, 2004.
 - [16] J. G. Toma, M. Akhavan, K. J. L. Fernandes, F. Barnabé-Heider, A. Sadikot, D. R. Kaplan, and F. D. Miller, "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 778–784, 2001.
 - [17] L. A. Fortier, "Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications," *Vet. Surg.*, vol. 34, no. 5, pp. 415–423, 2005.
 - [18] P. Bianco, P. G. Robey, P. Bianco, and P. G. Robey, "Marrow stromal stem cells Find the latest version :," vol. 105, no. 12, pp. 1663–1668, 2000.
 - [19] L. K. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, "The Development of Fibroblast Colonies in Marrow and Spleen Cells," pp. 393–403, 1970.

- [20] A. J. Friedenstein, "A.J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept - Open Access Library," *Cell. Ther. Transplant.*, vol. 1, no. 3, pp. 35–38, 2009.
- [21] D. J. Prockop, "Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms," *Mol. Ther.*, vol. 17, no. 6, pp. 939–946, 2009.
- [22] E. Javazon, K. Beggs, and A. Flake, "Mesenchymal stem cells: paradoxes of pasaging," *Exp Hematol*, vol. 32, no. 32, pp. 414–25, 2004.
- [23] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, 1999.
- [24] R. Hass, C. Kasper, S. Bohm, and R. Jacobs, "Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC," *Cell Commun Signal*, vol. 9, no. 1, p. 12, 2011.
- [25] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, and E. M. Horwitz, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, 2006.
- [26] S. S. Kelly, C. B. S. Sola, M. de Lima, and E. Shpall, "Ex vivo expansion of cord blood," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 44, no. 10, pp. 673–681, 2009.
- [27] Giampiero La Rocca, "Novel Immunomodulatory Markers Expressed by Human WJ-MSC: an Updated Review in Regenerative and Reparative Medicine," *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 50–58, 2012.
- [28] R. R. Taghizadeh, K. J. Cetrulo, and C. L. Cetrulo, "Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications," *Placenta*, vol. 32, no. SUPPL. 4, pp. S311–S315, 2011.

- [29] R. Bukowiecki, J. Adjaye, and A. Prigione, "Mitochondrial function in pluripotent stem cells and cellular reprogramming," *Gerontology*, vol. 60, no. 2, pp. 174–182, 2014.
- [30] C. T. Chen, S. H. Hsu, and Y. H. Wei, "Mitochondrial bioenergetic function and metabolic plasticity in stem cell differentiation and cellular reprogramming," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1820, no. 5, pp. 571–576, 2012.
- [31] J. D. Ochocki and M. C. Simon, "Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells," *J. Cell Biol.*, vol. 203, no. 1, pp. 23–33, 2013.
- [32] J. Rehman, "Empowering self-renewal and differentiation: The role of mitochondria in stem cells," *J. Mol. Med.*, vol. 88, no. 10, pp. 981–986, 2010.
- [33] A. Prigione and J. Adjaye, "Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon in vitro and in vivo differentiation of human ES and iPS cells," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 54, no. 11–12, pp. 1729–1741, 2011.
- [34] C. J. Weydert and J. J. Cullen, "Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue," *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 1, pp. 51–66, 2010.
- [35] R. Vono, E. Jover Garcia, G. Spinetti, and P. Madeddu, "Oxidative Stress in Mesenchymal Stem Cell Senescence: Regulation by Coding and Noncoding RNAs," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 29, no. 9, pp. 864–879, 2017.
- [36] Y. Guo, S. Chakraborty, S. S. Rajan, R. Wang, and F. Huang, "Effects of Oxidative Stress on Mouse Embryonic Stem Cell," vol. 19, no. 9, 2010.
- [37] K. B. ung Choo, L. Tai, K. S. Hymavathee, C. Y. in Wong, P. N. guyen N. Nguyen, C. J. Huang, S. K. eng Cheong, and T. Kamarul, "Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 11, no. 11, pp. 1201–1207, 2014.
- [38] C. H. Lin, N. T. Li, H. S. Cheng, and M. L. Yen, "Oxidative stress induces imbalance of adipogenic/osteoblastic lineage commitment in mesenchymal

