

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN GÖBEK KORDON VENİ CD146+ HÜCRELERİN VE BU
HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN MATRİKS PROTEİNLERİNİN
İN VİTRO BİYOFİLM MODELLERİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nur Kübra ÇANKIRILI

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2019

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN GÖBEK KORDON VENİ CD146+ HÜCRELERİN VE BU
HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN MATRİKS PROTEİNLERİNİN
İN VİTRO BİYOFİLM MODELLERİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nur Kübra ÇANKIRILI

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTIK**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğretim Üyesi Didem KART**

**ANKARA
2019**

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


**İnsan Göbek Kordon Veni CD146+ Hücrelerin ve Bu Hücrelerden Elde Edilen
Matriks Proteinlerinin *in vitro* Biyofilm Modellerinde Değerlendirilmesi**


Nur Kübra ÇANKIRILI


Danışman: Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK


İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Didem KART


Bu tez çalışması 20.08.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Ayşen (GÜNEL) ÖZCAN 
Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK 
Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR 
Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üy. Z. Ekim TAŞKIRAN 
Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye: Dr. Öğr. Üy. Müjde (YÜCE) ERYILMAZ 
Ankara Üniversitesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

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

02 Eylül 2019

Prof. Dr. Diclehan Orhan


Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- X** Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

09/09/2019

Nur Kübra ÇANKIRILI



ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü** üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü** üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı** ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin uygun görüşü** üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü** üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

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

Nur Kübra ÇANKIRILI



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yakın ilgi, destek ve yönlendirmelerini benden esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK' a saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda bu süreçte, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları' ndan yararlanmamı sağlayan yardımcı danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Didem KART' a çalışmalarına katkılarından dolayı sevgi ve şükranlarımı sunarım. Tez süresi boyunca eğitimime katkı sağlayan Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı' ndaki saygıdeğer hocalarıma, idari personele ve bu süreci birlikte paylaştığımız bölümdeki bütün arkadaşlarıma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürlerimin en büyüğünü, hayatımın her anında maddi ve manevi desteğini benden bir an dahi esirgemeyen, eğitim sürecim boyunca her türlü sıkıntıda yanımda olan sevgili annem Sevil ÇANKIRILI' ya, sevgili babam Ertuğrul ÇANKIRILI' ya ve benimle birlikte tez yazma sürecini paylaşan sevgili ablam Merve SERTESEN' e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmayı, hayatımın her alanında sevgisini ve her türlü desteğini hissettiğim sevgili aileme ithaf ediyorum.

Bu tez çalışması kapsamında verdikleri maddi destekten dolayı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne (Proje No: TYL-2019-17802) ve proteom analizlerindeki yardımlarından dolayı Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi Proteomiks Laboratuvarı' na teşekkür ederiz.

ÖZET

Çankırılı, N.K., İnsan Göbek Kordon Veni CD146+ Hücrelerin ve Bu Hücrelerden Elde Edilen Matriks Proteinlerinin *In Vitro* Biyofilm Modellerinde Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019. Yaraların tedavilerinde antimikrobiyal etkileri olan hücrelerin veya hücrelerden arındırılmış deselülerize matrikslerin yara bölgesine uygulanması son yıllarda dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, antimikrobiyal etkiye sahip olabileceği düşünülen CD146+ kök hücrelerin ve bu hücrelerden elde edilen ekstraselüler matriks proteinlerinin (deselülerize matriks) *in vitro* biyofilm modellerinde değerlendirilmesidir. Bu tez çalışması kapsamında, CD146+ kök hücrelerin karakterizasyonu; hücre yüzey belirteçlerinin tayini ve farklılaşma analizleriyle, deselülerize matriksin karakterizasyonu; histolojik/immünfloresan boyamalar ve proteom analizleri ile belirlendi. CD146+ kök hücrelerin, biyofilm oluşumuna katkısını gözlemleyebilmek için, *Pseudomonas (P.) aeruginosa* ve *Staphylococcus (S.) aureus* bakterileri ile ko-kültürleri yapılarak hücre canlılık ve proliferasyonları WST-1, *Annexin V/PI* ve kristal viyole ile değerlendirildi. Aynı zamanda CD146+ kök hücrelerin, olası antimikrobiyal etkilerinin gözlemlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı. CD146+ kök hücrelerin ve deselülerize matriks proteinlerinin biyofilm oluşumuna etkileri damlamalı akış modelinde test edilerek biyofilm oluşumunda görev alan genlerin ekspresyon seviyeleri kantitatif reverse transkriptaz-PZR yöntemiyle belirlendi. Elde edilen veriler sonucunda; CD146/105+ kök hücrelerin adipojenik yönde farklılaşabildiği ancak osteojenik farklılaşma kapasitelerinin bulunmadığı saptandı. Deselülerize matriks karakterizasyonu, DAPI ve Masson-Trikrom boyamaları ile tayin edildikten sonra proteom analizleriyle matriks bileşenlerinde kollajen, glikoprotein, proteoglikan ve büyüme faktörleri saptandı. Bakteri + hücreli/deselülerize kültürlerde, bakterilerin proliferasyonlarını arttırdıkları gözlemlendi. *P. aeruginosa* ve *S. aureus* kullanılarak tasarlanan biyofilm modelinde, deselülerize yapının *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu anlamlı olarak azalttığı, *S. aureus* için ise hücreli gruba kıyasla deselülerize grupta anlamlı bir fark bulunmadığı belirlendi. Gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre, *P. aeruginosa* biyofilm ile ilişkili genlerden *rhlR* ve *LasR* için anlamlı azalmı saptanmış olup, bu biyofilm hücre sayım sonuçlarını destekler niteliktedir. *S. aureus*' un tutunma genleri olan *icaADBC* genlerinin hepsi deselülerize grupta yüksek oranda eksprese edilmiştir. Bu tez çalışması, hedeflenen amaç doğrultusunda insan kaynaklı fetal kök hücrelerin ve onlardan elde edilen matriks proteinlerinin klinik uygulamalarda önemini ortaya koyan ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler : CD146+ hücreler, kök hücreler, biyofilm, ekstraselüler matriks proteinleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, göbek kordonu.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde verdikleri maddi destekten ötürü Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne (Proje No: TYL-2019-17802) teşekkür ederiz.

ABSTRACT

Çankırılı, N.K, **Evaluation Of Human Umbilical Cord Vein CD146+ Cells and Matrix Proteins Obtained from These Cells on *In Vitro* Biofilm Models, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Master of Stem Cell Sciences, Ankara, 2019.** In the treatment of wounds, the application of cells or decellularized matrices with antimicrobial effects to the wound area has attracted attention in recent years. The aim of this thesis is to evaluate CD146+ stem cells and extracellular matrix proteins derived from these cells (decellularized matrix) which are thought to have antimicrobial effect in *in vitro* biofilm models. In this thesis, the characterization of CD146+ stem cells was evaluated by determination of cell surface markers and differentiation analyzes and characterization of decellularized matrix was done with histological/immunofluorescence staining and proteome analysis. To observe the contribution of CD146+ stem cells to biofilm formation, cell viability and proliferation were evaluated by WST-1, Annexin V/PI and crystal violet by co-culture with *Pseudomonas* (P.) *aeruginosa* and *Staphylococcus* (S.) *aureus* bacteria. Disc diffusion method was also used to observe possible antimicrobial effects of CD146+ stem cells. The effects of CD146+ stem cells and decellularized matrix proteins on biofilm formation were tested in a drip flow model and expression levels of the genes involved in biofilm formation were determined by quantitative reverse transcriptase-PCR method. As a result of the data obtained; it was determined that CD146/105+ stem cells could differentiate in adipogenic direction but they did not have osteogenic differentiation capacity. The characterization of the decellularized matrix was determined by DAPI and Masson' s Trichrome staining, followed by proteome analysis to identify collagen, glycoproteins, proteoglycan and growth factors as matrix components. *P. aeruginosa* and *S. aureus* bacteria increased their proliferation capacity when they were cultured in stem cells and decellularized matrices. In the designed biofilm model by using *P. aeruginosa* and *S. aureus*, it was determined that the decellularized matrices significantly reduced the formation of *P. aeruginosa* biofilm, but there were no significant differences with *S. aureus* in the decellularized group compared to the cellular group. According to the results of gene expression analysis, significant decrease was found for *rhlR* and *LasR* among *P. aeruginosa* biofilm related genes that supports cell counting results. All of the *icaADBC* genes, which are the attachment genes of *S. aureus*, were highly expressed in the decellularized group. This thesis is the first study that demonstrates the importance of human stem cells and matrix proteins obtained from them, for clinical applications.

Key words: CD146+ cells, stem cells, biofilms, extracellular matrix proteins, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, umbilical cord.

We thank Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TYL-2019-17802) for their financial support in the realization of this thesis.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Derinin Yapısı ve Özellikleri	5
2.2. Yara Oluşumu	6
2.2.1. Kronik Yaralar	7
2.2.2. Yara Mikroçevresi ve Mikroorganizmalar	7
2.3. Biyofilmlerin Oluşturulması	8
2.3.1. Damlamalı Akış Reaktör Sistemi	15
2.3.2. Biyofilmler, Yaralar ve Tedavi Yöntemleri	17
2.4. Mezenkimal Kök Hücreler	19
2.4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Antimikrobiyal Özellikleri	21
2.5. CD146+ Kök Hücreler	23
2.6. Ekstraselüler Matriks, Doku Mühendisliği Uygulamaları ve Deselüerizasyon İşlemi	25
2.6.1. Ekstraselüler Matriks Yapısı	25
2.6.2. Doku Mühendisliği Uygulamaları	26
2.6.3. Deselüerizasyon İşlemi	26
2.6.4. Deselüerize Yapı İskeleleri ve Kullanım Alanları	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. CD146+ Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu	32
3.1.1. Akım Sitometri ile CD146+ Hücrelerin Yüzey Belirteç Analizi	33

3.1.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşma Kapasiteleri	34
3.2. Deselülerizasyon İşlemi ve Ekstraselüler Matriks Karakterizasyonu	35
3.2.1. Histolojik Boyama	35
3.2.2. İmmünfloresan Boyama	36
3.2.3. Deselülerize Matriks Yapısındaki Proteinlerin Tayini-Proteom Analizi	36
3.3. CD146+ Kök Hücreler ve Ekstraselüler Matriks-Bakteri Ko-Kültürü	37
3.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi – Disk Difüzyon Testi	38
3.5. Biyofilm Yöntemi	39
3.5.1. Bakteriyel İnokulum Hazırlanması	39
3.5.2. Sürekli Damlamalı Akış Biyofilm Reaktörü Kullanılarak Dinamik Ortamda Biyofilm Modellerinin Geliştirilmesi	39
3.5.3. Koloni Sayımı	40
3.6. Biyofilm ile İlişkili Genlerin mRNA Seviyelerinin Ölçülmesi	40
3.6.1. Biyofilmlerden Total RNA Ekstraksiyonu	40
3.6.2. cDNA sentezi ve Kantitatif Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	41
3.6.3. cDNA' ların Real-Time PZR Yöntemi Kullanılarak Çoğaltılması	41
3.7. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi	43
3.8. Verilerin Analizi	43
4. BULGULAR	44
4.1. CD146+ Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu	44
4.1.1. Akım Sitometri ile CD146+ Kök Hücrelerin Yüzey Belirteç Analizi	44
4.1.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşma Kapasiteleri	45
4.2. Hücre Kültürü Sonrası Ekstraselüler Matriks Üretimi ve Deselülerizasyon İşlemi	46
4.2.1. Deselülerizasyon İşlemi ve Ekstraselüler Matriks Protein Karakterizasyonu	46
4.2.2. Deselülerize Matriks Yapısındaki Proteinlerin Tayini-Proteom Analizi	48
4.3. CD146+ Kök Hücreler ve Deselülerize Matriks - Bakteri Ko-Kültürü	50
4.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	53
4.5. Biyofilmlerin Oluşturulması	54
4.6. <i>S.aureus</i> ve <i>P.aeruginosa</i> ' da Biyofilm ile İlişkili Genlerin İfadesi	55

4.7. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi	57
4.7.1. Hücreli ve Deselülerize Gruplarda Oluşturulan Olgun Biyofilmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	67
8. EKLER	
EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
EK-3. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK-4. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMP	Antimikrobiyal peptit
APC	Allofikosiyanin
aprA	Alkalın protez
ASTM	American Society for Testing and Materials
bFGF	Bazık fibroblast büyüme faktörü
BSA	Bovine serum albumin
c-di-GMP	Siklik - dimerik-guanosin monofosfat
DADM	Denatüre aselüler dermal matriks
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid
DMEM-HG	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose</i>
DNaz-1	Deoksiribonükleaz-1
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGTA	Etilen glikol tetra asetik asit
EMP	Ekstraselüler matriks proteini
FACS	Floresan aktive hücre ayırma
FBS	Sığır serum albümin
FITC	Fluorescein-5-İzosiyonat
FnBP	Fibronektin bağlayıcı protein
GAG	Glikozaminoglikan
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
Kİ-MKH	Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri
lasA	las A proteaz
lasB	Elastaz B
MACs	Manyetik aktive hücre ayırma
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyonu
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MKH	Mezenkimal kök hücre
MMP	Matriks metallopreoteinaz
PBS	Fosfat tamponu

PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PerCP	Peridinin klorofil proteini
PGM	Perisit büyüme besiyeri
PIA	Polisakkarit hücreler arası adezin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SASS	Kendinden montajlı deri eşdeğerleri
SDF-1	Stromal hücre kaynaklı faktör-1
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TIMPs	Metalloproteinazların doku inhibitörü
toxA	Ekzotoksin A
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
α-SMA	Düz kas alfa aktin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
1.1.	CD146+ kök hücrelerin karakterizasyonu	3
1.2.	Deselülerizasyon işlemi ve ekstraselüler matriks karakterizasyonu	3
1.3.	CD146+ kök hücreler ve bu hücrelerden elden edilen EMP' lerin <i>in vitro</i> kültür modellerinde değerlendirilmesi	4
2.1.	Derinin katmanları	6
2.2.	Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin hücre duvar yapıları	9
2.3.	Biyofilm oluşum basamakları	11
2.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ' nın yüzeye tutunma sırasında geliştirdiği fimbrial iplikçik oluşumu	12
2.5.	<i>S. aureus</i> ' un hücrelere tutunma mekanizması. A) FnBP izoform yapısı. B) Tutunma esnasında kullanılan sinyal yolakları	14
2.6.	Damlamalı sıvı akış reaktör sistemi. A) Kapalı sisteme genel bakış. B) Materyalin koyulduğu bölme sistemi	17
2.7.	Deselülerize ekstraselüler matrikslerin eldesi ve klinik kullanımı	30
3.1.	CD146+ hücrelerin insan göbek kordonundan enzimatik yıkım ile izole edilmesi. A) Göbek kordonu parçalarının <i>Wharton Jelly</i> ve arterlerden uzaklaştırılması. B) Ven parçalarının iki ucunun ameliyat ipliği ile bağlanması. C) Ven parçalarının kollajenaz ile 18 saat inkübe edilmesi	33
4.1.	İnsan göbek kordon veni CD146+ kök hücrelerin PGM besiyeri ile kültürleri 7.gün morfolojik görüntüleri	44
4.2.	Pasaj üçteki CD146+ kök hücrelerin akım sitometri ile hücre yüzey belirteçlerinin tayini. A) İzotipler. B) CD146, CD105, CD31 ifade eden hücreler. C) CD45, CD38, CD34 ifade eden hücreler.	45
4.3.	İnsan göbek kordon veni CD146+ kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin <i>Oil Red-O</i> ve Alizarin Kırmızısı boyama metodlarıyla belirlenmesi	46
4.4.	CD146+ kök hücreli ve deselülerize gruplarda Masson-Trikrom boyaması	47
4.5.	CD146+ kök hücreli ve deselülerize gruplarda DAPI boyaması	47
4.6.	Hücre proliferasyon analizi	51
4.7.	CD146+ kök hücre + <i>S. aureus</i> ve CD146+ kök hücre + <i>P. aeruginosa</i> gruplarında kristal viyole boyaması	51
4.8.	Deselülerize matriks + <i>S. aureus</i> ve deselülerize matriks + <i>P. aeruginosa</i> gruplarında kristal viyole boyaması	52
4.9.	CD146+ kök hücre ve bakteri ko-kültürlerinde Annexin V/PI boyaması	52
4.10.	Deselülerize gruplarda Annexin V/PI boyaması	53

- 4.11.** CD146+ kök hücre *conditioned* medyumları ile antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi 54
- 4.12.** Damlamalı akış reaktör sistemi kullanılarak oluşturulan biyofilmlerin CD146+ kök hücreler ve deselülerize gruplar üzerindeki etkileri 55
- 4.13.** Hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde oluşturulan biyofilm modelinde *P. aeruginosa* biyofilm ile ilişkili genlerin mRNA seviyelerinin kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile ölçülmesi 56
- 4.14.** Hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde oluşturulan biyofilm modelinde *S. aureus* biyofilm ile ilişkili genlerin mRNA seviyelerinin kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile ölçülmesi 57
- 4.15.** CD146+ kök hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde *P. aeruginosa* ve *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 58

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin özellikleri	9
2.2.	Deselülerizasyon yöntemleri	28
3.1.	Hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde gerçekleştirilen proliferasyon analizleri	37
3.2.	<i>S. aureus</i> için kullanılan primer dizileri	42
3.3.	<i>P. aeruginosa</i> için kullanılan primer dizileri	42
4.1.	Deselülerize matriks yapısındaki proteinlerin proteom analizleri	49

1. GİRİŞ

En büyük koruyucu organ olan deri, iç ortam ile dış ortam arasındaki mikrobiyal, kimyasal ve termal tehlikelere karşı bir bariyer görevi görerek vücudu koruma altına alır [1]. Yanma, kimyasal hasar, yatak yaraları, enfeksiyon durumları ve ülser gibi çeşitli sebeplerden dolayı deride yaralar meydana gelmektedir [2]. Yara iyileşmesi; inflamasyon/homeostaz, re-epitelizasyon ve yara bölgesinin yeniden yapılanması aşamalarını kapsayan dinamik süreçlerden meydana gelmektedir. Yara iyileşmesi sürecindeki uzun süren inflamatuvar faz, yavaşlayan hücre proliferasyonu ve yetersiz re-epitelizasyon kronik yaraların oluşmasına neden olmaktadır. Kronik yara durumuna ilerleyişin altında yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılması, yara tedavilerinin geliştirilerek daha kısa sürede ve etkili bir sonuca ulaşılmasına olanak sağlayacaktır. Yara tedavilerinde geleneksel tedaviler olarak, otolog deri greftleri, allojenik deri nakli ve çeşitli sentetik iskeleler kullanılmaktadır [3]. Ancak bu yöntemlerin immünolojik red, donör eksikliği ve hastalık taşıma gibi sınırlamalardan dolayı kullanımı kısıtlıdır [4]. Bu nedenle, dokuya özgü farklılaşma yeteneği ve diğer hücre gruplarına kıyasla kolay ulaşılabilir olan, yara bölgesinde rejeneratif ve immünmodulatuvar özellikler gösteren Mezenkimal Kök Hücre' ler (MKH), hücre tedavilerde dikkat çeken bir hücre grubu haline gelmiştir [5].

Mezoderm kökenli MKH' ler, kendilerini yenileme, adiposit, osteosit ve kondrositlere farklılaşma yetenekleri olan işsi, fibroblast benzeri hücrelerdir [6]. MKH' ler, yara iyileşmesi sırasında granülasyon dokusu ve ekstraselüler matriks (hücre dışı matriks) oluşumuna katkı sağlayarak süreci hızlandırıcı bir etki gösterirler [7]. Ekstraselüler matriks yapısı tüm doku ve organların yapısında bulunan, hücreler ve mikro çevreleri arasında iletişim kurulmasına olanak sağlayan ve herhangi bir yara durumunda yeniden modellemeyi destekleyerek mikroçevrenin düzenlenmesinde görev alan ağsı yapıdaki bir ara maddedir [8]. MKH' lerin antimikrobiyal etkileri, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) kaynaklı yara enfeksiyon modellerinde çalışılmıştır [9, 10]. Ancak MKH' lerin atası olarak bilinen CD146+ kök hücrelerin antimikrobiyal etkileri ile ilgili literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Kan damarlarını çevreleyen vaskülarize dokularda bulunan perisit olarak da adlandırılan CD146+ kök hücreler, büyük çekirdekli, dar sitoplazmalı fibroblast benzeri hücrelerdir ve plasenta, göbek

kordonu ve kemik iliği gibi kaynaklardan elde edilmektedirler [11]. CD146+ kök hücrelerin, CD73, CD90, CD105 hücre yüzey belirteçlerine ve aynı zamanda multipotansiyel farklılaşma yeteneklerine sahip olmaları nedeniyle MKH'lerin *in vivo* eş değerleri olduğu varsayılmaktadır [12]. CD146+ kök hücrelerin sentezledikleri ekstraselüler matriks proteinleri (EMP) ile ilgili yapılan bir çalışmada, ekstraselüler matriksin yapısında kollajen, glikozaminoglikan (GAG), proteoglikan ve inflamasyon proteinlerinin varlığı ortaya koyulmuştur [13]. Son yıllarda, hücrelerin deselülerize edilmesi ile elde edilen EMP bazlı doğal iskelelerin, yara bölgesine uygulanması ile ilgili çalışmalar hız kazanmış durumdadır [14-16]. Deselülerizasyon işlemiyle, hücrelerin salgıladıkları kollajen, fibronektin, elastin, GAG gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin korunarak maksimum oranda hücrenin uzaklaştırılması amaçlanır [17]. Deselülerize iskeleler, ekstraselüler matriks ile yerleşik hücre popülasyonları arasındaki etkileşimi korur ve yara iyileşmesine destek sağlayan ekstraselüler matriks yapısının yenilenmesine olanak sağlayarak yara iyileşmesi sürecine katkıda bulunurlar [18]. Bunlara ek olarak, mikro çevreyi destekleyen hücrelerden arındırılmış deselülerize iskeleler ve üzerlerinde geliştirilen kök hücre birliktelikleri yara rejenerasyonunda etkili bir tedavi yöntemi olarak dikkat çekmektedir [19]. Deselülerize iskele ile kombine edilmiş insan göbek kordonu CD146+ kök hücreleri diyabetik fare yara modelinde yara bölgesine uygulanmış ve bu birlikteliğin farede re-epitelizasyonu arttırarak yara iyileşmesini desteklediği bulunmuştur [20].

Bu yüksek lisans tezi kapsamında, insan göbek kordonundan elde edilen, antimikrobiyal etkiye sahip olabilecek CD146+ kök hücrelerin ve bu hücrelerden elde edilen ekstraselüler matriks proteinlerinin *in vitro* biyofilm modellerinde değerlendirilmesi amacıyla aşağıdaki hipotezler kurulmuş ve test edilmiştir.

Hipotez 1. İnsan göbek kordonundan elde edilen CD146+ kök hücreler deselülerize edilerek ekstraselüler matriks proteinleri elde edilebilir ve bu hücrelerin antimikrobiyal etkileri olabilir.

Hedefler

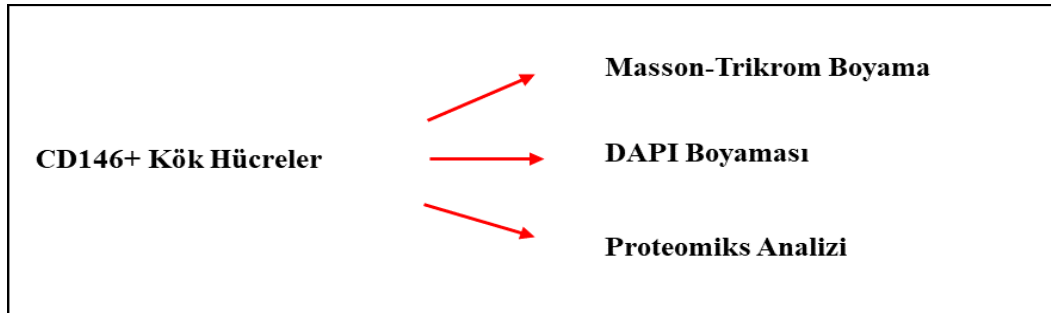
- CD146+ kök hücre kültürü ve karakterizasyonu
- CD146+ kök hücrelerin deselülerizasyonu
- CD146+ kök hücrelerin antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi

Hipotez 2. Yaralardan sıklıkla izole edilen *P. aeruginosa* ve *S. aureus* standart ATCC suşları, CD146+ kök hücreler ve deselülerize ekstraselüler matriks yapıları üzerinde biyofilm oluşturabilir.

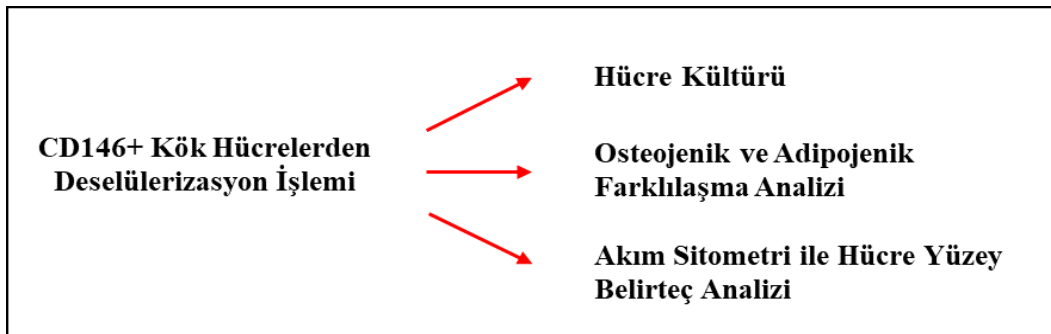
Hedefler

- *P. aeruginosa* ve *S. aureus* ATCC suşlarının CD146+ kök hücreler ile ko-kültürü ve hücre-hücre etkileşimlerinin değerlendirilmesi,
- Damlamalı akış reaktör sistemi kullanılarak CD146+ kök hücrelerin ve deselülerize matriksin üzerinde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi.

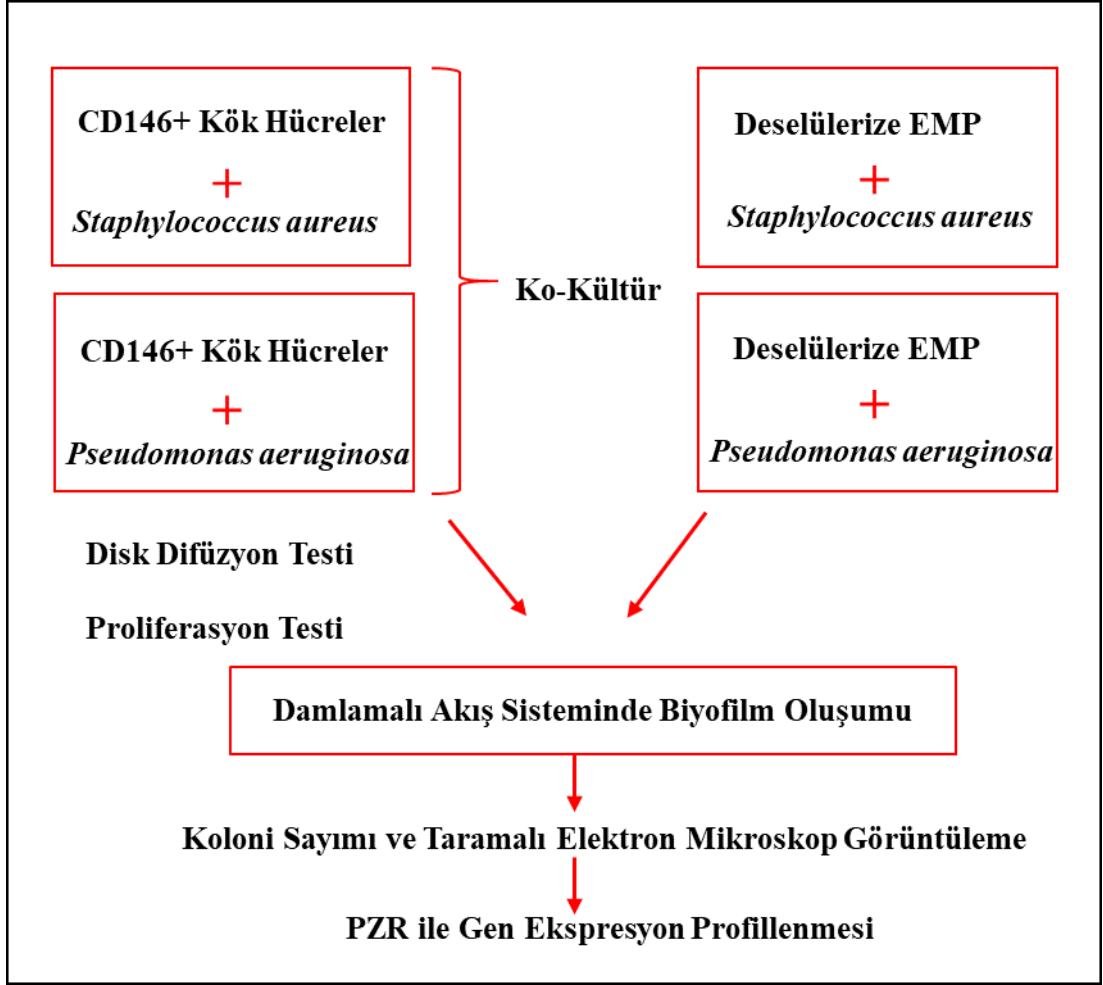
Bu hipotezlerin test edilmesi amacıyla kullanılan insan göbek kordonu kaynaklı kök hücre örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu' nun "GO 18/446-22" no' lu Hacettepe Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan komplikasyon gelişmeyen, normal gelişim sürecini tamamlamış sezaryen doğum sonrası bebeklerden elde edildi (n=3). Hipotezlerin test edilmesi amacıyla yapılan çalışmalar aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 1.1-1.3).



Şekil 1.1. CD146+ kök hücrelerin karakterizasyonu.



Şekil 1.2. Deselülerizasyon işlemi ve ekstraselüler matriks karakterizasyonu.



Şekil 1.3. CD146+ kök hücreler ve bu hücrelerden elden edilen EMP' lerin *in vitro* kültür modellerinde değerlendirilmesi.

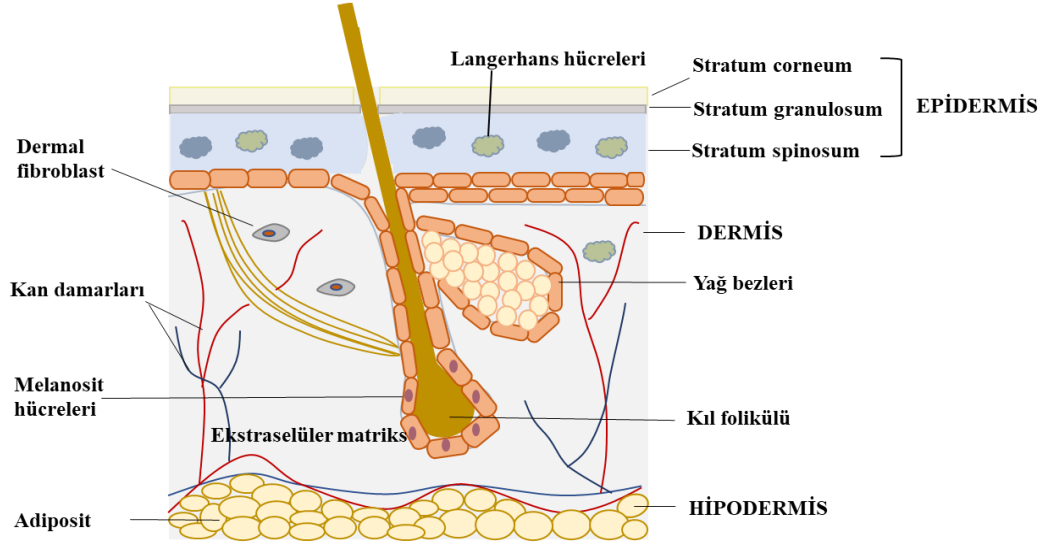
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Yapısı ve Özellikleri

Deri, insan vücudunu kaplayan en büyük organdır ve insan vücudu ile çevre arasında koruyucu bir bariyer görevi görerek vücudu patojenlere karşı korur [21]. Bununla birlikte, mikrobiyal, termal, mekanik ve kimyasal etkilerin tehdidi altındadır. İnsan derisi temel olarak, epidermis, dermis ve hipodermis de denilen dermo-epidermal tabakadan oluşmaktadır [22]. Derinin dış tabakasını oluşturan epidermis, cildin su kaybını önleyen, vücudu bakteri, virüs ve parazit enfeksiyonlarından koruyan aynı zamanda mekanik yaralanmalara karşı direnç sağlayan önemli bir tabakasıdır. Epidermis tabakasındaki ana hücre grubu keratinositlerdir. Keratinositler, bazal tabakadan epidermis tabakasına doğru göç ettikleri esnada katmanlar dizisi oluştururlar. Bu katmanlar yukarıdan aşağıya doğru; *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* ve bazal tabaka olarak sıralanmaktadır (Şekil 2.1). Epidermis tabakasında bulunan diğer hücreler, melanositler, merkel hücreleri ve langerhans hücreleri gibi immün sistem hücreleridir. Dermis olarak adlandırılan ikinci kısım ise, kollajen, elastin ve diğer yapısal moleküllerin yapımında rol alan dermisin ana hücre grubunu oluşturan fibroblastlardan meydana gelmektedir. Dermis, fiziksel ve işlevsel olarak iki katmandan oluşur. Bunlar; *stratum papillare* ve *stratum reticulare*’ dir. Dermis, mekanik yaralanmalara karşı yapısal destek sağlamasının yanında, hücreler ve ekstraselüler matriks arasındaki dinamik etkileşimi ve hücre davranışını etkileyerek hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynar [23]. Yağ hücrelerinin bulunduğu tabaka olan hipodermis ise, kas dokusu ile deri katmanlarını birbirinden ayırmaktadır.

Derinin en önemli özelliklerinden biri, ufak çaplı yaralanmalarda kendi kendini yenileyebilme yeteneğinin olmasıdır [5]. Derideki bozukluklar, yanıklar, kronik ülserler cildin orijinal şeklini ve fonksiyonunu bozarak yara oluşumuna sebep olur. Deride bir hasarın meydana gelmesiyle birlikte, büyüme faktörleri ve sitokinler salınarak yara iyileşmesi sürecini başlatırlar. Normal yara iyileşmesi sürecindeki bir aksaklık, büyük çaplı yanıklar, kapanmayan diyabetik yaralar gibi epidermis ve dermisi etkileyen tam kalınlıktaki yaralarda deri kendini yenileyememektedir. Bu

noktada, yara oluşumu ve iyileşmesi süreçlerindeki mekanizmaların iyi anlaşılması uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.



Şekil 2.1. Derinin katmanları [24].

2.2. Yara Oluşumu

Deri yaraları, fiziksel bir hasar, akut travma, genetik faktörler ve yanık vb. gibi çeşitli nedenlerden dolayı deri bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanan travmatik bir durumdur. Yara iyileşmesiyle, hasar gören dokunun bütünlüğünün sağlanması, homeostatik dengenin yeniden kurulması ve fizyolojik stabilitenin sağlanması hedeflenmektedir [25]. Yara iyileşmesi süreci; 1) inflamasyon ve homeostaz, 2) re-epitelizasyon, 3) dokunun yeniden modellenmesi olmak üzere üç temel aşamadan oluşmaktadır. Yaralanma sonrasında, yara bölgesinde bulunan nötrofil ve mast hücreleri, vazodilatasyonu sağlayarak ilk inflamatuvar yanıtı oluştururlar [26]. İnflamatuvar faz esnasında, yara bölgesi geçici bir matriks görevi gören fibrin ile kapatılır, dolaşımdaki bağışıklık hücreleri tarafından ölü doku temizlenir ve böylece enfeksiyon önlenmiş olur [26]. Yara bölgesindeki fibroblastlardan köken alan miyofibroblastlar, yara bölgesinde kasılma başlatarak bazal keratinositlerin yüzey tabakasına doğru göç etmelerini ve terminal farklılaşmalarını sağlar [27, 28]. Aynı

zamanda, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) gibi sinyaller ile fibroblastların ve keratinositlerin yara bölgesine göçü sağlanır. Çoğalan fibroblastlar, granülasyon dokusunu oluşturmak için kollajen tip I ve kollajen tip III salgılayarak anjiyojenezi desteklerler. Bu süreçte fibronektin, laminin ve ekstraselüler matriks proteinlerinin de salınımı artar. Son adımda ise fibroblastlar ve keratinositler, yeniden modellemeyi indüklemek amacıyla bozuk ekstraselüler matrisi parçalayan matriks metalloproteinazları (MMP) salgırlar. Ekstraselüler matriksin parçalanması ile açığa çıkan bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi çözünür büyüme faktörleri, yara iyileşmesini hızlandıran biyomoleküllerin aktive olmasını sağlar [29].

2.2.1. Kronik Yaralar

Uzun sürede iyileşme gösteren ya da iyileşemeyen kronik yaralar, uzun inflamatuvar faz, gecikmiş hücre proliferasyonu, epigenetik değişiklikler, zayıf re-epitelizasyon ve bozulmuş anjiyojenez ile karakterizedir [30]. Kronik yaralar; tam kalınlıktaki yaralar, bacak ülserleri, yatak yaraları ve diyabetik yaralar gibi çeşitli yara tiplerini kapsamaktadır. Olağan süresinde iyileşen yaralarda bulunan nötrofillerin etkileri, yaralanmadan itibaren üç gün içinde azalmaya başlar. Ancak kronik yaralarda, nötrofil aktivasyonu sürekli olarak devam eder ve bu da MMP artışına sebep olur. MMP seviyesindeki bu artış, doku inhibitörünün görevini yerine getirememesine neden olarak bozulmanın artışına sebep olur [31]. Böylece, iyileşmeyi hızlandıracak olan matriks birikimi engellenecek ve matriks kaynaklı büyüme faktörlerinin salınımının azalmasıyla birlikte yaranın kronikleşme sürecine girişi gerçekleşecektir [31]. Kronikleşme sürecine gidişin sebepleri tam olarak anlaşılacakla birlikte, sürekli inflamasyon hali ve bakteriyel enfeksiyonlar gibi olumsuzluklardan dolayı yara iyileşme sürecini başarıyla gerçekleştiremedikleri düşünülmektedir [21].

2.2.2. Yara Mikroçevresi ve Mikroorganizmalar

Yara iyileşmesi sürecinde, iç ve dış ortam arasında sürekli dinamik değişim ve etkileşim söz konusudur. Yara bölgesinde kalıcı homeostazın sağlanabilmesi için, hücreler ve mikroçevre arasındaki bu etkileşimin tam olarak anlaşılması gerekmektedir. Yara mikroçevresindeki mikroorganizmalar, özellikle de canlı ve

cansız ortamlara tutunabilen mikroorganizma topluluklarından oluşan biyofilmler, iyileşme sürecini önemli derecede olumsuz etkilemektedir [32]. Sağlıklı bir insanın deri mikrobiyotası, birçok mikroorganizmanın birlikteliğini içeren dengeli, canlı bir ekosistemden oluşmaktadır [33]. Bu dengenin bozulması durumunda, yaralar ve enfeksiyonlar meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalarda, hastalık etkeni olan mikroorganizmaların doku ve organlarda çoğalmasıyla ortaya çıkan enfeksiyon durumunun, doku gramı başına 10^5 ' ten fazla mikroorganizma bulundurması sonucunda oluşabileceği bildirilmektedir [25].

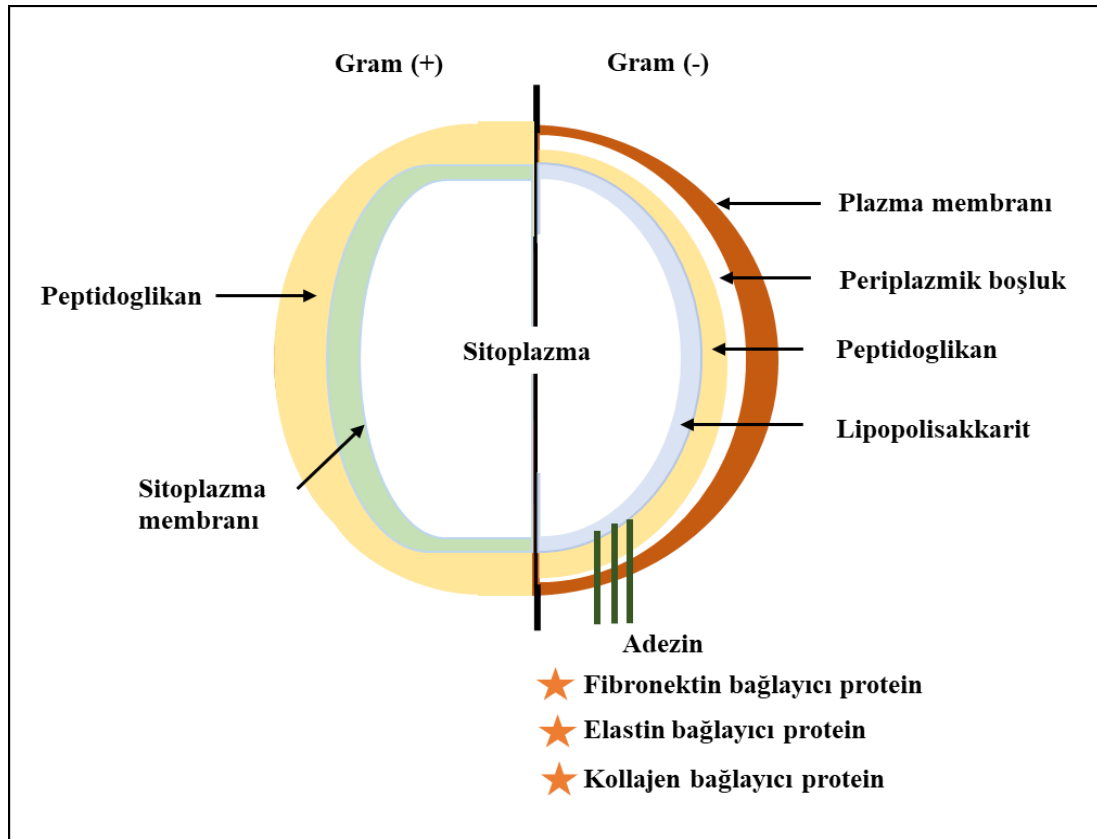
Enfeksiyonlu yara bölgesine ilk kolonize olan bakteriler, üremeleri için gerekli optimum pH değeri 7.0 olan Gram pozitif *Stafilokok* türleridir. Sonrasında ise, üremeleri için daha geniş pH aralığına sahip olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis* türleri yara bölgesine kolonize olmaktadır. Yara yüzeylerinde biyofilm oluşumuna yol açan bu bakteriler, iyileşme sürecindeki fonksiyonel hücrelerin ve inflamatuvar cevabın değişimine yol açarak yaranın kronik bir hal almasını tetikleyebilmektedir [34]. Bu bakterilerden *Staphylococcus aureus*; insan derisinin normal flora üyesi olup, deri yüzeyinde bulunan yaralara veya deri ile temas halinde bulunan kateter, vücuttaki iltihabın ya da herhangi bir sıvının geçişini sağlayan şant gibi yabancı cisimlere kolayca tutunarak kronik enfeksiyonlara sebep olmaktadır [35, 36]. Kronik yara oluşumunda bu bakteriler; ortamın pH' sını, laktat miktarını değiştirerek, sitokin ve MMP' lerin işleyişinin bozulmasına yol açar ve devamlı inflamasyon döngüsüne sebep olurlar [37, 38].