- stem cells through decreasing SIRT1 functions," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 22, no. 2, pp. 786–796, 2018.
- [39] W. Wang, Y. Zhang, W. Lu, and K. Liu, "Mitochondrial reactive oxygen species regulate adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells in hematopoietic stress induced by arabinosylcytosine," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–14, 2015.
- [40] S. M. S. C. Cadena, P. R. S. Brofman, D. L. Drehmer, F. Filipak Neto, C. K. Rebelatto, L. Petiz, A. P. R. Abud, A. P. Brandt, B. Dallagiovanna, and A. M. de Aguiar, "Metabolic switches during the first steps of adipogenic stem cells differentiation," *Stem Cell Res.*, vol. 17, no. 2, pp. 413–421, 2016.
- [41] S. Paliwal, A. Kakkar, R. Sharma, B. Airan, and S. Mohanty, "Differential reduction of reactive oxygen species by human tissue-specific mesenchymal stem cells from different donors under oxidative stress," *J. Biosci.*, vol. 42, no. 3, pp. 373–382, 2017.
- [42] J. M. Lü, P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen, "Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 840–860, 2010.
- [43] S. B. Nimse and D. Pal, "Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 35, pp. 27986–28006, 2015.
- [44] I. Perlman, V. Porciatti, E. C. M. Gabriel de Oliveira, Gabriel de Oliveira, Elisabete C. Moraes, Nathaniel A. Brunsell, Yosio E. Shimabukuro, Y. E. S. Nathaniel A. Brunsell, G. A. V. M. and Luiz E.O.C. Aragão, G. A. V. M. and T. V. dos Santos, T. V. dos Santos, and A. information is Ava, "We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % Control of a Proportional Hydraulic System," *Intech open*, vol. 2, p. 64, 2015.
- [45] W. Dc, Y. Jang, and S. J. Sharkis, "hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche A low level of reactive oxygen species selects for

- primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche," vol. 110, no. 8, pp. 3056–3063, 2012.
- [46] S. Shaban, M. W. A. El-Husseney, A. I. Abushouk, A. M. A. Salem, M. Mamdouh, and M. M. Abdel-Daim, "Effects of Antioxidant Supplements on the Survival and Differentiation of Stem Cells," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, 2017.
 - [47] M. A. Gimbrone, T. Nagel, and J. N. Topper, "Perspectives Series: Cell Adhesion in Vascular Biology Biomechanical Activation: an Emerging Paradigm in Endothelial Adhesion Biology," *J. Clin. Invest.*, vol. 99, no. 8, pp. 1809–1813, 1997.
 - [48] H. Redl, S. Wolbank, G. Kollwig, A. Lindenmair, S. Hennerbichler, C. Gabriel, C. Kasper, and T. Hatlapatka, "Mesenchymal Stem or Stromal Cells from Amnion and Umbilical Cord Tissue and Their Potential for Clinical Applications," *Cells*, vol. 1, no. 4, pp. 1061–1088, 2012.
 - [49] M. Crisan, "Transition of Mesenchymal Stem/Stromal Cells to Endothelial Cells," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 4, no. 95, 2013
 - [50] H. Fernandes, L. Moroni, K. Janeczek Portalska, A. Leferink, C. van Blitterswijk, J. de Boer, and N. Groen, "Endothelial Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e46842, 2012.
 - [51] Q. Ge, H. Zhang, J. Hou, L. Wan, W. Cheng, X. Wang, D. Dong, C. Chen, J. Xia, J. Guo, X. Chen, and X. Wu, "VEGF secreted by Mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms," *Mol. Med. Rep.*, vol. 17, no. 1, pp. 1667–1675, 2018.
 - [52] C. Piccoli, A. D'Aprile, M. Ripoli, R. Scrima, L. Lecce, D. Boffoli, A. Tabilio, and N. Capitanio, "Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 353, no. 4, pp. 965–972, 2007.