2.3. Biyofilmlerin Oluşturulması

Biyofilmler, birbirlerine ve tutundukları yüzeye geri dönüşümsüz şekilde bağlanan, protein, lipit, su, polisakkarit ve nükleik asit bileşenlerinden oluşan, matriks yapısı içine gömülü halde bulunan, serbest olarak dolaşan mikroorganizma ortaklıkları olarak bilinirler. Gram negatif (-) bakterilerin matriks yapıları anyonik özellikte olup, bu özellik sayesinde kalsiyum-magnezyum gibi katyonik bileşikler ile sağlam çapraz bağlar oluştururlar. Gram pozitif (+) bakterilerin birçoğunun matriks yapıları ise katyonik yapıdadır [39]. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin özellikleri Tablo 2.1' de, hücre duvar yapısı ise Şekil 2.2' de verilmiştir.

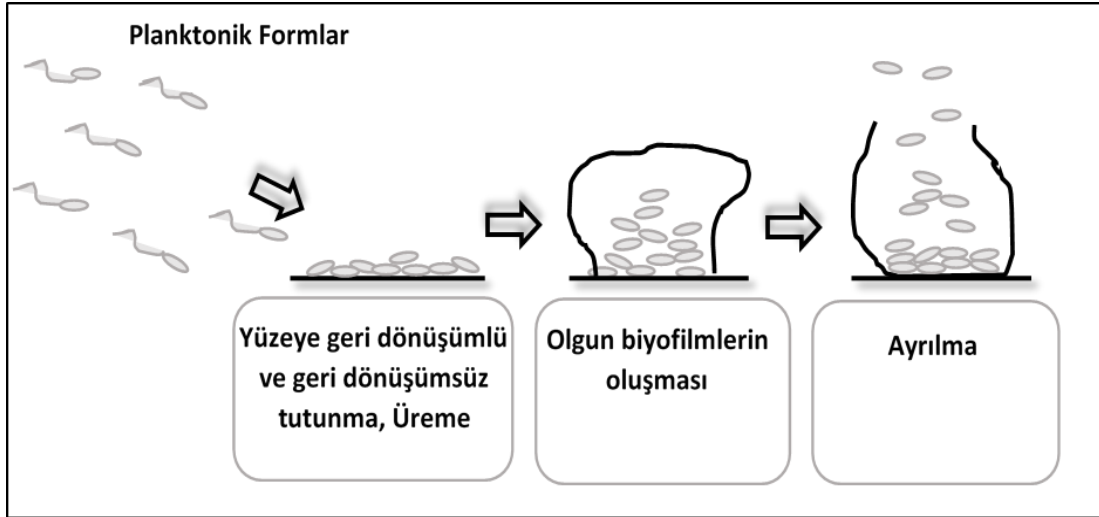
Tablo 2.1. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin özellikleri.

Gram (+) Bakterilerden <i>S. aureus</i>	Gram (-) Bakterilerden <i>P. aeruginosa</i>
Hücre Duvar Yapısı : Peptidoglikan Teikoik asit Lipoteikoik asit	Hücre Duvar Yapısı : Peptidoglikan Fosfolipidler Lipoproteinler
Hücresel şekil : Küresel şekilli	Hücresel Şekil : Çubuksu, silindirik
Dış zar : Yok	Dış zar : Var

**Şekil 2.2.** Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin hücre duvar yapıları [40].

Biyofilm yapısında, mikrokolonilere oksijen ve besinlerin difüzyonunu sağlayan kanallar bulunmakta olup, bu kanallar aynı zamanda mikrokolonileri birbirinden ayırmaktadır. Biyofilmler; ısı değişimi, pH, ozmotik stres ve antimikrobiyal ajanlardan kaçma gibi mikroorganizmaya zarar verebilecek birçok etkene karşı mikroorganizmaları koruyan bir yapı sağlamaktadır. Biyofilm oluşumunu ve yüzeye tutunmasını etkileyen faktörler; bakterinin hücre duvar yapısı, bakteri sayısı, bakterinin Gram (-) veya Gram (+) olması, ortamdaki oksijen ve besin maddesi yoğunluğu, ortamın sıcaklığı ve pH' ı olarak sıralanabilir [41]. Yapılan çalışmalarda en sık karşılaşılan biyofilm oluşturan bakteriler, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Alcaligenes spp*, *Bacillus spp*. olarak bildirilmektedir [42]. Biyofilm oluşum basamakları genel olarak 5 ayrı fazda gerçekleşmektedir. Bunlar; tutunma, çoğalma, bağlanma, olgunlaşma ve ayrılma fazlarıdır (Şekil 2.3).

Yüzeyin pürüzlülüğü, hidrofilik-hidrofobik yapısı, matriks üretimi, sıcaklık, iyonik denge, pH düzeyi gibi faktörler mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını etkilemektedir [43]. Bakterilerin büyük bir kısmı Gram (-) özellikte olduğu için, tutunma esnasında yüzey ile mikroorganizma arasında oluşan itme kuvvetine karşı koyabilmekte ve bu sayede daha iyi tutunma sağlanmaktadır. Dönüşümlü bağlanma sırasında bakteriler ekstraselüler matriks üreterek, zayıf bağların kuvvetli kalıcı bağlara dönüşmesini ve böylece daha stabil bir yapı oluşmasını sağlarlar. Dönüşümsüz bağlanma sağlandıktan sonra, bakteri sayısının artmasına paralel olarak, bakteriler tarafından üretilen ekstraselüler matriks üretimi yoğunlaşır ve bu üretim mikroorganizmaların birlikteliğini kuvvetlendirerek biyofilm ile ilişkili antimikrobiyal direncin oluşmasını sağlar. Biyofilm yapısının gelişmesiyle birlikte, bakteriler olgunlaşmaya başlar ve bu esnada yapı incelenecek olursa besin ve atık ürünlerin değişimini sağlayan kanallar ve belirgin boşluklar gözlemlenir [44]. Koloni oluşumundan üç-dört gün sonra başlayan ayrılma aşamasında, hücreler bağlandıkları yüzeyden ayrılarak dağılmaya başlarlar [45]. Bu ayrılma, sıvı mekanik kuvvet ya da genetik faktörlerden kaynaklı olabilmektedir.



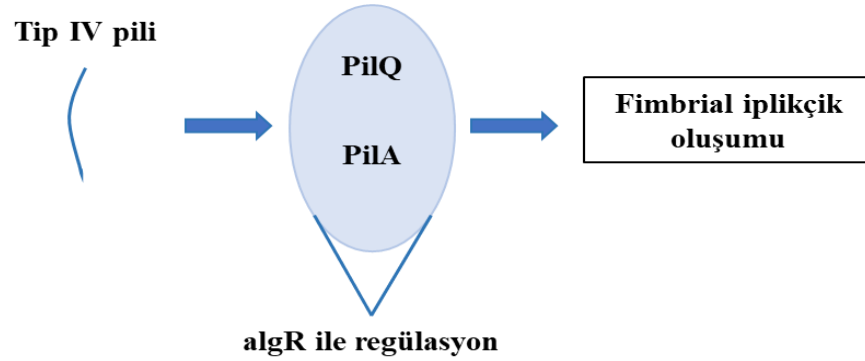
Şekil 2.3. Biyofilm oluşum basamakları [46].

Yüzeyle tutunma sonrasında biyofilm oluşturan mikroorganizmalarda bazı fenotipik değişimler meydana gelmektedir. Bu değişimlerin, biyofilm oluşumu esnasında rol oynayan genetik faktörler ve değişen gen ekspresyonu seviyelerinden kaynaklı olabileceği yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur [47-49]. Gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin değerlendirilmesi amacıyla yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizleriyle, *quorum sensing* (QS), hücre adezyonu, strese karşı verilen yanıt ile ilişkili birçok genin biyofilm oluşumu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur [48, 50].

Gram (-) bakteriler flagella, fimbria, pili gibi hücre eklentileri sayesinde temas ettikleri yüzeye başarılı bir şekilde tutunurlar [51]. Gram (-) bir bakteri olan *P. aeruginosa*, tip IV pili sayesinde yüzeylere tutunur. Tip IV pili fimbrial bir iplikçik oluşturmak için, PilQ tarafından sekrete edilen tek bir protein ünitesinden oluşan Pila tarafından oluşturulur (Şekil 2.4). Pila ve PilQ' nun sentezi, AlgR tarafından regüle edilen kısa peptid dizisi molekülleri (prelin) aracılığıyla gerçekleştirilmektedir [52]. *P. aeruginosa*' nın yüzeye yapışması ile ilgili yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa*' nın yüzeye tutunmayı arttırmak için ekstraselüler matriksin ana polimerik maddesi olan lipopolisakkarit bileşimini değiştirebileceği ve böylece farklı biyolojik malzemelerin yüzeylerine tutunabilme ve biyofilm oluşturabilme özelliğini arttırabileceği gözlenmiştir [53]. *P. aeruginosa*' nın tutunma, bir araya gelme,

olgunlaşma ve sonrasında gelişen biyofilm oluşum sürecinde gerekli ekzopolisakkaritler olan Psl ve Pel, *P. aeruginosa* PAO1' in geninde sırasıyla PslA ve PelA genleri tarafından kodlanmaktadır [54]. Glikoz ve galaktoz bakımından zengin olan Psl gen ailesinde yer alan PslA, biyofilm oluşumu için gerekli bir UDP-glukoz taşıyıcı protein olarak tanımlanmıştır [55]. Psl biyofilm matriksinin periferinde yer alarak, planktonik hücrelerin biyofilme yapışmasını sağlamaktadır [56, 57]. Sekonder haberci molekül olan siklik-dimerik-guanosin monofosfat (c-di-GMP), biyofilm oluşumu esnasında bağlanma ve birikme süreçlerinde görev alır [58]. c-di-GMP' nin PelD sitozolik iç zar proteininde bağlanma bölgesinin bulunması, Pel sentezi ve dolayısıyla biyofilm oluşumuyla ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle, biyofilm oluşumunun engellemesi üzerine yapılan çalışmalarda c-di-GMP' nin hedeflenmesi üzerine ilgi artmış durumdadır [59, 60].

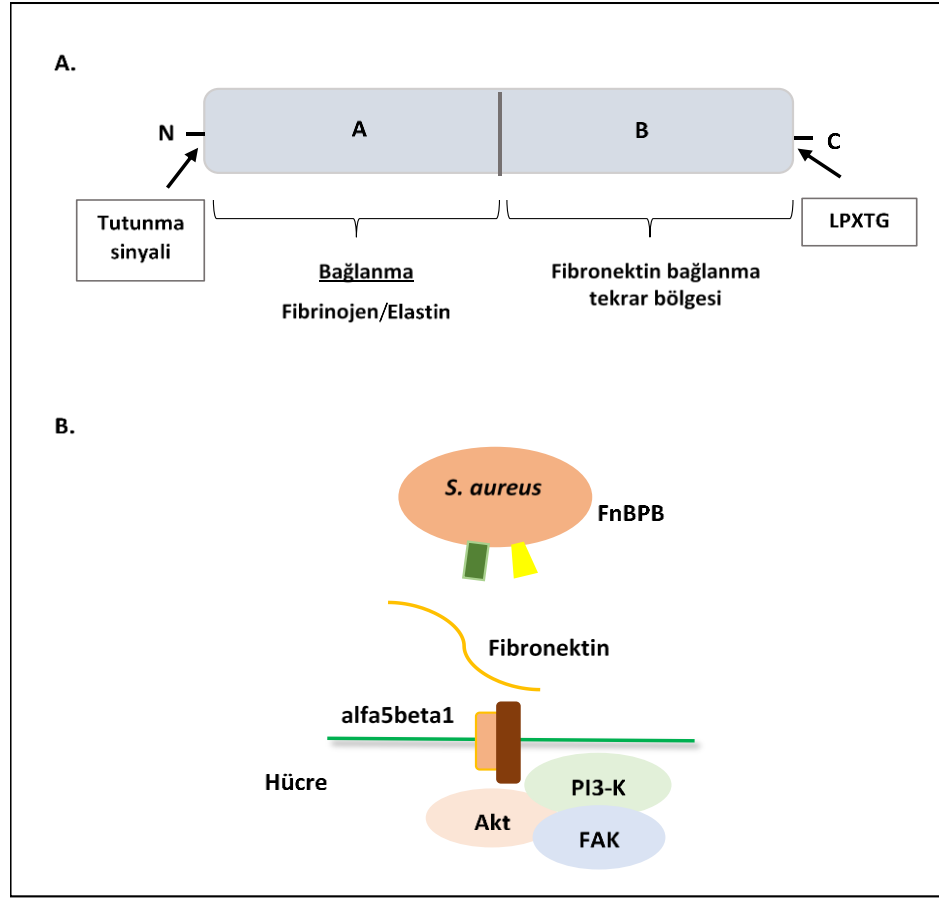
Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* 'nın Yüzeğe Tutunması



Şekil 2.4. *Pseudomonas aeruginosa* 'nın yüzeğe tutunma sırasında geliştirdiği fimbrial iplikçik oluşumu.

Bakteri hücrelerinin yüzeğe ilk tutunma aşamasında oluşan slaym tabaka (yapışkan tabaka) sonraki aşamalarda hücrelerin çevresinde koruyucu bir tabaka görevi görerek antimikrobiyal ajanlara karşı korunmaya olanak sağlamaktadır. Polisakkarit yapıdaki bu slaym tabakanın ana bileşenlerinden biri olan ve ica operonları tarafından sentezlenen polisakkarit hücreler arası adezin (PIA), *S.aureus* biyofilm oluşumlarının temel sebebi olarak bilinmektedir [61]. N-asetil glukozamin'

den oluşan PIA ekzopolisakkariti, *S.aureus* hücreleri arasında anyonik teikoik asitler ve lipoteikoik asitlerle elektrostatik etkileşimler kurarak hücrelerin birbirine yapışmasını sağlar [62]. *ica* operonu, düzenleyici *icaR* ve biyosentezden sorumlu *icaADBC*' den oluşmaktadır. *icaA* ve *icaD*, ekzopolisakkarit sentezinde önemli bir rol oynayan N-asetil glukozamin transferaz aktivitesine sahip enzimi kodlamaktadır [63]. *icaC* gen ürünü ise, poli-N-asetilglukozamin polimerinin bakteri hücre yüzeyine taşınmasını sağlarken *icaB* gen ürünü bu molekülü deasetile etmektedir [64]. Gram (+) bir bakteri olan *S. aureus*' un hücrelere tutunması, hücrelerdeki alfa5beta1 integrinler ile bakterilerdeki fibronektin bağlayıcı proteinler (FnBP) olan adeziv yüzey moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri arasında gerçekleşir [65, 66]. FnBP bağlayıcı proteininin, FnBPA ve FnBPB olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır [67, 68]. Bu Fn izoformları, amino-terminal tutunma sinyali ile birlikte fibrinojen/elastin ve fibronektin için tekrarlı bağlanma bölgelerini içermektedir (Şekil 2.5A). A alanı, fibrinojen ve elastinin bağlanmasını sağlayarak Fn bağlanmasını destekler [69, 70]. B alanı ise, fibronektin ve elastin bağlanması için tekrar kısımlarından oluşur. C terminalinde, peptidoglikan bağlayıcı motif (LPXTG) ve hücre duvarına bağlanan FnBP bulunur. Özetle *S. aureus*, FnBP' ler ile özellikle de FN ve alfa5beta1 integrinlerin etkileşimleri ile hücrelere yapışırlar. İntegrin kümelenmeleri sonucu FAK, PI3K ve Akt sinyal yolları tetiklenerek hücrelere entegre olurlar (Şekil 2.5B).



Şekil 2.5. *S. aureus*' un hücrelere tutunma mekanizması. A) FnBP izoform yapısı. B) Tutunma esnasında kullanılan sinyal yolları [71].

Quorum sensing adı verilen bakterilerin çevreyi ve birbirlerini algılamalarını sağlayan haberleşme sistemi biyofilm oluşumunda büyük önem taşır. *P. aeruginosa*' da tanımlanmış üç farklı QS sistemi bulunmaktadır. Bunlar; *las* sistemi (*lasRI*) [72], *rhl* sistemi (*rhlRI*) [73], *pqs* sistemi (*las+rhl*)' dir [74]. Ortama salınan bu QS sinyal molekülleri, biyofilm oluşumu ve antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin kontrolünü sağlamaktadır [75]. *P. aeruginosa*' da bu sistem ekzotoksin A ve elastin gibi ekzoenzimlerin sentezini kontrol ederek biyofilm oluşumu üzerine etki gösterir [76]. *Las* sistemi, *lasR* ve *lasI* genleri tarafından kodlanan, transkripsiyonel aktivatör proteini *lasR* ve otoindüktör sentaz enzimi *lasI*' dan oluşmaktadır. *lasI*' nin transkripsiyonu, *lasR*' ye bağlanmada önemli görevi olan N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine *lactone*' nun (otoindüktör-III olarak bilinir) sentezi ile *lasI* enziminin

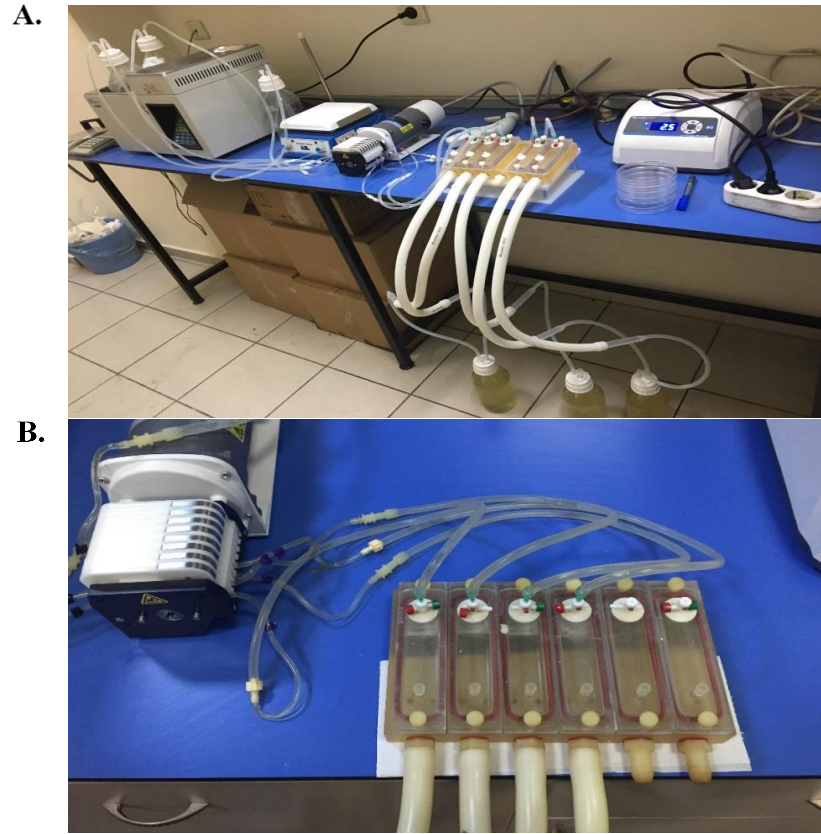
oluşmasını sağlar [77]. *P. aeruginosa* sayısının artması ile birlikte otoindiktör-III miktarında da bir artış olur ve bu da otoindiktör-III' ün spesifik hedef proteini olan *lasR*' ye bağlanarak biyofilm ile ilgili genlerin transkripsiyonunu tetikler. Bu genler, elastaz B (*lasB*), ekzotoksin A (*toxA*), alkalın proteaz (*aprA*) ve *lasA* proteaz (*lasA*) enzimlerinin sentezinde görev alan genleri içerir [78]. *Las* sisteminin aktivasyonu, başka bir otoindiktör N-bütiril-homoserin laktonunun üretilmesini indükleyerek *rhl* sisteminin aktive olmasını sağlar. *Rhl* sistemi, transkripsiyonel aktivatör proteini *rhlR* ve N-bütiril-homoserin lakton sentezini yapan *rhlI*' dan oluşmaktadır [75]. *Rhl* sistemi, biyofilm içeriğindeki sıvı dolu kanalların korunmasını sağlayan ve rhamnolipit adı verilen amfifilik biyo-yüzey maddelerinin oluşumundan sorumludur [79]. Üçüncü algılama sistemi 2-heptyl-3-hidroksi-4-kinolonunu kullanan *pqs* sistemi, durağan büyüme evresinin başlaması esnasında *rhl* bağımlı ürünlerin sentezinden görevlidir [80]. *Pqs* sisteminin *las* ve *rhl* sistemiyle birlikte çalıştığı düşünülmesinin sebebi, 2-heptyl-3-hidroksi-4-kinolonu sentezinin *lasR* ile ilişkili olmasıdır [81].

2.3.1. Damlamalı Akış Reaktör Sistemi

Günümüzde yaygın olarak kullanılan mikropalak bazlı yöntemler, plak çukurları içerisine yerleştirilen materyaller üzerinde biyofilmlerin oluşturulmasına olanak sağlayan, sisteme dışarıdan ya da içeriden verilebilecek sıvı akışını engelleyen *in vitro* kapalı modellerdir [82]. Mikropalak temelli yöntemlerin, biyofilmi hedef alan birçok farklı çalışma için elverişli olmalarına rağmen, plak çukurları içerisinde sıvı sirkülasyonunun olmaması bu yöntem için önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Mikropalak temelli yöntemlerin aksine ortamda devamlı bir sıvı sirkülasyonunun bulunduğu ve *American Society for Testing and Materials* (ASTM) kurumu tarafından onaylanmış ticari biyofilm reaktör sistemleri biyofilm yöntemleri için kullanılmaktadır [83]. Bu reaktör sistemlerinde, üreme için gerekli besinleri içeren üreme vasatının devamlı/yarı devamlı olarak ortama eklenebilmesi ve atık ürünlerin devamlı/yarı devamlı ortamdan uzaklaştırılabilmesi gibi faktörler sayesinde deney ortamı koşulları statik sistemlere oranla daha stabil kalabilmektedir. Damlamalı akış reaktör sistemi bu yöntemlerden biri olup bu sistemde; üreme vasatının ve bakteri süspansiyonunun sirkülasyonu için gerekli bir pompa, biyofilm ortamına taze üreme vasatı temini

sağlamak için bağlanmış boru sistemi ve atıkların ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla kullanılacak ikinci bir boru sistemi bulunmaktadır (Şekil 2.6).

Damlamalı sıvı akış reaktörü ile biyofilmler, az miktarda sıvı besiyeri inokülasyonları ile devamlı temas halinde bulunan eğimli slaytların üzerinde oluşturulurlar. Yapılan çalışmalarda bu cihaz, bakteriyel biyofilmlerdeki heterojenite çalışmalarında, biyofilm plağının kaldırılmasında, güçlü fırçalamanın etkisini değerlendirmede, bakteriyofajlar aracılığı ile biyofilm oluşumlarının azaltılmasında ve çeşitli antimikrobiyal ajanların ve materyallerin etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır [83, 84]. ASTM tarafından onaylanmış standart test yönteminde (ASTM standart metot E2647-08) damlamalı akış reaktörü kullanılarak *P. aeruginosa* biyofilmlerinin geliştirilmesi önerilmektedir [85]. Biyofilmlerin insan hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar, biyofilmlerin farklı inflamatuvar yanıtları indükleyebileceğini ve insan hücre hatlarında apoptozu aktive edebileceğini göstermiştir [86, 87]. Ward ve arkadaşlarının [88] yaptığı çalışmada, patojen mikroorganizmaları barındıran yara modelini yara üzerine taklit etmek için yara üzerine devamlı bir akış sağlanarak biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Biyofilmlerden salınan faktörlerin varlığında, başlangıç aşamasında iyileşme tetiklenirse de ilerleyen zamanlarda MKH'lerin rejeneratif kapasitesini azalttığı ve kısmen apoptozu indüklediği görülmüştür [88].



Şekil 2.6. Damlamalı sıvı akış reaktör sistemi. A) Kapalı sisteme genel bakış. B) Materyalin koyulduğu bölme sistemi.

2.3.2. Biyofilmler, Yaralar ve Tedavi Yöntemleri

Canlı ve cansız yüzeylere tutunabilen mikroorganizma ortaklıkları olarak da tanımlanan biyofilmler; kalp enfeksiyonları, yaralar, çeşitli medikal aletler ve çoğunlukla da akciğer enfeksiyonları ile bağlantılı enfeksiyonlar başta olmak üzere birçok kronik enfeksiyon durumu ile ilişkilendirilmektedirler. Kronik yaraların major sebepleri arasında biyofilmler bulunmaktadır. Kronik yaraların %90' ı cilt, oral mukoza veya çevreden bulaşan bakteri ve mantar topluluklarından oluşmaktadır [89]. Biyofilmleri oluşturan mikroorganizmaların, konak immün sistemine, antibiyotiklere ve biyositlere planktonik formlarına oranla çok daha toleranslı olmaları biyofilm ile ilişkili enfeksiyonları ciddi ölçüde problemleri bir süreç haline getirmektedir. Buna örnek olarak yapılan bir çalışmada, sistemik antibiyotiklerin idrarda bulunan planktonik bakterileri öldürdüğü ve hastada kateter ile ilişkili bakteriüri başlama

oranını azalttığı ancak yüksek doz uygulanmadığı takdirde biyofilmde bulunan bakterileri eradike edemediğinin gösterilmesi verilebilir [83]. Mikroorganizmalar üzerinde kullanılan antibiyotiklerin, biyofilm bakterilerinin yüzeye geri dönüşümlü şekilde bağlandıkları birinci basamakta etkili oldukları, fakat ikinci basamakta gerçekleşen geri dönüşümsüz bağlanma esnasında, mikrokolonilerin oluşması dolayısıyla da biyofilm durumunun gelişmesi ile biyofilm hücrelerinin antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur. Antibiyotiklerin, biyofilm oluşturan bakterilere karşı gösterdiği minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) değerler ile planktonik formların değerleri karşılaştırıldığında, biyofilm hücrelerinin 100 kattan daha yüksek oranda MİK ve MBK değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Biyofilmlerde gözlenen bu yüksek toleransın nedenleri arasında; antibiyotiklerin biyofilm yapısı içine tam penetre olamaması, biyofilm hücrelerinin azalmış metabolik aktivite göstermeleri, persister hücrelerin varlığı ve biyofilm hücrelerinin spesifik direnç genlerinin ekspresyonları gibi faktörler düşünülmektedir.

Biyofilm oluşturabilen bakteriler, konvansiyonel antibiyotik tedavilerine karşı azalmış duyarlılık sergiledikleri için bu hücrelere etkili olabilecek alternatif yollara ihtiyaç duyulmaktadır [90, 91]. Bu noktada, doğal ya da sentetik antimikrobiyal peptidlerin (AMP) etkili olabileceği düşünülmektedir. AMP'lerin bakteriyostatik etki (bakteriyi öldürmeksizin büyüme ve üremesini yavaşlatma veya durdurma yeteneği) değil de bakterisidal etki (bakterileri fiziksel ya da kimyasal etkiyle öldüren) göstermeleri nedeniyle, bakterilerin AMP'lere direnç göstermeleri zordur [92-97]. Bu özellikleri sebebiyle AMP'ler, günümüzde uygulanan antibiyotik tedavilerine karşın umut veren bir yaklaşım oluşturabilir. Doğal ve sentetik yapıda farklı AMP tipleri bulunmakta olup, sentetik AMP'lerin üretme ve saflaştırılma maliyetlerinin yüksek olması önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır [98]. Bu nedenle sentetik yapıya kıyasla doğal AMP'lerin kullanılması antibiyotik tedavisinin yanına yardımcı alternatif ajanlar olarak önerilmektedir. Harman ve arkadaşlarının [99], MKH'lerin cilt yaralarında bulunan Gram (-) ve Gram (+) bakterilerin üremeleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada; MKH'lerin, kısmen AMP'leri salgılayarak bakteri hücre zarlarını depolarize ettiğini ve aynı zamanda *Escherichia coli* ve *S. aureus*'un çoğalmasını inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. MKH'lerin

antimikrobiyal aktivite göstermeleri, kronik kutanöz yaraların tedavisinde kullanılabilirliklerini ortaya çıkarmaktadır.

Normal yara iyileşmesi sürecindeki bir aksaklık veya büyük çaplı yanıklar, kapanmayan diyabetik yaralar gibi epidermis ve dermisi etkileyen tam kalınlıktaki yaralarda deri kendini yenileyememektedir. Bu durumlarda, doğal veya sentetik iskeleler (biyomalzemeler) kullanılarak yara iyileşmesi sağlanmaya çalışılmaktadır. Klinik uygulamalara yönelik üretilecek olan deri eş değerleri, immünojenik, toksik ve aşırı inflamasyona neden olmamalı ve aynı zamanda biyobozunur, derinin fiziksel-mekanik özelliklerini yerine getiren, doku onarımını destekleyen ve yarayı enfeksiyonlara karşı koruyan özellikte olmalıdır. Bu özelliklerin yanında, maliyetinin düşük olması, hızlı üretilebilir, uygulanabilir ve uzun kullanım süresine sahip olması büyük avantaj sağlayacaktır. Yara iyileşmesine yönelik malzemelerin üretimi üzerinde çalışan deri doku mühendisliği, dermisi taklit eden biyobozunur matriks yapılarının geliştirilmesi ve sonrasında bu yapılar üzerinde hücrelerin geliştirilmesi esasına dayanan doku mühendisliği uygulamasıdır [21].

Günümüzde yapılan deri grefti uygulamalarının kısıtlamalarından bazıları; donörde alınan bölgeye zarar vermesi, deride pigmentasyon uyuşmazlığı yaratması, deri kasılmaları gibi yaşam kalitesini etkileyen sınırlamalardır. Ancak doku mühendisliği çalışmaları ile kök hücre bazlı terapötik tedavilerin geliştirilmesi, tek başına deri grefti uygulamalarının eskisi kadar tercih edilmemesine sebep olmuştur [100]. MKH' ler, vaskülarizasyonu indüklemeye yeteneği, güçlü parakrin sinyallerle birlikte farklılaşmayı sağlaması, anjiyogenezi desteklemesi gibi özellikleriyle yara iyileşmesi sürecine katkıda bulunmaktadır [101-103]. Özellikle diyabetik hastalarda yaraların geç kapanması veya kapanmaması söz konusu olduğundan yara bölgesine kök hücre uygulanması ile, hücre proliferasyonunun ve göçünün uyarıldığı, böylece granülasyon dokusunun oluştuğu ve re-epitelizasyonun güçlendiği görülmüştür [104].

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Kök hücreler, farklılaşmamış, kendilerini yenileyebilen ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma kapasiteleri olan hücrelerdir [105]. Bu özelliklerinden dolayı kök hücreler, doku mühendisliği uygulamalarında heyecan verici bir hücre grubu haline gelmiştir. Kök hücreler, farklılaşma kapasitelerine göre; totipotent, pluripotent ve

multipotent hücreler, elde edildikleri yere göre ise; embriyonik, fetal ve erişkin kök hücreler olarak sınıflandırılırlar. Embriyonik kök hücreler, pluripotent özellikte olup ve üç germ yaprağına dönüşme yeteneğine sahiptirler. Fetal kök hücreler, fetüs dokularından elde edilirler ve pluripotent-multipotent ara safhada kalmış hücrelerdir. Erişkin kök hücreler, multipotent olup, buldukları dokuda çoğalarak hasar söz konusu olduğunda rejenerasyonu sağlamaktadırlar. Kök hücreler genel olarak, kemik iliği, göbek kordon kanı, periferik kan, kemik, kas ve dental pulpa gibi hücre kaynaklarından elde edilmektedirler.

Kök hücre tiplerinden biri olan MKH' ler, kendi kendini yenileme ve multipotansiyel farklılaşma özelliklerine sahip olan kök hücrelerdir. MKH' ler mezoderm tabakasından kaynaklanıp adiposit, osteosit, kondrosit ve miyoblast gibi mezoderm kökenli olan diğer hücre soylarına farklılaşabilirler [6, 106]. MKH' ler 1970' lerde Friedenstein ve arkadaşları tarafından, kemik iliği kültür kabına yapışan ve koloni oluşturan fibroblast benzeri hücreler olarak izole edilmiş, daha sonra bu hücreler, Caplan tarafından “mezenkimal kök hücreler” olarak tanımlanmıştır [107, 108]. MKH' ler aynı zamanda kordon kanı [109], göbek kordonu [110], adipöz doku [111], amniyon sıvısı [112], plasenta [113] ve deri [114] gibi birçok fetal dokudan [115] izole edilebilirler. Bu hücrelerin en belirgin özellikleri şöyle sıralanabilir; plastik yüzeye tutunan, kendi kendini yenileme kabiliyetine sahip, iğsi-fibroblast benzeri görünümde, CD73, CD90 ve CD105 hücre yüzey belirteçlerini ifade eden, *in vitro* ortamda adiposit, kondrosit ve osteositlere farklılaşabilen hücrelerdir [116]. MKH' lerin oranları, buldukları doku tipine göre farklılık göstermekle birlikte, yapılacak deneysel çalışmalar ve klinik uygulamaların öncesinde *in vitro* olarak çoğaltılmaları gerekmektedir. MKH' ler, *in vitro* çoğaltılma süreçlerinde çoğalma ve farklılaşma özelliklerini koruyabilen dayanıklı hücrelerdir. Kemokin, sitokin, büyüme faktörleri gibi biyoaktif faktörler salgılamaları, antiapoptatik, antiinflamatuvar ve antiangiyojenik özellikleri sayesinde hasarlı doku tamirinde önemli roller oynayarak ilgi çeken bir hücre grubu haline gelmiştir [10].

Mezenkimal kök hücrelerin, ilerleyen pasajlarda yaşlanma belirtileri gösterebilmesi, hücrelerin kalitesinin düşmesi ve immün sistem üzerindeki düzenleyici etkisinin istenen yönde olmaması gibi kullanımını kısıtlayan özellikleri de bulunmaktadır. Aynı zamanda, MKH'lerin tedavi amacıyla kullanılması sırasında

uygulanması gereken ideal doz, süre ve uygulama bölgesi gibi önemli noktaların belirli bir protokole tam olarak oturtulmaması kullanımını sınırlandıran diğer özelliklerdir [117]. MKH' ler ile yapılan tedaviler, ateşli reaksiyonlar, genetik manipülasyon, kromozomal anormalilikler, malign transformasyon ve enfeksiyonel komplikasyonlar gibi riskleri içerebilir [118-120]. Bu risklerinden dolayı, MKH' lerin üretiminde ve tedavi aracı olarak kullanılması aşamalarında kontrollü ilerlenmelidir.

Yapılan çalışmalarda, MKH' lerin antiapoptatik özelliklerinin doku hasarı ve hücre ölümünü azaltmasının yanında [121, 122], implantasyon sonrası MKH' lerin apoptoza uğrayarak düşük hayatta kalma oranı gösterdiği görülmüştür. MKH' lerin etkinliğini ve yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla mikroçevresinde ön şartlandırma yapılması, MKH' leri zorlayıcı koşullara hazırlayarak daha yüksek bir hayatta kalma oranı sağlar [123, 124]. Gram (-) bakterilerin yüzey bileşeni olan endotoksinin, MKH mikroçevresinde ön şartlandırma etkeni olarak kullanılması MKH apoptozunu bir miktar inhibe ettiği yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur [125, 126]. Bunun yanında endotoksinin, immün sistemi uyararak hücre ölümüne yol açabileceği ve endotoksik şoka neden olabileceği rapor edilmiştir [125, 126].

2.4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Antimikrobiyal Özellikleri

Mezenkimal kök hücreler, yara mikro çevresini düzenleme, konakçı immün yanıtlarını modüle etme, stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi parakrin faktörleri serbest bırakma yoluyla yara iyileşmesi sürecine katılan multipotent projenitör hücrelerdir [127-130]. Aynı zamanda MKH' ler, ekstraselüler matriksi salgılayarak doku morfogenezinin düzenlenmesinde immünmodulator etki gösterirler. MKH' lerin antimikrobiyal özellikleri, en çok kemik iliği kaynaklı hücreler ve bakteriler ile yapılan *in vitro* çalışmalarla elde edilmiştir. Kemik iliği (Kİ) kaynaklı MKH' lerin (Kİ-MKH), uyarılmış ve uyarılmamış MKH kültürlerinde LL-37 [9, 10] ve *hepcidin* [131] aracılığıyla antimikrobiyal etkilerini gösterdikleri bulunmuştur. Bu AMP' lerden LL-37' nin, MKH kültüründe, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumonia'* nın gelişimini engelleyici bir etki gösterdiği görülmüştür [9, 10]. Aynı zamanda, MKH' lerin bakteriler ile ko-kültürleri sonrasında bakteriyel büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur [9]. Kİ-MKH' leri, çözülebilir faktörler yoluyla patojen büyümesini

inhibe edip, immün hücrelerin antimikrobiyal etkilerini arttırarak patojen etkisini azaltırlar [132]. MKH' lerin konakçı üzerine yaptıkları etkiler; inflamatuvar kemokin ve sitokin uyarımının azalması, immünregülatör özelliğinin azalması, proinflamatuvar hücrelerin hasarlı bölgeye göçünün azalması olarak sıralanabilir [132]. İnflamatuvar sitokinlerin uyarılması ile MKH' ler, çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal faktörler salgılayarak immünsüpresif etki gösterirler [133]. MKH' lerin AMP' ler vasıtasıyla gösterdikleri antimikrobiyal etkilerini arttırmak için önerilen metodlar arasında; büyüme faktörleri, sitokinler ve ultraviyole B ışınına maruz bırakmak bulunmaktadır MKH' lerin antimikrobiyal potansiyeli, bulaşıcı hastalıklar ve özellikle deri hasarları için terapötik bir yaklaşım yaratmaktadır.

Mezenkimal kök hücrelerin, LL-37, lipokalin-2 ve beta-defensinler gibi AMP' leri salgıladıkları yapılan çalışmalarla gösterilmektedir [10, 134, 135]. Birkaç çalışmada ise, MKH' ler tarafından salgılanan antimikrobiyal moleküllere maruz kalma sonrasında fagositozun artmasıyla birlikte nötrofil ve monositlerin öldürücü özelliklerinin de arttığı ve kanda bakteri bulunması durumunda ölümcül sonuçlara yol açan sepsiste iltihabik durumu baskıladığı görülmüştür [9, 136, 137]. Toll benzeri reseptör agonistleri (TLR) ve sitokinler ile MKH' lerin önceden aktivasyonunun, antimikrobiyal özellikler üzerine etkileri incelenmiş ve TLR3 ligandları ile MKH aktivasyonunun, nötrofil sağkalımını arttıran faktörlerin salgılanmasını indüklediği görülmüştür [138-140]. Kronik implant enfeksiyonlarında TLR ile aktive olan MKH' ler ve eş zamanlı olarak antibiyotik tedavisinin etkisini anlamak için yapılan bir çalışmada, MKH' lerin sistemik olarak antibiyotiklerle birlikte verilmesinin kronik implant enfeksiyonlarında enfeksiyon durumunu kontrol altına aldığı bunu da doğrudan ya da dolaylı olarak antibakteriyel ve immünolojik mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir [141].

Kistik fibröz, kistik fibröz transmembran iletkenlik düzenleyici geninin mutasyona uğraması sonucu epitel hücre membranında sodyum ve klorür iyonlarının dengesizliğine yol açarak pulmoner enfeksiyon ve gastronintestinal tıkanıklığa neden olan kalıtsal, ölümcül bir rahatsızlıktır [142, 143]. MKH' ler, anti-inflamatuvar, antimikrobiyal ve antiapoptatik özellikte biyoaktif moleküller salgılaması nedeniyle solunum yolu hastalıklarında üzerinde araştırmalar yapılan bir hücre grubu haline gelmiştir [144, 145]. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, kistik fibröz hastası fareler

P. aeruginosa ile enfekte edilmiş ve MKH ile tedavi edilmesinin ardından sağ kalımı takip edilmiştir [10]. MKH' ler ile tedavinin, LL-37 miktarındaki artış ile bakteriyel yükü azalttığı görülmüştür [10]. LL-37' nin, bakteri hücre duvarını yumuşatarak antimikrobiyal moleküllere karşı hassasiyeti artırma yoluyla etkisini gösterdiğini yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur [146].

2.5. CD146+ Kök Hücreler

On dokuzuncu yüzyılda, Fransız araştırmacı Charles-Marie Benjamin Rouget, “Rouget” hücreleri olarak isimlendirilen küçük kan damarlarıyla ilişkili olan hücre popülasyonunu bulunmuş, yirminci yüzyılda ise, Alman Bilim Adamı Karl Wilhelm Zimmerman bu hücreleri perivasküler bir konumda bulunmasından dolayı “perisitler” olarak adlandırmıştır [147]. Perisit kelimesindeki “peri” etraf anlamına gelmekte ve kan damarını çevreleyen hücreyi tanımlayan “kytos” hücre kelimesinden türemektedir [148]. Perisitler (CD146+ kök hücreler), kan damarlarını çevreleyen bütün vasküler dokularda bulunurlar ve endotel hücrelerini çevreleyerek onlarla parakrin sinyaller ve uzantılar yoluyla iletişim kurarlar [149]. CD146+ kök hücrelerin buldukları doku ve organlardaki oranları, morfolojilerine, moleküler belirteçlerine, plastisitelerine ve dağılımlarına göre farklılık gösterebilir [150]. Büyük çekirdekli, fibroblast benzeri hücreler olarak tanımlanan bu hücreler kalp, deri, kemik iliği, göz, plasenta ve göbek kordonu kaynaklarından elde edebilirler [11]. Ancak fetal dokular dışında CD146+ kök hücrelerin elde edilebileceği diğer kaynaklar, miktarlarının az olması ve belirgin bir izolasyon prosedürünün bulunmamasından dolayı rutin çalışmalara uygun değildir. Bu nedenle son zamanlarda, insan göbek kordonu yüksek miktarda MKH içermesi nedeniyle CD146+ kök hücrelerin izolasyonu için dikkat çekici bir kaynak haline gelmektedir. MKH' ler, *Wharton's Jelly* içine gömülü halde bulunan iki arter bir veni kapsayan bağ dokuda bulunmaktadırlar [151]. Göbek kordonu kaynaklı CD146+ kök hücrelerin, yüksek miktarlarda elde edilebilmesi, doğum sonrasında kolay temin edilebilir olması ve hazır bir otolog hücre greftine olanak sağlaması bakımından büyük avantajlar sağlamaktadır.

Son zamanlarda, MKH' lerin *in vivo* olarak bir perivasküler niş içinde bulunduğunu gösteren çalışmalar artmış durumdadır [147]. MKH' lerin vasküler bölge yakınında bulunması, bu hücrelerin vücuttaki çoğu dokudan izole edilebilmesine

olanak sağlamaktadır. CD146+ kök hücrelerin, MKH' ler ile aynı hücre yüzey belirteçlerini (CD73, CD90, CD105) ifade etmeleri ve MKH' ler gibi multipotansiyel farklılaşma kapasitesine sahip olmaları gibi özellikleri dolayısıyla MKH' lerin *in vivo* muadilleri oldukları varsayılmıştır [12]. CD146+ kök hücreler anjiyojenezi desteklerken aynı zamanda kan damarlarının korunmasında önemli rol üstlenen endotel hücrelerle sıkı iletişim halindedirler [152].

Yapılan bir çalışmada CD146+ kök hücrelerin göbek kordonundan eldesi için, kan kollajenaz ile muamele edilmiş belirli bir süre inkübe edildikten sonra MACS ile CD146+ kök hücreleri izole edilmiştir [153]. Aynı zamanda CD146+ kök hücrelerin eldesi için, dispaz ile enzimatik yıkım, mekanik ayrıştırma ve eksplant kültür gibi izolasyon yöntemleri de kullanılmaktadır [154]. MKH kaynaklarındaki düşük projenitör hücre oranı, proliferatif kapasiteleri açısından insan göbek kordonu CD146+ kök hücrelerini alternatif bir mezenkimal projenitör hücre kaynağı haline getirmiştir [155, 156]. Bu noktada, insan göbek kordonu CD146+ kök hücrelerin, alloreaktif olmaması ve immünsüpresif etki göstermesi onları allojenik uygulamalar için ideal bir hücre grubu haline getirmiştir [157]. Yara iyileşmesi üzerine Zebardast ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [158], insan göbek kordonu CD146+ kök hücrelerin fibrin ile yaralara verilmesinin kutanöz dokunun yeniden yapılanmasında önemli etkileri olduğu görülmüştür [158].