- [53] D. Li, Y. Xu, C. Y. Gao, and Y. P. Zhai, "Adaptive protection against damage of preconditioning human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with hydrogen peroxide," *Genet. Mol. Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 7304–7317, 2014.
- [54] S. Pervaiz, R. Taneja, and S. Ghaffari, "Oxidative Stress Regulation of Stem and Progenitor Cells," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 11, pp. 2777–2789, 2009.
- [55] M. Noble, M. Mayer-Pröschel, and C. Pröschel, "Redox Regulation of Precursor Cell Function: Insights and Paradoxes," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 7, no. 11–12, pp. 1456–1467, 2005.
- [56] S. Xu, J. Tao, L. Yang, E. Zhang, C. Boriboun, J. Zhou, T. Sun, M. Cheng, K. Huang, J. Shi, N. Dong, Q. Liu, T. C. Zhao, H. Qiu, R. A. Harris, N. S. Chandel, D. W. Losordo, and G. Qin, "E2F1 Suppresses Oxidative Metabolism and Endothelial Differentiation of Bone Marrow Progenitor Cells," *Circ. Res.*, vol. 122, no. 5, pp. 701–711, 2018.
- [57] R. Raman, R. G. Thomas, M. W. Weiner, C. R. Jack, K. Ernstrom, P. S. Aisen, P. N. Tariat, and J. F. Quinn, "Impaired Angiogenesis in Glutathione Peroxidase-1-Deficient Mice is Associated with Endothelial Progenitor Cell Dysfunction," *Circ. Res.*, vol. 98, no. 2, pp. 254–261, 2010.
- [58] B. Dannenmann, S. Lehle, D. G. Hildebrand, A. Kübler, P. Grondona, V. Schmid, K. Holzer, M. Fröschl, F. Essmann, O. Rothfuss, and K. Schulze-Osthoff, "High Glutathione and Glutathione Peroxidase-2 Levels Mediate Cell-Type-Specific DNA Damage Protection in Human Induced Pluripotent Stem Cells," *Stem Cell Reports*, vol. 4, no. 5, pp. 886–898, 2015.
- [59] A. J. Davison, A. J. Kettle, and D. J. Fatur, "Mechanism of The Inhibition of Catalase by Ascorbate. Roles of Active Oxygen Species, Copper and Semidehydroascorbate," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 3, pp. 1193–1200, 1986.

8.EKLER

8.1.Ek-1 Gönüllü Bilgilendirme Formu

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Bu form **“Wharton Jölesi Mezenkimal Kök Hücrelerinin Endotel Hücrelere Farklılaşmasında Antioksidan Moleküllerin Rolünün İncelenmesi”** başlıklı çalışmamıza katılacak gönüllüler için düzenlenmiştir.

Kök hücre, işlevsel olarak farklılaşmamış, yani vücudun herhangi bir organ ya da dokusunda özel bir görev yapabilmek için tam olarak olgunlaşmamış karmaşık bir yapısı olan öncül bir hücredir. Bununla birlikte bu öncül hücre bedenin başka hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Bu hücreler, kemik iliğinden elde edildiği gibi, göbek kordonundan da elde edilebilir. Bu araştırmada amacımız göbek kordonunu oluşturan Wharton jölesi olarak isimlendirilen dokudan kök hücre elde etmek ve elde edilen bu kök hücreleri damar hücrelerine farklılaştırmak, bu farklılaşmaya değişik moleküllerin etkisini incelemektir.

Bu projede elde edilecek yeni bilgiler, ileride, vücuttaki hasarlı bir dokunun yenilenmesi için tedavi amaçlı kullanılabilecek hücrelerin eldesinde kullanılabilecektir.