Yakın zamanda, CD146+ kök hücrelerin sentezledikleri ekstraselüler matriks proteinlerinin proteom analizleri çalışılmıştır. CD146+ kök hücreler tarafından sentezlenen ekstraselüler matriksin yapısal kollajenlerden, glikoproteinlerden, proteoglikanlardan, anjiyojenik ve inflamasyon proteinlerinden oluştuğu Brown ve arkadaşlarınca [13] gösterilmiştir. Bunun yanında, CD146+ kök hücreler tarafından sentezlenen bu proteinlerin, endotel tüp oluşumunu, nötrofil adezyonunu, polarizasyonu ve kemotaksisi destekledikleri bulunmuştur [13]. Bu özellikleri nedeniyle, CD146+ kök hücrelerden elde edilen deselülerize matriks proteinlerinin, fizyolojik yapıyı daha iyi temsil edebilme ve doku rejenerasyonuna daha etkili bir şekilde cevap verebilme potansiyeli mevcuttur.

Hücre bazlı tedavilerin en önemli sınırlamalarından biri, hücrelerin yara bölgesine verilmesi noktasıdır [159]. Yapılan çalışmalar ile hücrelerin, uygun polimerik ya da sentetik iskeleler vasıtasıyla yara bölgesine uygulanması hücre

proliferasyonunda artışa sebep olduğu ortaya koyulmuştur [160]. Bu amaçla, yara iyileşmesini desteklemek için çeşitli iskeleler ve büyüme faktörleri kullanılmış olup, en efektif sonuç dokuların yapısından türetilen biyolojik yapı iskeleleri ile elde edilmiştir [161].

2.6. Ekstraselüler Matriks, Doku Mühendisliği Uygulamaları ve Deselülerizasyon İşlemi

2.6.1. Ekstraselüler Matriks Yapısı

Tüm doku ve organlar, hücre ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin bir arada bulunduğu ağısı formdaki ekstraselüler matriks yapısından meydana gelmektedir. Ekstraselüler matriks yapısındaki kollajen, yapısal proteinler, laminin, elastin, fibronektin ve proteoglikanlar şeklinde proteinlere kovalent bağlanan GAG' lar gibi makromoleküllerden dolayı; hücrelere yapısal destek sağlama, hücresel süreçleri (çoğalma, farklılaşma, migrasyon vb.) düzenleme, hücrelerin niş ortamına vereceği yanıtın düzenlenmesi ve herhangi bir yara/hasar durumunda yeniden modellemeye olanak sağlayan bir mikroçevre ortamı sağlar [8, 14, 162]. Ekstraselüler matriksler yapılarına göre; dokular arası matriksler ve hücreler arası matriksler olmak üzere iki gruba ayrılabilirler. Dokular arası matriksler, hücrelerin etrafını çevrelerken, hücreler arası matriksler hücreler ile sıkı iletişim halindedir. Parankim ve bağ dokuları arasında bulunan bazal membran, parankimal hücreleri birbirine bağlayan bir ara tabaka görevi gördüğü için hücreler arası matrikse örnek olarak verilebilir. Bazal membran temel olarak, epitel hücrelerin yapışmasını sağlayan laminin ve yapı stabilizasyonunu destekleyen kollajen tip IV ağından meydana gelmektedir [163].

Brown ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, perisit ekstraselüler matriks yapısında kollajen IV, trombospondin, MMP2, tenaskin-C ve fibronektin gibi birçok pro-anjiyojenik protein tanımlamıştır [13]. Perisit ekstraselüler matriks yapısı, bu içeriğinden dolayı hastalıkların tedavisinde potansiyel bir araç haline gelmektedir. Aynı zamanda TGF-beta ile perisitlerin aktive edilmesi, perisitlerden ekstraselüler matriks birikimini sağlayarak EMP' nin yeniden modellemesini desteklediği bulunmuştur [164]. Genel bir bakış olarak perisitlerin salgıladıkları ekstraselüler matriksin, inflamatuvar koşullarda ve yara iyileşmesi süreçlerinde hızlandırıcı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

2.6.2. Doku Mühendisliği Uygulamaları

Otogreft ve allogreft gibi tedavi yöntemlerinde, sınırlı temin edilme ve patojen aktarımı gibi riskler içerdiği için istenilen verim alınamamaktadır [165]. Bu nedenle, doku mühendisliğinin temel amacı olan, hasarlı doku ve organların yeniden yapılanma sürecini destekleyen “iskele” adı verilen yapılar her geçen gün dikkat çekmektedir. Doku mühendisliği çalışmaları üç önemli temel prensibe dayanır: 1) dokuyu oluşturan hücreler, 2) hücrelere yapısal destek sağlayan iskeleler, 3) hücrelerin davranışlarından sorumlu hücre-matriks etkileşimleri. Kök hücreler, doku homeostazının sağlanması, metabolizma, hücre büyümesi ve onarımı süreçlerinde gerekli EMP’ nin salgılanması ve aynı zamanda doku-organ yenilenmesi için yardımcı hücreler olarak işlev görebilirler [166]. EMP yapıları, dokuda hücrelerin bir arada tutunması, hücresel davranış ve fonksiyonlarının düzenlenmesi, konak ile bütünleşmeyi desteklemesi, minimum immün yanıtın oluşturulması ve doku ve yara iyileşmesi süreçlerindeki önemli görevleri ile doku mühendisliği çalışmalarının önemli bileşenlerinden biri olmuştur. EMP temelli biyoiskeleler, vücut içinde parçalanarak matriksin yeniden şekillenmesini sağlar ve böylece hasar görmüş dokuların rejenerasyonunu hızlandırır [167, 168].

2.6.3. Deselülerizasyon İşlemi

Biyoiskelelerin üretim yöntemlerinden biri olan deselülerizasyon metodu, en çok kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir [169, 170]. Deselülerizasyon işlemi; EMP’ de bulunan kollajen, elastin, GAG’ lar gibi doğal bileşenlerin korunarak, hücresel içeriklerin ve antijenlerin uzaklaştırılması ve böylece kalan EMP’ nin mekanik bütünlüğüne, biyolojik aktivitesine, yabancı cisim reaksiyonu ve immün red olasılığına karşı en az hasarı hedefleyen bir yöntemdir [171, 172]. EMP’ nin yapısı, her bir dokuya özgü olmakla birlikte, kollajen, laminin, elastin, fibronektin ve vitronektin gibi proteinleri içerir. Aynı zamanda, hücreler ve EMP arasındaki iletişimi sağlayan proteoglikanlar, büyüme faktörleri, GAG’ lar, çapraz bağlanmış lifler ve yeniden modelleme proteazlarını da içermektedir [173]. Deselülerizasyon işlemi yapılırken dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, maksimum seviyede hücre kalıntılarının uzaklaştırılması ve EMP bileşenlerinin zarar görmemesidir. Bu aşamadaki başarı, yapı malzemelerinin *in vivo* implantasyonu sonrasında konak doku

cevabının belirlenmesinde çok önemlidir. Bu amaçla implantasyon için tercih edilen deselülerize edilmiş EMP' den oluşan iskeleler dışında kullanılan sentetik iskeleler, başlangıçta güçlü bir destek sağlamakla birlikte ilerleyen süreçlerde inflamatuvar yanıt oluşturarak birleşmeyi ve emilimi zorlaştırır. Emilebilir sentetik malzemeler, zamanla kronik iltihap durumu oluşturabileceği için zayıf klinik sonuçlar verir [174].

Doku deselülerizasyonu için kullanılan başlıca yöntemler; fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemlerdir. Fiziksel işlem olarak sonikasyon, mekanik stres, basınç, dondurma, çözme vb. gibi yöntemler kullanılmaktadır. Hücre zarını bozan bu işlemler tek başına deselülerize etmek için yeterli olamayabileceği için kimyasal yöntemlerle desteklenmelidir. Kimyasal işlem olarak, alkali/asit, Triton X-100, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum deoksikolat, etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), etilen glikol tetra asetik asit (EGTA), hipotonik ve hipertonic çözeltiler uygulanmaktadır (Tablo 2.2). Hücreler arası ve ekstraselüler matriks bağlantılarının bozulmasını sağlayan enzimatik işlemlerde, DNaz-1, tripsin, kollajenaz, nükleaz gibi ajanlar kullanılmaktadır (Tablo 2.2). Kullanılan deselülerizasyon yöntemleri hücre yapısına zarar veren çeşitli kimyasalları içermektedir. Bu kimyasalların işlem uygulandıktan sonra yüksek konsantrasyonlarda kalması, hücrelerde toksik etki gösterir ve doku yenilenmesi süreçlerinde bir iskele görevi görmesini engellemektedir. Bu aşamadaki başarı, malzemelerin *in vivo* implantasyonunda konak cevabını etkileyeceği için, uygulama sonrası seri yıkamalar ile kimyasalların uzaklaştırılması sağlanmalıdır. Deselülerize dokuların DNA içerip içermediğini kontrol etmek için, PZR, PicroGreen analizleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi, histolojik ve immünfloresan boyamalar gibi analiz yöntemleri kullanılabilir [175].

Tablo 2.2. Deselülerizasyon yöntemleri.

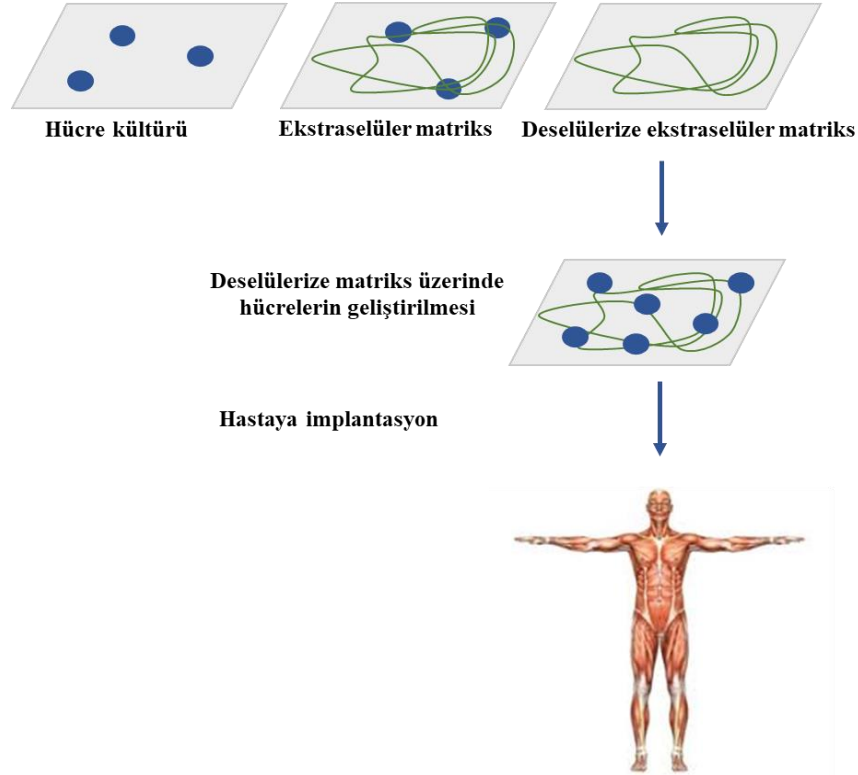
Fiziksel Yöntemler	Kaynaklar
Sonikasyon	[171]
Mekanik kuvvet	[172, 173]
Basınç	[174]
Dondurma-Çözme	[175-177]
Kimyasal Yöntemler	
Alkali/asit	[172, 178, 179]
Amonyum Hidroksit	[180, 181]
İyonik Olmayan deterjanlar; Triton X-100	[179, 182]
İyonik Deterjanlar; Sodyum dodesil sülfat (SDS)	[182-184]
Sodyum deoksikolat	[185, 186]
Zwitteriyonik Deterjanlar; EDTA, EGTA	[187-189]
Hipotonik ve hipertonic çözeltiler	[190-192]
Triton X-200	[181, 193]
Biyolojik Yöntemler	
Enzimler; Tripsin, kollajenaz, nükleaz,	[187, 188, 194]
DNaz-1	[180, 181]
Endonükleazlar	[186, 192, 195]
Ekzonükleazlar	[17]

2.6.4. Deselülerize Yapı İskeleleri ve Kullanım Alanları

Ekstraselüler matriksten oluşan bir iskele, üzeri hücreler ile kaplanarak hücrelerin üç boyutlu ortamda büyümesine olanak sağlayan fiziksel ve yapısal bir destek görevi görür. Yapılan çalışmalarda, deselülerize iskelelerin, çözülebilir biyoaktif peptitler gibi implantasyon sonrasında, rejenerasyonda görev alan sinyal yollarını etkilediği görülmüştür [18]. Deselülerize iskelelerin kök hücrelerle birlikte kullanılması, kök hücrelerin çoğalma, olgunlaşma ve bağlanma aşamalarındaki uzun süreli kültürden kaynaklı EMP bileşenlerinin bozulmasına sebep olabilmekle birlikte

projenitör hücre popülasyonlarının farklılaşma durumlarını da etkileyebilmektedir [176, 177]. Bu nedenle kök hücrelerin fonksiyonlarını bozmayacak, sinyal iletimini ve kök hücre mikroçevresini taklit edecek deselülerize iskeleler tasarlayabilmek önemlidir.

Deselülerize doku ve organlardan elde edilen biyolojik iskeleler, hayvan ön-klinik çalışmalarında ve insan klinik uygulamalarında başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Şekil 2.7) [178]. Yara bölgesine uygulanan deselülerize iskeleler, bölgeyi enfeksiyon ve su kaybından koruyarak oluşabilecek ağrıyı azaltır ve yaranın iyileşmesini hızlandırır [179]. Bu iskeleler, yanıklar, diyabetik yaralar veya travma yaraları tedavilerinde kullanılabilir. Ekstraselüler matriksin elde edildiği dokunun kökeni, deselülerizasyon yöntemi, iskelenin sterilizasyonu, EMP' nin yapısı ve bileşimi iskelenin implantasyonundan sonra konak doku yanıtında çok önemlidir. İskelelerin, yapısal destek sağlayarak matrikste rejeneratif süreçleri indükleyip implantasyon sonrası daha az inflamasyon ve skar oluşumu ile birleşmeyi kolaylaştırması beklenmektedir [180, 181]. Bu iskelelerin klinikte kullanılabilmesi için en önemli kriter, malzemenin yaraya yapışarak derinin işlevini stimüle edebilmesidir [182]. Malzemenin yara yüzeyine tam olarak yapışması için, yara ile malzeme arasında ödem oluşmasını önlemek ve böylece bakteri hücreleri çoğalmasını engellemek gerekmektedir. Tasarlanacak olan iskele, su buharı taşımamasını kolaylaştırmalı, bakteriyel bir bariyer görevi görmeli ve iyileşme sürecini desteleyecek nitelikte olmalıdır. Tüm bu özellikleri yerine getirebilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.



Şekil 2.7. Deselülerize ekstraselüler matrikslerin eldesi ve klinik kullanımı [183].

Biyolojik iskelelerin kullanımıyla ilgili Song ve arkadaşlarının [184] yaptığı bir çalışmada, yara yaması olarak insan amniyotik zarı kullanılmış ve iyileşme üzerine etkisi değerlendirilmiştir. İnsan amniyotik zarı, epitel tabakası, bazal tabaka ve bağ doku tabakasını içeren yarı saydam bir zardır [185]. Deselülerize edilmiş amniyotik zar, kollajen tip I, III ve IV, laminin, fibronektin ve çeşitli büyüme faktörlerini içerir [186, 187]. İnsan amniyotik zarının tercih edilmesinin sebebi, amniyotik zarın deselülerize formunda bulunan lamininin, kollajen IV ile birleşerek EMP iskelesini oluşturması ve böylece deselülerize formun biyolojik olarak daha uyumlu bir yapı oluşturmasıdır [188]. Aynı zamanda deselülerize edilmiş amniyon zarı, hücre ve doku yenilenmesinde görev alan, keratinsit büyüme faktörü (KGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), bFGF ve TGF gibi çeşitli büyüme faktörlerini içerir [189, 190]. Song ve arkadaşları [184], amniyotik zarı deselülerize etmiş ve sıçan yara modelinde yarayı kaplayacak şekilde uygulamıştır. Deselülerize amniyotik zarın, proliferasyon sırasında VEGF ekspresyon seviyesini artırarak vaskülarizasyonu desteklediği ve deri yenilenmesini hızlandırdığı görülmüştür. Aynı

zamanda deselülerize formun, yaranın büzülmesi ve EMP' nin yeniden şekillenmesini sağlayan düz kas alfa aktin seviyesini arttırdığı gözlenmiştir [184]. Elde edilen sonuçlara bakılarak deselülerize edilmiş amniyon zarının, yüksek toleranslı ve düşük maliyetli olmasıyla birlikte erken dönem deri yenilenmesi aşamalarında umut veren bir yara yaması olduğu düşünülebilir.

Milan ve arkadaşlarının [20] yaptığı bir diğer çalışmada, insan göbek kordonu perivasküler hücreleri ile birlikte deselülerize yapı iskelelerinin, diyabetik fare yara modelinde, terapötik etkileri incelemek istenmiş ve *in vivo* olarak yara bölgesine bu iskele implante edilmiştir [20]. Perivasküler hücrelerin, deselülerize yapı iskelesine bağlanmasını kontrol etmek için taramalı elektron mikroskobu analizi ve histolojik boyama yapılmış ve perivasküler hücrelerin iskeleye bağlandığı görülmüştür. Perivasküler hücre kaplı deselülerize yapı iskelesinin, vasküler endotelial büyüme faktörü-2 (VEGFR-2) ekspresyonu yoluyla granülasyon dokusu oluşumunu, epitel rejenerasyonu ve anjiyogenezi arttırdığı, diyabetik farelerde tam kalınlıktaki yaraların iyileşmesini hızlandırdığı gözlenmiştir. Deselülerize yapı iskeleleriyle tedavi edilen gruplarda yapılan Masson-Trikrom boyaması ile, yara iyileşmesinin bir belirteci olan kollajen birikimin arttığı görülmüş ve böylece diyabetik yaralardaki yara oluşumunun azaltılabileceği öngörülmüştür [191]. Tüm bu verilerin ışığında, insan göbek kordonu perivasküler hücreleri ile kaplı deselülerize yapı iskelelerinin, diyabetik fare yara iyileşmesinde, re-epitelizasyonu ve granülasyon dokusunun oluşumunu arttırdığı görülmüştür. Bu çalışma, perivasküler hücre kaplı deselülerize yapı iskelelerinin parakrin etkilerle yara iyileşmesini ve anjiyogenezi desteklediğini gösteren ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır.

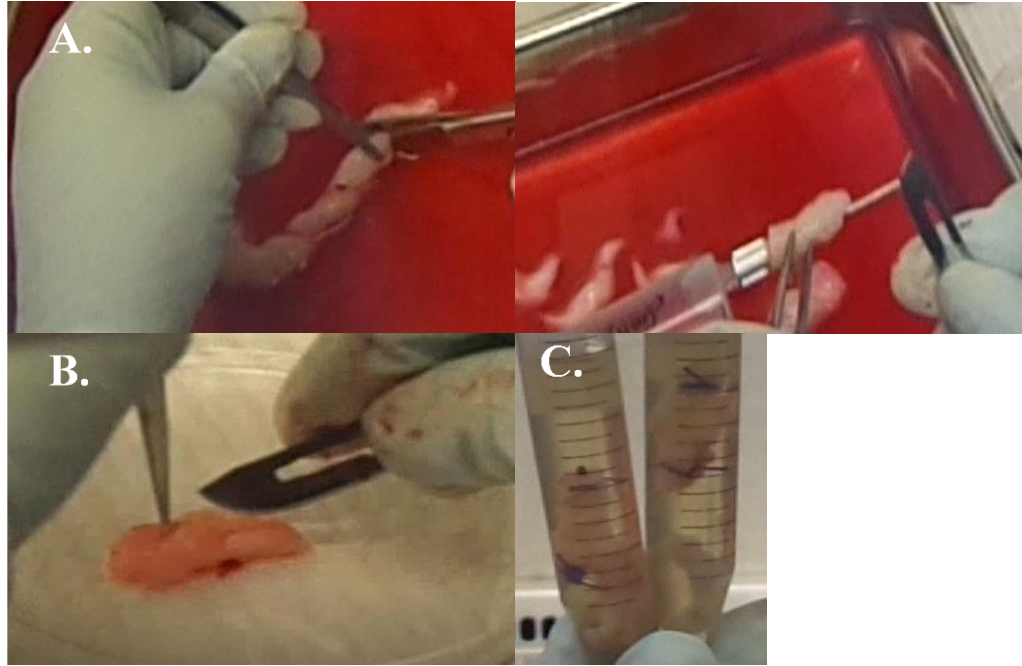
Deselülerize iskelelerin söz konusu avantajları yanında, klinik uygulamalarda kullanımını sınırlayan bazı durumlar bulunmaktadır. Deselülerizasyon sonrasında kullanılan kimyasalların uzaklaştırılması, yara iyileşme sürecini etkilemekle birlikte, bu basamakların etkilerini değerlendirmek için bir standart geliştirilmemiştir. Aynı zamanda biyomalzemeler, otolog veya allojenik dokulardan türetildiği için, virüs ve patojen kaynaklı komplikasyonlara neden olabilir. İskelenin dokuya tam olarak implantasyonu birkaç ayı bulabileceği için bu süreçte iskelenin hücresel bileşimi ve iskele parametreleri çok iyi anlaşılmalıdır [192, 193].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun "GO 18/446-22" no' lu kararıyla alınan insan göbek kordonu örneklerinden izole edilen ve dondurulan CD146+ kök hücreler kullanıldı (n=3). Bu teze ait deneyler, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarları ve Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları kullanılarak, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı kapsamında gerçekleştirildi.

3.1. CD146+ Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

Bir önceki doktora tezi kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Polikliniği'nde, komplikasyon gelişmeyen sezaryen doğum sonrası, normal gelişim süresini tamamlamış bebeklerden elde edilen ve -196°C azot tankında muhafaza edilen insan göbek kordon veni örneklerinden izole edilen CD146+ kök hücreler, bu tez çalışması kapsamında kullanıldı. Göbek kordonu örnekleri üç-dört santimetrelik parçalar halinde kesildi ve lanset yardımıyla ven etrafında bulunan *Wharton Jelly* ve arterler uzaklaştırıldı (Şekil 3.1A). PBS ile yıkamanın ardından ven parçalarının iki ucu ameliyat ipliği ile bağlandı ve kollajenaz ile 37°C' de 18 saat inkübe edildi (Şekil 3.1B-3.1C). Kollajenaz ile inkübasyon sonucu elde edilen hücre süspansiyonları, CD146+ liklerine göre manyetik aktive hücre ayırma (MACs) ile ayrılmışlardır [194]. Azot tankından çıkarılan kryo viallerdeki hücreler, 37°C' deki su banyosunda küçük bir buz kütlesi kalana kadar çözdürüldü. Daha sonra CD146+ kök hücreler, toplam hacim 10 mL olacak şekilde perisit büyüme besiyerinin (PGM, Promocell, Germany) içerisine aktarıldı. 15 mL' lik santrifüj tüplerinde 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi (Eppendorf 5810R, rotor A-4-62) ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet üzerine 1 mL PGM eklenerek pellet çözdürüldü ve ¼ sulandırma yapılarak hücre canlılığı tripan mavisi (Invitrogen, Canada) ile tespit edildi. 100 mm petrilere ve T75 hücre kültür kaplarına ekilen perisit hücreleri 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde muhafaza edildi. Haftada iki kere kültürdeki hücrelerin besiyerleri değiştirildi ve %80-85 konflüense ulaşan hücreler TrypLE (Gibco, USA) solüsyonu ile yüzeyden kaldırıldı ve Pasaj 3' e gelene kadar pasajlamalar yapıldı.



Şekil 3.1. CD146+ hücrelerin insan göbek kordonundan enzimatik yıkım ile izole edilmesi. A) Göbek kordonu parçalarının *Wharton Jelly* ve arterlerden uzaklaştırılması. B) Ven parçalarının iki ucunun ameliyat ipliği ile bağlanması. C) Ven parçalarının kollajenaz ile 18 saat inkübe edilmesi [195].

3.1.1. Akım Sitometri ile CD146+ Kök Hücrelerin Yüzey Belirteç Analizi

Pasaj 3' e gelen insan göbek kordon veni CD146+ kök hücrelerin hücre yüzey belirteçleri akım sitometri ile incelendi. Anti-insan CD146 fitoeritrin (PE) ve anti-insan CD105 allofikosiyanın (APC) (perivasküler hücreler için), anti-insan CD31 floresein izotiyosiyanat (FITC) (endotel hücreleri için), anti-insan CD45 peridinin klorofil proteini (PerCP), anti-insan CD38-APC ve anti-insan CD34-PE (hematopoetik kök hücreler için) kullanıldı. Tüm antikorlar Becton Dickonson firmasından temin edildi. CD146+ kök hücreleri ($2,5 \times 10^5$ hücre/mL) FACS tamponu ile süspansede edildi. Süspansede edilen hücreler 1500 rpm' de santrifüj edilerek çöktürüldü. Daha sonra hücreler floresan-konjuge anti-insan antikorları ile işaretlendi. Bu antikorlarla birlikte hücreler 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. İzotip kontrolü olarak da IgG1-PE, IgG1-FITC ve IgG1-APC kullanıldı ve hücreler FACS tamponu ile üç kere

yıkandıktan sonra FACSAccuri (Becton, Dickinson, USA) ile ölçüm yapıldı. Data analizleri ise BD CSampler software (Becton Dickinson, USA) programında yapıldı.

3.1.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşma Kapasiteleri

Adipojenik Farklılaşma

Üçüncü pasaja gelen CD146+ kök hücreleri, altı kuyucuklu kültür kaplarına 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. %80-85 konfluense ulaşan hücrelerin üzerine adipojenik farklılaşma besiyeri [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-LG), %10 FBS (Gibco), 1 μ M deksametazon (Sigma), 5 μ g/mL insulin (Santa Cruz Biotechnology), 500 μ g/mL izobütilmetilksantin (IBMX, Applichem, Germany), 60 μ M indometasin (Sigma, Saint Louis), %1 penisilin/streptomisin (Sigma, USA)] eklendi. Kontrol kuyucuklarına ise DMEM-HG (Termos Fisher Scientific, UK) eklendi. Tüm hücre grupları 21 gün boyunca 37°C' de %5 CO₂ koşulunda inkübe edildi ve haftada 2 kere taze hazırlanan besiyerleri ile besiyeri değişimi yapıldı. Hücre farklılaşması süreci, kültürün ilerleyen günlerinde *inverted* ışık mikroskobu ile kontrol edildi. 21. günün sonunda adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi için *Oil red-O* boyaması yapıldı. Bu doğrultuda kontrol ve adipojenik farklılaşma kuyucuklarından besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler bir kez fosfat tamponlu salin (PBS, Sigma) ile yıkandı. Yıkama sonrasında, hücrelerin fiksasyonu için 1 mL/kuyucuk %3,7 formaldehit (Merck, Germany) ile 37°C' de 20 dakika muamele edildi. Fiksasyon işleminden sonra kontrol kuyucukları ve adipojenik farklılaşma yapılan kuyucuklar 1 kez PBS ile yıkandı ve birer mL *Oil red-O* eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 10 dakikanın sonunda hücrelerin üzerinden boya uzaklaştırıldı ve 2 kez 2 mL distile su ile tüm kuyucuklar yıkandı. Kontrol ve adipojenik farklılaşma kuyucuklarındaki hücreler arasındaki morfolojik fark *inverted* ışık mikroskobu ile görüntülendi (Olympus CKX41, Japonya).

Osteojenik Farklılaşma

Üçüncü pasajdaki CD146+ hücreleri, altı kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. %80-85 konfluense ulaşan hücreler, osteojenik farklılaşma besiyeri [DMEM-LG, %10 FBS, 10^{-7} M deksametazon (Sigma), 0,2 mM

askorbik asit (Sigma) ve 10 mM β -gliserofosfat (Sigma)] ile 21 gün boyunca 37°C' de %5' lik CO₂ koşulunda inkübe edildi. Haftada iki kere taze hazırlanan besiyerleri ile besiyeri değişimi yapıldı. Hücre farklılaşması süreci, kültürün ilerleyen günlerinde *inverted* ışık mikroskobu ile kontrol edildi. 21 günlük hücre farklılaşması sonunda osteojenik farklılaşma analizi Alizarin Kırmızısı boyaması ile yapıldı. Bu doğrultuda, kontrol ve farklılaşma kuyucuklarındaki besiyerleri uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında, hücrelerin fiksasyonu için 1 mL/kuyucuk %3,7 formaldehit (Merck, Germany) ile 37°C' de 20 dakika muamele edildi. Fiksasyonun ardından kuyucuklar 1 kez PBS ile yıkandı ve birer mL Alizarin Kırmızısı eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerinden boya uzaklaştırıldı ve 2 kez 2 mL distile su ile tüm kuyucuklar yıkandı. Kontrol ve osteojenik farklılaşma kuyucuklarındaki hücreler arasındaki morfolojik fark *inverted* ışık mikroskobu ile görüntülendi.

3.2. Deselülerizasyon İşlemi ve Ekstraselüler Matriks Karakterizasyonu

İnsan göbek kordonu veni CD146+ kök hücreleri, 100 mm petri ve sekiz kuyucuklu plaklarda yedi günlük kültüründen sonra, hücreler tarafından sentezlenen matriks tabakası PBS ile üç kez yıkandı. PBS ile yıkamanın sonrasında, 2×10^{-2} M amonyum hidroksit (Sigma) ve %0,5 triton X-100 (Sigma) ile muamele edilerek 37°C' de 10 dakika inkübe edildi. DNA rezidülerini elimine etmek için, 180 U/mL DNaz-1 (Sigma) ile 37°C' de 1 saat muamele edildi. Üç kez PBS ile yıkamanın ardından, DNA' sız deselülerize matriks tabakası elde edildi.

3.2.1. Histolojik Boyama

Hücreli gruplardaki matriks yapısı ve deselülerize edilen gruplardaki matriks yapısı, Masson Trikrom Kiti (GBL, Türkiye) kullanılarak histolojik boyama değerlendirildi. 100 mm petri ve sekiz kuyucuklu plaklardaki hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra %3,7 formaldehit ile 37°C' de 20 dakika inkübe edildi. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda boyama adımları şu şekilde gerçekleştirildi: 100 mm petri ve sekiz kuyucuklu plaklardaki hücreler üzerine 5 damla A. Weigert demirli hematoksin ve B. Weigert demirli hematoksin damlatıldı ve hafifçe çalkalanarak boyaların birbirine karışması sağlandı. 10 dakikalık inkübasyondan sonra boyalar

uzaklaştırılarak 1 saat boyunca oda sıcaklığında örnekler kurutuldu. İnkübasyon sonrasında, 10 damla C. Pikrik asit alkolik çözeltisi damlatıldı ve 4 dakika sonra boya uzaklaştırılarak distile suyla yıkama yapıldı. Yıkama yapıldıktan sonra, 10 damla D. Gelincik kızılı fuksin çözeltisi damlatıldı ve 4 dakika sonra boya uzaklaştırılarak distile suyla yıkandı. Son adımda ise, 10 damla E. Fosfomolibdik asit çözeltisi ile 10 dakika muamele edildi ve boya uzaklaştırıldıktan sonra örnekler *inverted* ışık mikroskobu ile görüntülendi.

3.2.2. İmmü floresan Boyama

Hücreli gruplardaki matriks yapısı ve matriksin hücrelerden arındırılmış formunu görüntülemek amacıyla, DAPI (AppliChem) çekirdek boyaması yapılarak mikroskop görüntüleri çekildi (Leica CTR6000). 100 mm petri ve sekiz kuyucuklu plaklardaki hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra %3,7' lik formaldehit ile 37 °C' de 20 dakika inkübe edildi. Fiksasyon işleminden sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve 5 dakika %0,2 triton/PBS ile permeabilize edildi. Permeabilizasyon sonrasında hücreler, 2 kez %0,05 Tween (Sigma)/PBS solüsyonu ile yıkandı ve %5 FBS ile 30 dakika blokaj işlemine tabi tutuldu. Blokaj işleminden sonra hücreler ve deselülerize matriks 1 saat süreyle 37 °C' de DAPI (%5 BSA/FBS) boyasıyla işaretlenmesi için inkübe edildi. Floresan boya ile işaretlenen hücreler, floresan mikroskobu (Leica CTR6000) ile görüntülendi.

3.2.3. Deselülerize Matriks Yapısındaki Proteinlerin Tayini-Proteom Analizi

Deselülerize edilen grupların (n=2) matriks yapılarındaki protein tayini için nLC MS/MS kullanılarak proteom analizi Koç Üniversitesi Proteomiks Laboratuvarı' nda gerçekleştirildi. Proteinlerin sindirimi daha önce tarif edildiği gibi yapıldı [196]. Kısaca, deselülerize matriks proteinleri 8 M üre, 50 mM amonyum bikarbonat ve proteaz inhibitör tabletleri içeren bir tamponda liziz edildi. Ultrasonifikasyon sonrasında, lizatlar 14000 g' de 4° C' de 45 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar toplandı. Protein örnekleri, Dithiothreitol ile indirgenip, iyodoasetamid kullanılarak alkilendi. Tripsin eklenmesinden önce örnekler, 50 mM amonyum bikarbonat kullanılarak sekiz kat seyreltildi ve gece boyunca tripsin ile inkübe edildi. Ardından,

%10 formik asit ile asitlendirme sonucu reaksiyon durduruldu ve sindirilen peptitler katı faz ekstraksiyonu (SPE) kullanılarak tuzdan arındırıldı. Sindirilen peptitler, orbitrap kütle spektrometresi (Q Exactive Orbitrap HF, Thermo Scientific) ile birleştirilmiş C18 nano-akış ters faz HPLC' de (Dionex Ultimate 3000, 3500 RSLC nano, Thermo Scientific) 90 dakikalık gradyanlarla analiz edildi. MS1 için tarama parametreleri; 120 000 çözünürlük; AGC 3e6; Max IT 100 ms; Tarama aralığı: 375-1400 m/z ve MS2 için; 30 000 çözünürlük; AGC: 1e5; Max IT: 60 ms; Top 20; İzolasyon aralığı: 1,2 m/2; NCE:26. Ham datalar, Sequest arama motoru ve insan Uniprot veri tabanı (Release 2015) kullanılarak Thermo Scientific Proteome Discoverer 2.3 yazılımında işlendi.

3.3. CD146+ Kök Hücreler ve Ekstraselüler Matriks-Bakteri Ko-Kültürü

Sekiz kuyucuklu plaklardaki hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı tespiti, kontrol ve üzerlerinde *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları kültüre edilen gruplarda analiz edildi. Hücre proliferasyonu tayini için *WST-1 Cell Proliferation Assay Kit*, (Cayman Chemical, USA) ve kristal viyole (Sigma) kullanıldı [197]. Aynı zamanda, *Annexin V Dead Cell Apoptosis Kit* (Invitrogen, USA) ile canlılık tespiti gerçekleştirildi. Hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde gerçekleştiren analiz ve boyama grupları Tablo 3.1' de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde gerçekleştirilen proliferasyon analizleri.

	WST-1	KRİSTAL VİYOLE	ANNEXIN V/PI
Hücreli (Kontrol)	+	+	
Hücreli + <i>S. aureus</i>	+	+	+
Hücreli + <i>P. aeruginosa</i>	+	+	+
Deselülerize + <i>S. aureus</i>		+	+
Deselülerize + <i>P. aeruginosa</i>		+	+
<i>S. aureus</i> (Kontrol)	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> (Kontrol)	+	+	+

WST-1 analizi için kuyucuklardaki besiyeri çekildi ve 200 µl kültür besiyeri + 20 µl *WST-1* karışımı, hücre kültürleri ve yalnızca besiyeri içeren (blank) kuyucuklara eklenerek iki saat 37°C’ de %5 CO₂ koşulunda inkübe edildi. Sekiz kuyucuklu plaklardaki bu karışım, 96 kuyucuklu plaklara plak başına 100 µL olacak şekilde dağıtıldı ve mikropilaka okuyucusunda (Tecan) 450 nm dalga boyunda okundu. Kristal viyole boyamasında ise, 10 mL %4 formaldehit/distile su içerisine 0,5 mg kristal viyole eklendi ve boyanın karışması için hafifçe çalkalandı. 20 dakika 37°C’ de %5’ lik CO₂’ de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında boya örnekler üzerinden çekildi ve *inverted* ışık mikroskobu ile görüntülendi. *Annexin V/PI* boyama için üretici firmanın önerileri doğrultusunda, örneklerin üzerindeki besiyeri çekildi ve önce 1 kez soğuk PBS ile sonrasında ise 1X *Annexin Binding Buffer* (ABB) ile yıkandı. 5,2 mL ABB üzerine, 100 µl *annexin V* (100 µL’ de 5 – 25 µL) ve 32 µL propidium iodide (100 µL’ de 1 – 2 µL) eklenerek her kuyucuğa uygulandı ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, örnekler 1 kez ABB ile yıkandı ve floresan mikroskobu (Leica CTR6000) ile görüntülendi. *Annexin V/PI* boyamasında canlı hücreler zayıf *annexin V* (yeşil renkte) boyaması gösterirken, apoptotik hücreler daha yüksek boyanma göstermektedir. Ölü hücreler ise hem *annexin V* hem de propidium iodide (kırmızı renkte) ile güçlü boyama göstermektedir.

3.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi – Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları kullanıldı. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları *Mueller Hinton* agar (Merck) besiyerine ekilerek gün aşırı üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreyen kültürlerden *Mueller Hinton* sıvı besiyerine ekim yapılarak dört-altı saat kadar daha etüvde inkübe edildi ve sonrasında koloni sayımları her iki mikroorganizma için 0,5 MacFarland bulanıklığı olarak ayarlandı [198]. CD146+ kök hücrelerin besiyeri ortamına salgıladıkları biyomoleküllerin antimikrobiyal etkilerini değerlendirmek amacıyla kültürün birinci ve yedinci günlerinde alınan besiyeri örnekleri üç farklı donör grubu içinde karşılaştırıldı. Negatif kontrol olarak boş besiyeri kullanıldı. Bu besiyerleri disklere emdirilerek bakteri ekilmiş petriyerler içerisine yerleştirildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün

disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları milimetre cinsinden ölçülerek antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildi.

3.5. Biyofilm Yöntemi

3.5.1. Bakteriye İnokulüm Hazırlanması

P. aeruginosa ATCC 47085 ve *S. aureus* ATCC 35556 suşları Triptik Soy sıvı besiyerine (TSA, Merck) ekilerek, 24 saat boyunca 37°C’ de gün aşırı üremeleri sağlandı. 24 saat sonunda üreyen kültürler 5000 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi ve sonrasında 590 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak optik dansite değeri 0,5 olarak ayarlandı ve son inokulüm miktarları 10⁶ kob/mL olarak hazırlanmış oldu.

3.5.2. Sürekli Damlamalı Akış Biyofilm Reaktörü Kullanılarak Dinamik Ortamda Biyofilm Modellerinin Geliştirilmesi

Deselülerize matris ve CD146+ kök hücreler üzerlerinde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi için damlamalı sıvı akış reaktör sistemi kullanıldı. Reaktörde bulunan eğimli alanlara, üzerlerine hücreli ve deselülerize EMP tutturulmuş olan slaytlar yerleştirildikten sonra, son konsantrasyon miktarı 10⁶ kob/mL olarak hazırlanan mikrobiyal inokulümler bu slaytların üzerine yerleştirilerek devamlı temas halinde bulunmaları sağlandı. Bakteri inokulümleri reaktörün her kanalına ayrı ayrı aktarıldıktan sonra bu kanallara sıvı akışları rotasyonel dönen bir disk sayesinde devamlı olarak sağlandı. Bu sistem sayesinde materyalin üzerinde sıvı bir biyofilm yüzeyi oluşumu sağlandı. İlk olarak dört saatlik statik bir inkübasyondan sonra peristaltik pompa yardımıyla 0,82 mL/dk akış hızı ayarlanarak her bir slaytın üzerine sıvı inokulümün akışı toplam 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta sağlandı [85]. 10° açıyla konumlandırılmış olan slaytlar üzerine besiyerinin damlamalı akışı sürekli sağlanarak slaytlar üzerinde olgun biyofilmlerin oluşumu gerçekleştirildi.

3.5.3. Koloni Sayımı

Damlamalı akış reaktörü kullanılarak oluşturulan biyofilm hücrelerinin plak sayım yöntemi ile sayımı için 24 saatin sonunda üzerinde biyofilm oluşmuş slaytlar reaktörün içinden steril koşullarda kaldırıldı ve materyallere tutunmayan planktonik hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak için PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Sonrasında biyofilm oluşumları, slayt yüzeylerinden steril teflon hücre kazıyıcı ile kazınarak hücre kümelerini homojenize bir şekilde ayrıştırmak için vorteksleme ve sonikasyon basamakları gerçekleştirildi [199]. Ayrışma sonrasında, biyofilm hücre süspansiyonları PBS içinde seri olarak seyreltildi ve Triptik Soy Agar besiyerine plak ekim yöntemiyle ekildi [85]. 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından, koloniler mililitre başına koloni oluşturan birimler (kob/mL) olarak sayıldı.

3.6. Biyofilm ile İlişkili Genlerin mRNA Seviyelerinin Ölçülmesi

3.6.1. Biyofilmlerden Total RNA Ekstraksiyonu

S. aureus ve *P. aeruginosa* biyofilm hücrelerinde aderans ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri kantitatif RT-PZR yöntemi ile belirlendi. Biyofilm hücrelerinden mRNA ekstraksiyonunu yapabilmek amacıyla, matriks materyalleri PBS içine alındı ve sonikasyon ve vorteksleme işlemlerine maruz bırakılarak tutunmuş olan hücrelerin PBS içine salınımı gerçekleştirildi. Sonrasında sıvı hücre süspansiyonları falkon tüpleri içine toplanarak santrifüjleme işlemi ile peletin dibe çökmesi sağlandı. Biyofilm hücre peletlerinden RNA ekstraksiyonunu sağlamak için “Fast Start Essential DNA Probes Master” (Roche Life Science, Version 12, USA) Kit’ i kullanılarak firmanın önerileri çerçevesinde protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Santrifüj edilerek çöktürülen biyofilm hücre pelet eldesinden 1mL alındı ve 1,5 mL’ lik ependorf tüplerinde 2000 g’ de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pelet, 10 mM 200 µL tris içinde süspanse edildi ve ortama final konsantrasyonu 50 mg/mL olan 4 µL lizozim eklenerek 37 °C’ de 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında pelet üzerine 400 µL lizis tamponu eklendi ve iyice karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Örnek yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve filtre üzerinden pipetleme yapıldı. Örnek 8000 g’ de 15 saniye santrifüj edilerek alta kısma geçen sıvı uzaklaştırıldı ve 90 µL DNaz inkübasyon tamponundan eklenerek oda

sıcaklığında bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 500 µL yıkama tamponu I' den eklenerek 8000 g' de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atılarak işlem 500 µL yıkama solüsyonu 2 eklenerek tekrarlandı. 200 µl yıkama tamponu II eklenerek iki dakika boyunca maksimum hızda (13.000 g) santrifüj edildi. Toplama tüpü içinde bulunan filtre, 1,5 mL' lik yeni santrifüj tüpüne aktarıldı ve 100 µL elüsyon tamponu eklenerek 8000 g' de 1 dakika santrifüj edildi. RNA içeren solüsyon kantitatif RT-PZR analizi için kullanıma hazır hale geldi.

3.6.2. cDNA sentezi ve Kantitatif Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Ekstrakte edilen RNA konsantrasyonları spektrofotometrik ölçüm cihazı (NanoDrop ND1000) kullanılarak belirlendi. Ölçülen RNA miktarları her örnek başına 100 ng/µL olacak şekilde belirlendi ve RNA ekstraktları cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, USA) kullanılarak uygun primerler vasıtasıyla tek zincirli komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürüldü. cDNA eldesi için kullanılan ajanlar, PZR tüplerinde son hacim 20 µL olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra vortekslenip, eş zamanlı kantitatif zincir reaksiyonunda; 25° C' de 10 dakika, 42° C' de 60 dakika, 99° C' de 5 dakika, 4° C' de ∞ (bir siklus) cihaza yerleştirildi.