Çalışmaya normal gebelik seyri olan, sezaryen ile temrinde doğum yapan yaklaşık 18 gebe dahil edilecektir. Sezaryen ile doğumun öncesinde, izin vermeniz durumunda doğumun ardından atılan göbek kordonu alınarak içerisindeki doku kök hücre analizleri için kullanılacaktır. Sonuçlar hiçbir şekilde sizin ve bebeğinizin tedavisini, gebeliğin seyrini ve bakımını etkilemeyecektir. Gönüllülerin uygulama sırasında karşılaşılabileceği rahatsızlıklar ve riskler yoktur.

Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Her iki durumda da tedavinin olağan süreci devam edecektir. Araştırma giderleri, hasta veya sosyal güvenlik kurumuna hiçbir şekilde yüklenmeyecektir.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra, ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşamayacaktır. Talebiniz halinde analiz sonuçlarınız sizinle paylaşılabilir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı-Soyadı:

Tarih:

İmza:

**Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş
Görevlisinin;**

Adı-Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının;

Adı-Soyadı:

Tel:

Tarih:

İmza:

8.2.Ek-2 Etik Kurul Onayı

Karar No:2016/29-18		Tarih:17.11.2016			
KARAR BİLGİLERİ		Prof.Dr.Kemal BAYSAL'ın sorumluluğu olduğu "Wharton Jölesi Mezenchimal Kök Hücrelerinin Endotel Hücrelere Farklılaşmasında Antioksidan Moleküllerin Rolünün İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amacı, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			
ÇALIŞMA ESASI		ETİK KURUL BİLGİLERİ			
		Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönetgesi İşy Klinik Uygulamaları Kılavuzu			
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Ş.Reyhan</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>N.Ş.</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Vesile</i>
Prof.Dr.Sevine ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmış</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmış</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÖTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmış</i>
Prof.Dr.Bülge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Bülge</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Müge</i>
Doç.Dr.Şeyda SEREN İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmış</i>
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>S.K.</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>S.Ö.</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katılmış</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	<i>M.Ö.</i>

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

8.3.Ek-3 Özgeçmiş



ÖZGE TEZCAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası: 57076331484

Doğum Tarihi: 07/06/1990

İletişim Adresi: Emirbeyazıt Mah. Hasan Ali Yücel Cad. Mehmet Ali Eren
Sts. B Blok No:12 Muğla/Menteşe

Telefon: (538) 2968263

E-posta: ozge48ege@gmail.com

Web Adresi

Eğitim Bilgileri

03 Eylül 2015 - Şu Anda (3 yıl 7 ay)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL
ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ, BİYOKİMYA (YL) (TEZLİ)

Diploma Numarası -

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.37 / 4.0

13 Eylül 2012 - 02 Eylül 2017 (5 yıl)
Yüksek Lisans Tezli Program, EGE ÜNİVERSİTESİ,
TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, KÖK HÜCRE (YL)
Diploma Numarası –

4 Eylül 2007 – 20 Haziran 2012 (4 yıl 10 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ, BİYOLOJİ PR. (İÖ)
Diploma Numarası: 2011/04/0129
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.27/4.0

Yabancı Dil Bilgileri

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

Bildiriler

R. U. BORA, P. AKAN, Ö. TEZCAN, T. İBAN & K. BAYSAL,
Conditioned Medium From Wharton's Jelly Mesenchymal
Stem Cells Increased The Viability Shsy 5y Cells, Poster
Sunumu, 11th Fens Forum Of Neuroscience, 07 Temmuz
2018, 11 Temmuz 2018.

Ö.TEZCAN, R.U.BORA, P.AKAN, D.ÖZTEKİN & K.BAYSAL,
Characterization Of Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells
From The Human Umbilical Cord And Investigation Of The
Role Of Cellular Metabolism On Their In Vitro
Differentiation, Poster Sunumu, The 41nd Febs Congress,
03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016, 283, S1, 1 - 441.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

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