3.6.3. cDNA' ların Real-Time PZR Yöntemi Kullanılarak Çoğaltılması

Elde edilen cDNA' lar eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyon cihazında çoğaltıldı ve elde edilen ışımalara göre eşik değerleri belirlendi. Çalışmada kullanılan primerler literatürden alınmış olup her bir deney koşulu için özgüllükleri erime eğrisi analizi ile belirlendi. *S. aureus* için 16sRNA geni (Tablo 3.2), *P. aeruginosa* için ise proC referans geni (Tablo 3.3) olarak kullanıldı. Test genleri için ekspresyon verileri referans gen seviyelerinin geometrik ortalamalarına göre normalize edildi.

Tablo 3.2. *S. aureus* için kullanılan primer dizileri.

<i>S. aureus</i> Primer Sekansı (5'-3')		
Hedef Gen	Forward Primer	Reverz Primer
icaR	TGCTTTCAAATACCAACTTTCAAG A	TGCTTTCAAATACCAACTTTCAA GA
icaA	AAGCCAACGCACTCAATCAAGG	GGATTACCTGTAACCGCACCAA
icaD	ACCCAACGCTAAAATCATCG	GCGAAAATGCCCATAGTTTC
icaB	ATACCGGCGACTGGGTTTAT	TTGCAAATCGTGGGTATGTGT
icaC	CTTGGGTATTTGCACGCATT	GCAATATCATGCCGACACCT
*16S rRNA	GGGACCCGCACAAGCGGTGG	GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA

Tablo 3.3. *P. aeruginosa* için kullanılan primer dizileri.

<i>P. aeruginosa</i> Primer Sekansı (5'-3')		
Hedef Gen	Forward Primer	Reverz Primer
pslA (pa22)	CGCTCACGGTGATTATGTTC	TACATGAACAACAGCAGGCA
pelA (pa3064)	ACAGCCAGGTAATGGAC CTC	AAGCTGTCCAGGGTATCGAG
lasR	ACGCTCAAGTGGAATAATTGG	GTAGATGGACGGTTCACAGA
lasI	CTACAGCCTGCAGAACGACA	ATCTGGGTCTTGGCATTGAG
rhIR	AGGAATGACGGAGGCTTTTT	CCCGTAGTTCTGCATCTGGT
*proC	GGCGTATTTCTTCCTGCTGA	CCTGCTCCACTAGTGCTTCG

*Referans gen

Çalışmada elde edilen ekspresyon değerleri döngü eşik değerleri (Ct) baz alınarak belirlendi. Elde edilen ekspresyon verileri “ekspresyon oranı” hesaplanarak

analiz edildi. Her deney koşulu için ekspresyon oranı aşağıda belirtilen Formül 3.1.' e göre hesaplandı [200].

$$\text{Ekspresyon oranı} = (\text{Etest geni}) \Delta \text{CP}_{\text{test geni}} (\text{kontrol- test}) / (\text{Ehousekeeping geni}) \Delta \text{CP}_{\text{housekeeping geni}} (\text{kontrol- test}) \quad (\text{Formül 3.1.})$$

Ekspresyon oranı, gen ekspresyon oranındaki değişimi katsayı olarak bize vermektedir. Ekspresyon oranındaki artış, azalış veya değişim bulunmaması aşağıda belirtilen parametreye göre belirlenmektedir:

Ekspresyon oranı >2 ise ekspresyonda artış bulunmaktadır,
 Ekspresyon oranı $<0,5$ ise ekspresyonda azalış bulunmaktadır,
 $0,5 < \text{Ekspresyon oranı} < 2$ ise arada fark gözlenmemiştir.

3.7. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

Olgun biyofilm oluşumlarından sonra, slaytlar damlamalı akış reaktöründen çıkarılarak 1 mL tampon çözeltisi ile yıkandı ve cam elmasla kesildi. Kesilen tüm parçalar steril distile su ile yıkandı ve %2 glutaraldehit (Sigma-Aldrich) ve 0,1 M kakodilat içeren bir tampon ile muamelem edilerek 30 dakika boyunca fikse edildi. Örnekler 10 dakika boyunca 0,2 M kakodilat üç kez yıkandıktan sonra seri etanol (%30, %50, %70, %90, %100) solüsyonlarından geçirilerek dehidrate edildi ve altın kaplama yöntemi kullanılarak altın paladyum ile kaplandı [201]. Tüm ön hazırlık işlemleri yapıldıktan sonra SEM' de incelenmesi için Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarları' ndan hizmet alımı yapıldı.

3.8. Verilerin Analizi

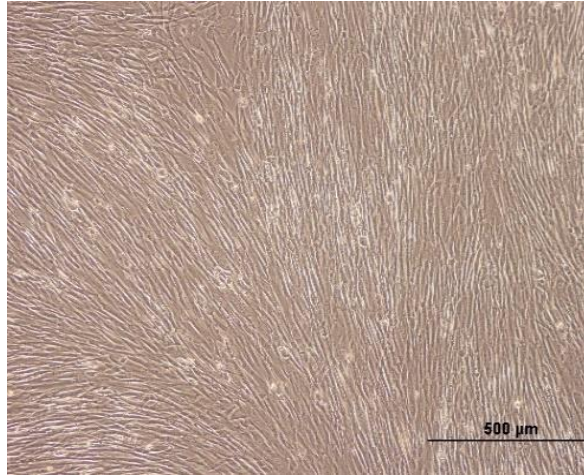
İstatiksel analizler SPSS Inc. yardımı ile farklı deney grupları arasında karşılaştırmalar yapılarak ve t-test, ANOVA, parametrik ve non-parametrik analiz yöntemleri kullanılarak yapıldı. P değeri 0,05' ten küçük olan karşılaştırmalar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. CD146+ Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

İnsan göbek kordon veni kaynaklı CD146+ kök hücreler, üç-dört gün içinde kültür kabı yüzeyine tutunmaya başladı. Pasaj üçte kültürün yedinci gününde çekilen ışık mikroskobu görüntülerine göre, hücreler %90-95 konfluense ulaşmış olarak gözlemlendi (Şekil 4.1). PGM ile kültüre edilen perisit hücrelerinin morfolojik görüntüleri, büyük, iğsi uzantıları olan, yoğun fibroblast benzeri görünümde hücreler olarak tanımlandı (Şekil 4.1).

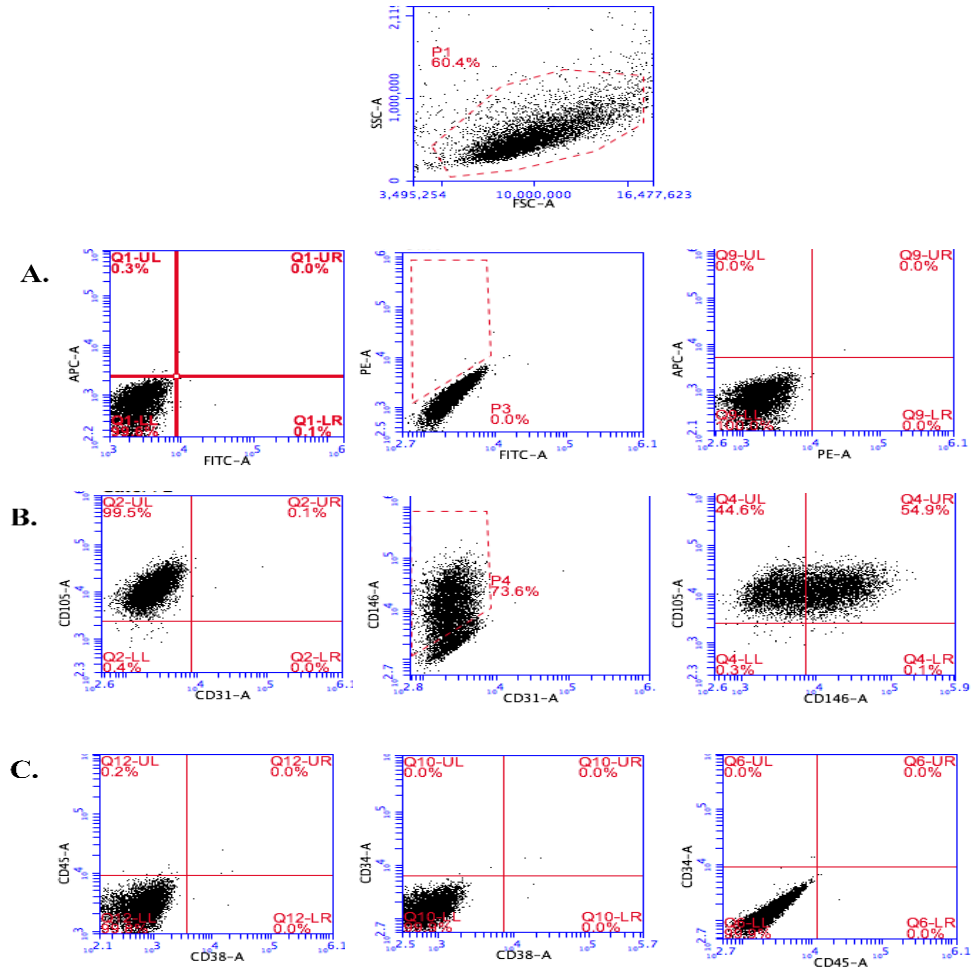
7.Gün



Şekil 4.1. İnsan göbek kordon veni CD146+ kök hücrelerin PGM besiyeri ile kültürleri 7.gün morfolojik görüntüleri.

4.1.1. Akım Sitometri ile CD146+ Kök Hücrelerin Yüzey Belirteç Analizi

Pasaj 3' te bulunan insan göbek kordon veni CD146+ kök hücrelerinin sahip oldukları hücre yüzey belirteçleri, akım sitometri yöntemiyle değerlendirildi. Elde edilen verilere göre (Şekil 4.2); perivasküler hücrelerin yüksek oranda; CD146 ($69 \pm 5,3$, $n=3$) ve CD105 ($98 \pm 2,0$, $n=3$) belirteçlerini ifade ettikleri görüldü. Endotel hücre belirteci olan CD31 ekspresyonu düşük oranda ($1,2 \pm 0,7$, $n=3$) saptandı (Şekil 4.2). Hematopoetik kök hücre belirteçleri ise CD34 ($1,8 \pm 1,0$, $n=3$), CD45 ($0,5 \pm 0,5$, $n=3$) ve CD38 ($0,0 \pm 0,0$, $n=3$) çok düşük oranda gözlemlendi (Şekil 4.2).

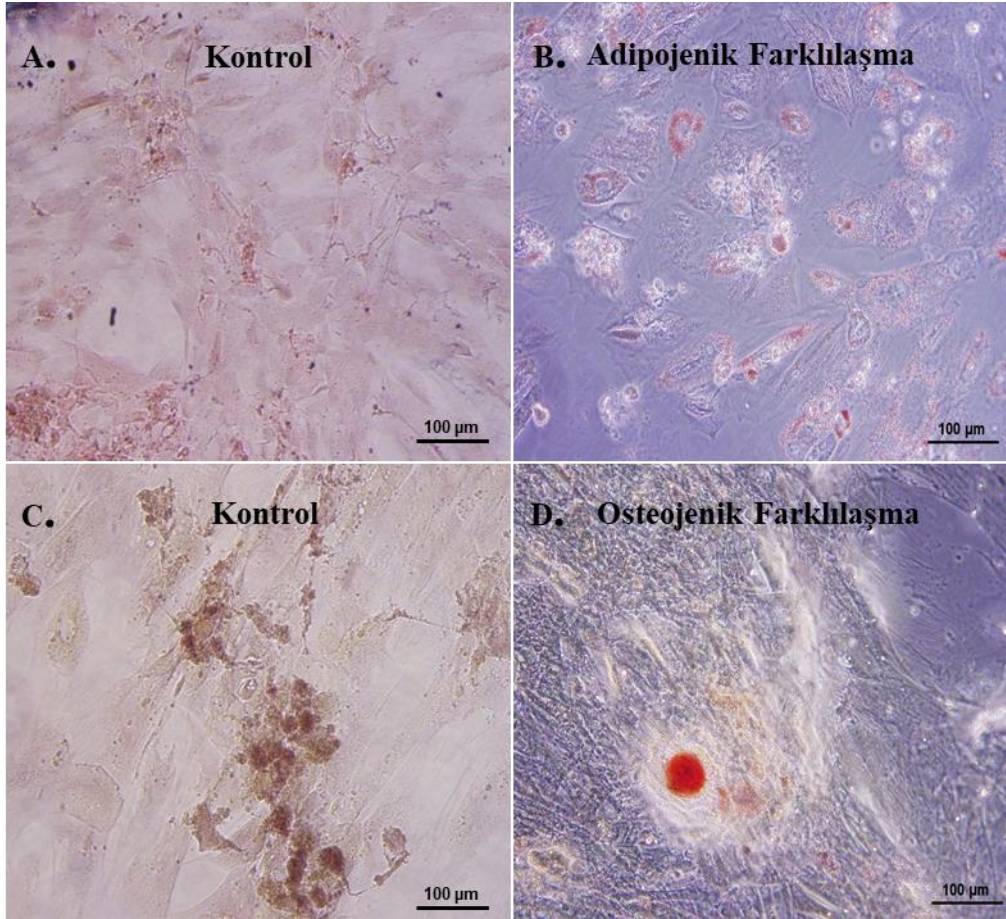


Şekil 4.2. Pasaj üçteki CD146+ kök hücrelerin akım sitometri ile hücre yüzey belirteçlerinin tayini. A) İzotipler. B) CD146, CD105, CD31 ifade eden hücreler. C) CD45, CD38, CD34 ifade eden hücreler.

4.1.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşma Kapasiteleri

21 gün süreyle kültüre edilen CD146+ kök hücrelerinin, adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri, uygun farklılaşma besiyerleri içinde, sırasıyla *Oil red-O* ve Alizarin Kırmızısı boyama metodları ile belirlendi. Adipojenik farklılaşma sonucu, kontrol gruplarına göre, CD146+ kök hücrelerin sitoplazmaları içinde adipojenik farklılaşma belirtisi olan yağ damlacıklarının oluştuğu görüldü (Şekil 4.3). CD146+ kök hücrelerin, osteojenik farklılaşmalarının kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi sonucunda, Alizarin Kırmızı ile boyanması beklenen kalsiyum agregatlarının nadiren ya da hiç oluşmadığı görüldü (Şekil 4.3). 21 gün boyunca

DMEM-HG ile kültüre edilen kontrol gruplarında adipojenik veya osteojenik farklılaşma gözlemlenmedi (Şekil 4.3).



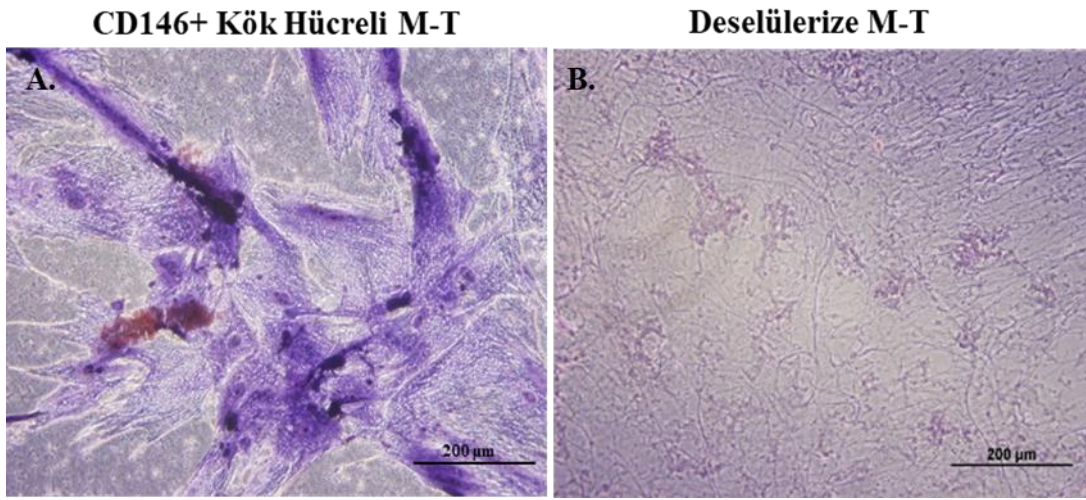
Şekil 4.3. İnsan göbek kordon veni CD146+ kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin *Oil Red-O* ve Alizarin Kırmızısı boyama metodlarıyla belirlenmesi.

4.2. Hücre Kültürü Sonrası Ekstraselüler Matriks Üretimi ve Deselülerizasyon İşlemi

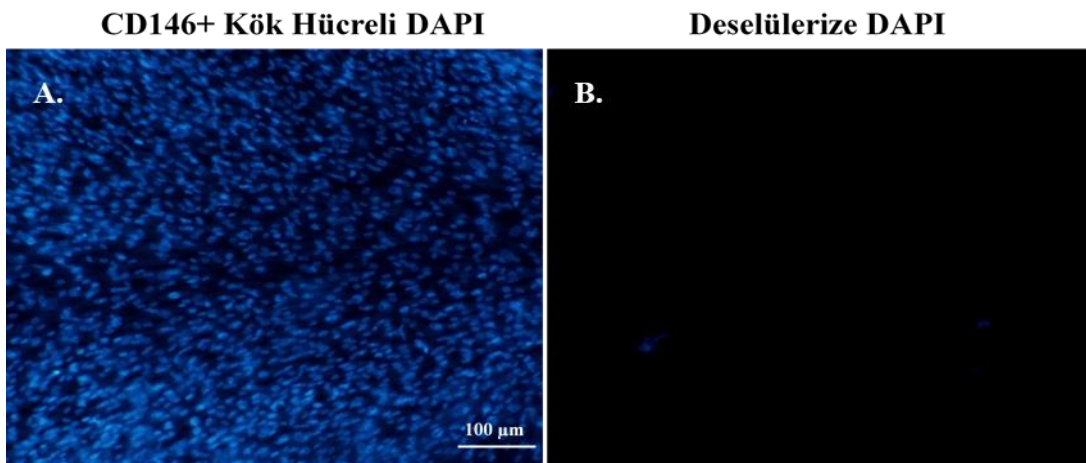
4.2.1. Deselülerizasyon İşlemi ve Ekstraselüler Matriks Protein Karakterizasyonu

Yedi gün boyunca 100 mm petripler ve sekiz kuyucuklu plaklarda, PGM besiyeri ile kültüre edilen insan göbek kordon veni CD146+ kök hücrelerine

deselülerizasyon işlemi uygulandı. Hücreli ve deselülerize edilmiş gruplarda, matriks varlığını tespit etmek için Masson Trikrom histolojik boyaması yapıldı ve deselülerize edilen gruplarda hücrelerden arındırılmış ekstraselüler matriksin ağısı yapısı net bir şekilde gözlemlenmedi (Şekil 4.4). DAPI çekirdek boyaması ile, hücreli ve deselülerize edilmiş gruplarda hücre çekirdek varlığı analiz edildi (Şekil 4.5). DAPI boyaması sonucunda, deselülerize edilen gruplarda hücreli gruplara kıyasla, çekirdek varlığı bakımından büyük bir azalma görüldü (toplam alanda sadece bir-iki çekirdek).



Şekil 4.4. CD146+ kök hücreli ve deselülerize gruplarda Masson-Trikrom boyaması.



Şekil 4.5. CD146+ kök hücreli ve deselülerize gruplarda DAPI boyaması.

4.2.2. Deselüerize Matriks Yapısındaki Proteinlerin Tayini-Proteom Analizi

Deselüerize edilen grupların matriks yapılarındaki protein tayini için nLC MS/MS kullanılarak proteom analizi Koç Üniversitesi Proteomiks Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deselüerize matriks yapısında bulunan kollajen, glikoprotein, proteoglikan ve büyüme faktörlerinden oluşan matriks proteinleri Tablo 4.1'de gösterilmektedir. Deselüerize matriks yapısında; kollajen tip I, III, IV, V, VI, XII, XVI, XVIII, glikoprotein olarak; fibronektin tip III, fibrillin I-II, tenaskin-X, vimentin, nidogen-I-II, fibulin I-II, von Willebrand Faktör A, kaldesmon, periostin, vitronektin, ekstraselüler matriks protein I, laminin alt birimi gama I, fibrinojen beta zinciri, proteoglikanlar; versikan, biglikan, bazal membrana özgü heparan sülfat proteoglikan çekirdek proteini, büyüme faktörleri; büyüme faktörü beta kaynaklı protein Ig-h3, büyüme farklılaşma faktörü XV, insülin benzeri büyüme faktörü II, transforme edici büyüme faktörü beta I, epidermal büyüme faktörü protein VII, fibroblast büyüme faktörü II, insülin benzeri büyüme faktörü mRNA-bağlayıcı protein III bulundu (Tablo 4.1).

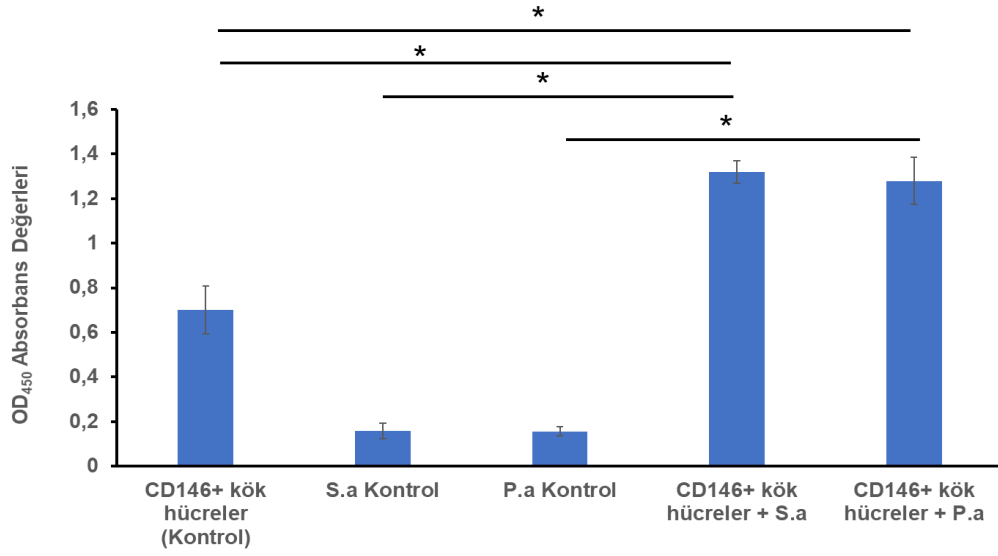
Tablo 4.1. Deselülerize matris yapılarındaki proteinlerin proteom analizleri.

Accession	Description	Coverage [%]	Peptides	PSMs	Unique Peptides	AAs	MW [kDa]	calc. pI
COLLAGENS								
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain COL6A3	58	157	216	157	3177	343.5	6.68
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain COL12A1	26	62	70	62	3063	332.9	5.53
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain COL6A1	46	38	54	38	1028	108.5	5.43
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain COL6A2	29	27	37	27	1019	108.5	6.21
P20908	Collagen alpha-1(V) chain COL5A1	16	17	24	17	1838	183.4	5.06
P02452	Collagen alpha-1(I) chain COL1A1	15	17	23	17	1464	138.9	5.8
P39060	Collagen alpha-1(XVIII) chain COL18A1	10	14	16	14	1754	178.1	6.01
P08572	Collagen alpha-2(IV) chain COL4A2	8	10	13	10	1712	167.4	8.66
Q07092	Collagen alpha-1(XVI) chain COL16A1	9	9	10	9	1604	157.7	7.84
P05997	Collagen alpha-2(V) chain COL5A2	7	8	8	8	1499	144.8	6.46
P02461	Collagen alpha-1(III) chain COL3A1	5	5	6	5	1466	138.5	6.61
P02462	Collagen alpha-1(IV) chain COL4A1	5	6	7	6	1669	160.5	8.28
GLYCOPROTEINS								
P02751	Fibronectin	68	148	359	148	2386	262.5	5.71
P35555	Fibrillin-1	49	109	188	104	2871	312	4.93
P24821	Tenascin	53	102	156	102	2201	240.7	4.89
P08670	Vimentin	93	61	102	59	466	53.6	5.12
Q14112	Nidogen-2	28	31	37	30	1375	151.2	5.29
P35556	Fibrillin-2 FBN2	22	45	50	40	2912	314.6	4.86
P98095	Fibulin-2 FBLN2	28	21	27	21	1184	126.5	4.82
P23142	Fibulin-1 FBLN1	25	14	19	14	703	77.2	5.22
Q6PCB0	VWA1	20	5	5	5	445	46.8	7.68
Q05682	Caldesmon CALD1	9	6	7	6	793	93.2	5.66
Q15063	Periostin	12	6	6	6	836	93.3	7.53
P04004	Vitronectin VTN	5	3	4	3	478	54.3	5.8
Q16610	Extracellular matrix protein 1 ECM1	31	9	9	9	540	60.6	6.71
P11047	Laminin subunit gamma-1 LAMC1	6	6	6	6	1609	177.5	5.12
P14543	Nidogen-1	3	2	2	1	1247	136.3	5.29
Q53EP0	Fibronectin type III domain- containing protein 3B FNDC3B	4	3	3	3	1204	132.8	5.95
P22105	Tenascin-X TNXB	1	3	3	3	4242	457.9	5.17
P02675	Fibrinogen beta chain	3	2	2	2	491	55.9	8.27
PROTEOGLYCANS								
P13611	Versican	11	29	41	29	3396	372.6	4.51
P21810	Biglycan	10	2	2	2	368	41.6	7.52
P98160	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	49	135	206	135	4391	468.5	6.51
GROWTH FACTORS								
Q15582	Transforming growth factor- beta-induced protein ig-h3 Growth/differentiation factor 15 GDF15	65	41	65	41	683	74.6	7.71
Q99988	Insulin-like growth factor 2	62	13	16	13	308	34.1	9.66
Q9Y6M1	IGF2BP2	14	5	6	4	599	66.1	8.46
O43294	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 TGFB111	14	4	4	4	461	49.8	7.03
Q9UHF1	Epidermal growth factor-like protein 7 EGFL7	17	2	2	2	273	29.6	8.16
P09038	Fibroblast growth factor 2 FGF2	9	3	3	3	288	30.8	11.18
O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 IGF2BP3	5	2	2	1	579	63.7	8.87

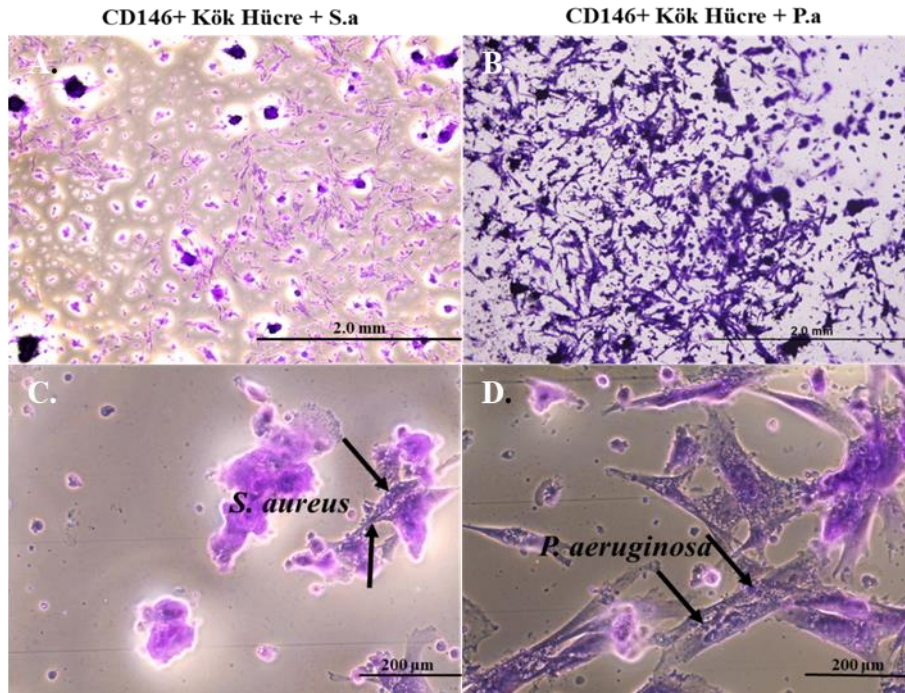
Coverage (%); tanımlanan peptidlerin kapsadığı protein dizilerinin yüzdesi, Peptides; tanımlanan peptid sayısı, PSM; peptid - spektrum eşleşmeleri sayısı, Unique Peptides; tanımlanan benzersiz peptid sayısı, AAs; total amino asit uzunluğu, MW (kDa); moleküler ağırlık, pI; izoelektrik noktası

4.3. CD146+ Kök Hücreler ve Deselülerize Matriks - Bakteri Ko-Kültürü

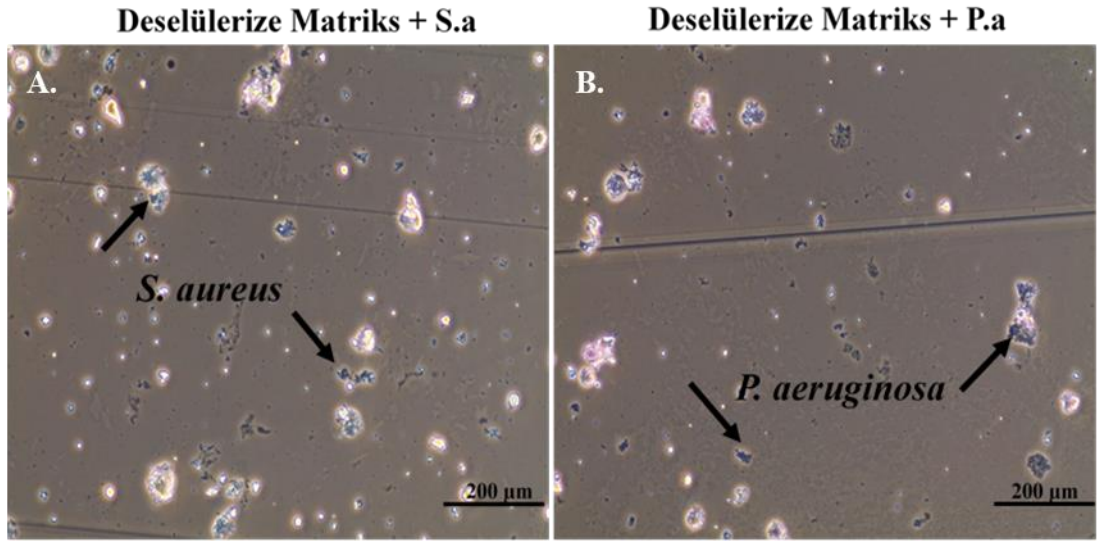
Sekiz kuyucuklu plaklardaki hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde, hücre proliferasyonları WST-1 ve kristal viyole boyaması ile canlılık testi, *Annexin V/PI* immünfloresan boyama ile analiz edildi. WST-1 testi sonucu elde edilen verilere göre, CD146+ kök hücre + bakteri grubunun, kontrol (hücre ve bakteri) gruplarına kıyasla daha yüksek bir proliferasyon gösterdiği bulundu (Şekil 4.6). Bu da bakterilerin hücrelere tutunduklarını, yüzeyde çoğaldıklarını ve hücrelerinde bakterilerin tutunması için uygun koşulları sağladığını göstermektedir. Şekil 4.7' deki CD146+ kök hücre + *S. aureus* (S.a) ve CD146+ kök hücre + *P. aeruginosa* (P.a) kristal viyole boyaması sonucunda, hücre yapısı net bir şekilde gözükmemektedir. Hücrelerin üzerindeki bakterilerin ise küçük büyütmede net bir şekilde gözükmemekle birlikte küçük koyu kümeler halinde hücre yüzeyine lokalize oldukları gözlemlendi. Deselülerize ekstraselüler matriks yapısı üzerindeki bakterilerin görüntülenmesi için daha yüksek bir büyütmede (40x) kullanılarak görüntülemeler gerçekleştirildi. Deselülerize örneklerde, CD146+ kök hücreli gruplara kıyasla daha az bakteri kümeleri görüldü (Şekil 4.8). *Annexin / PI* boyama ile CD146+ kök hücreler üzerinde kültüre edilmiş *S. aureus* örneklerinde, CD146+ kök hücreler canlılıklarını korurken az oranda bakteriyel apoptoz gözlemlenmiş olup *P. aeruginosa* ile ko-kültür edilen örneklerde, daha fazla bakteriyel apoptoz kümeler halinde gözlemlenmektedir (Şekil 4.9). Deselülerize ekstraselüler matriks üzerinde kültüre edilen bakteriyel koloniler ile ilgili canlılık tayini, malzemenin ışığa vermesinden dolayı net olarak floresan mikroskopunda gözlemlenememiştir (Şekil 4.10).



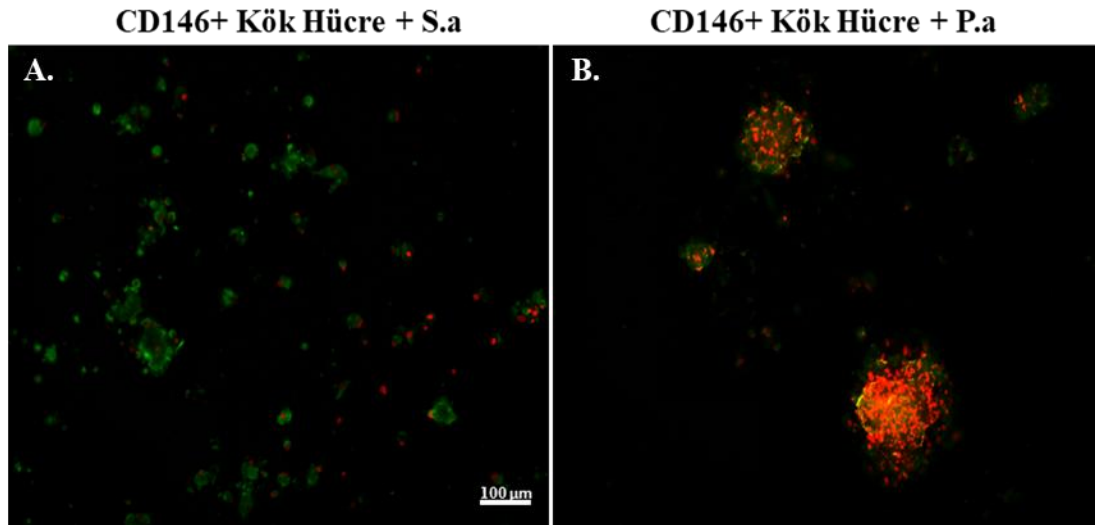
Şekil 4.6. Hücre proliferasyon analizi. S.a: *S. aureus*, P.a: *P. aeruginosa*.



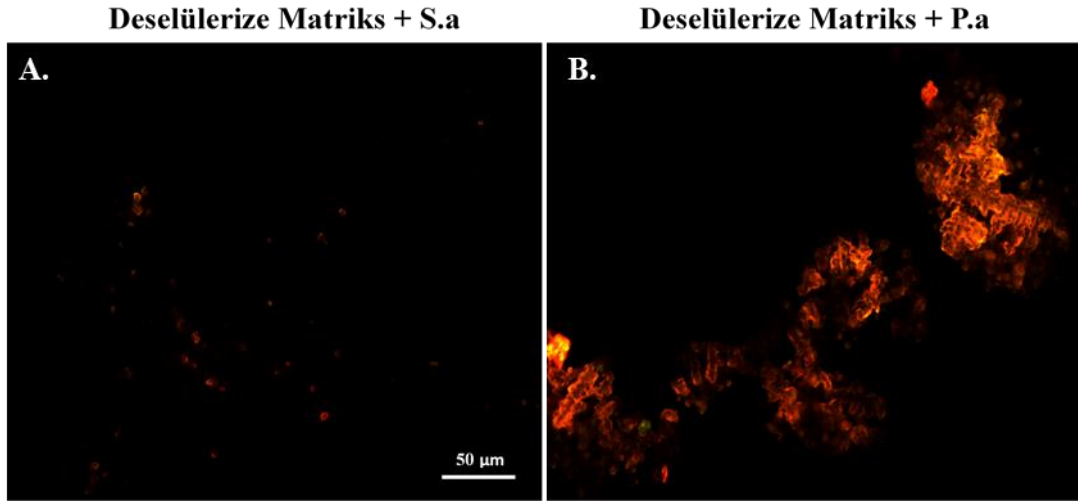
Şekil 4.7. CD146+ kök hücre + *S. aureus* ve CD146+ kök hücre + *P. aeruginosa* gruplarında kristal viyole boyaması. S.a: *S. aureus*, P.a: *P. aeruginosa*.



Şekil 4.8. Deselülerize matriks + *S. aureus* ve deselülerize matriks + *P. aeruginosa* gruplarında kristal viyole boyaması. S.a: *S. aureus*, P.a: *P. aeruginosa*.



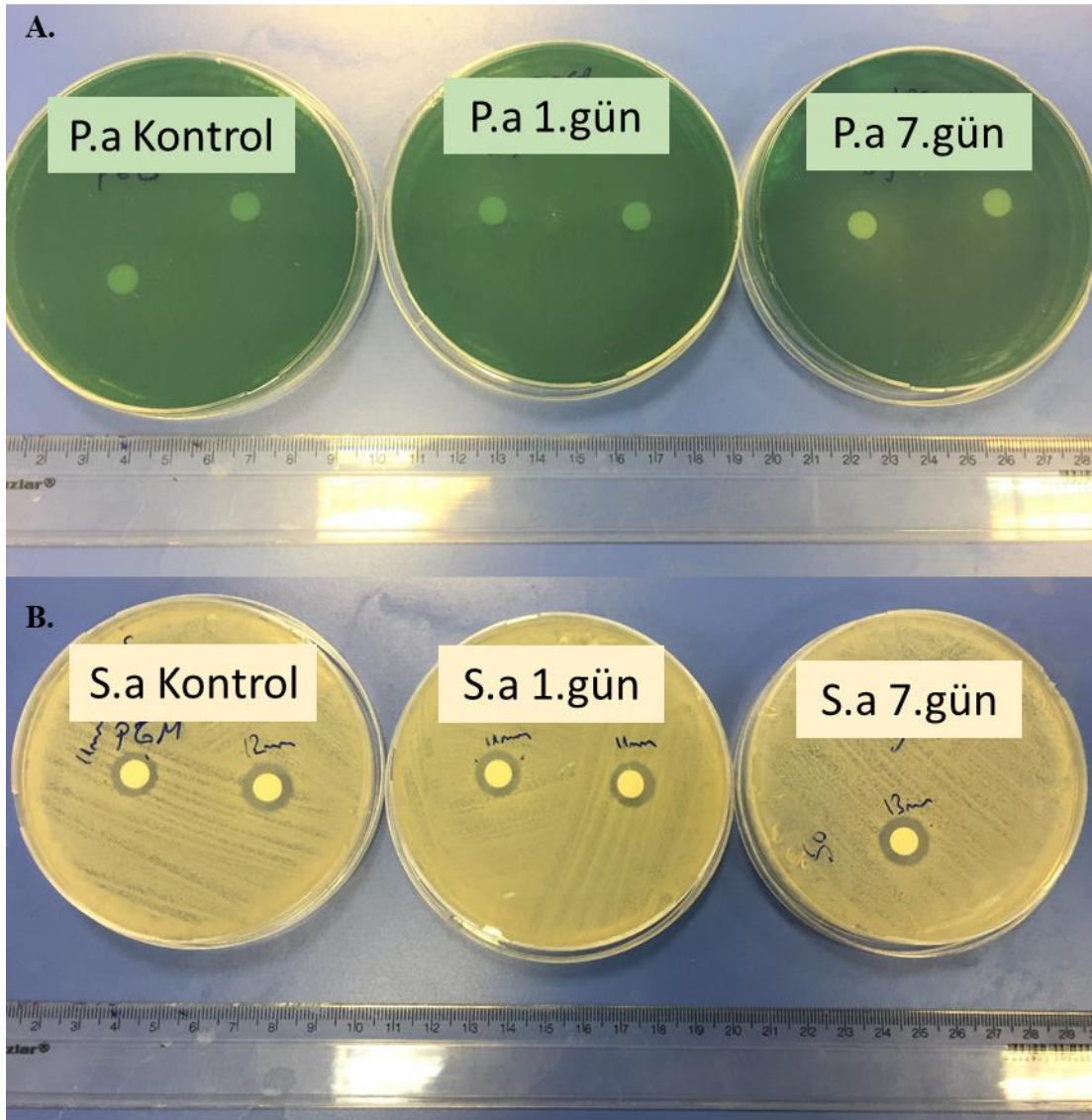
Şekil 4.9. CD146+ kök hücre ve bakteri ko-kültürlerinde Annexin V/PI boyaması. S.a: *S. aureus*, P.a: *P. aeruginosa*.



Şekil 4.10. Deselülerize gruplarda Annexin V/PI boyaması. S.a: *S. aureus*, P.a: *P. aeruginosa*.

4.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

Hücreli gruplardaki matriks yapılarının antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan disk difüzyon testinde, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* suşları kullanıldı ve aralarındaki fark incelendi. 24 saatlik inkübasyonun ardından, inhibisyon zonları ölçülerek antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildi (Şekil 4.11A). Kültürdeki hücrelerin sekresyonlarının antimikrobiyal etkilerinin olup olmadığı, üç farklı deney grubu için, steril besiyeri (kontrol), kültürün birinci ve yedinci günlerinde alınan besiyeri örnekleri kullanılarak araştırıldı (Şekil 4.11B). Hem *P. aeruginosa* hem de *S. aureus*' da kontrol grubuna kıyasla kültürün birinci ve yedinci günlerinde alınan besiyeri örneklerinin inhibisyon zonları bakımından herhangi bir fark göstermediği gözlemlenmedi.

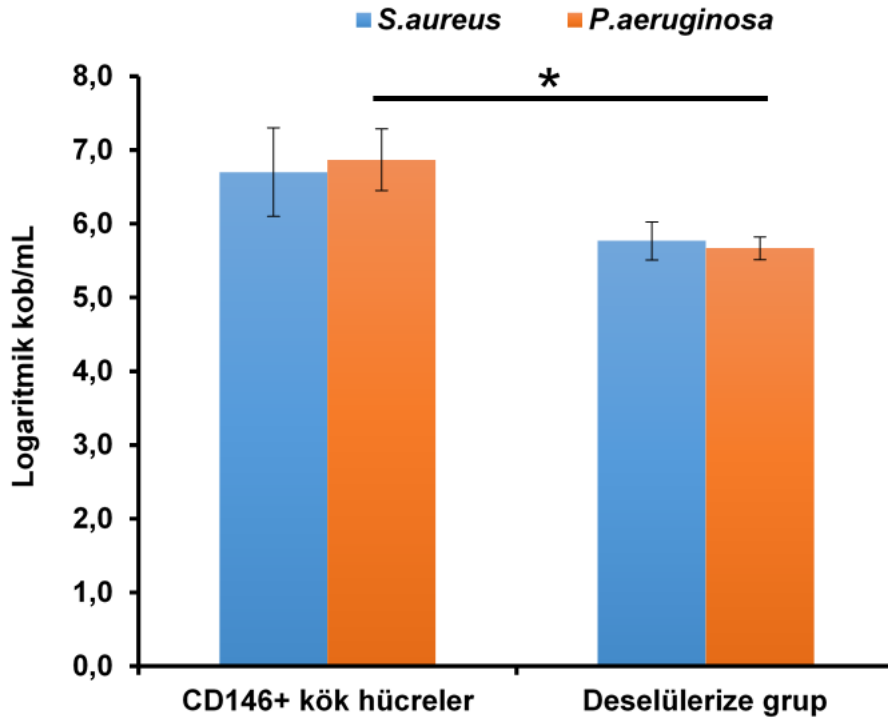


Şekil 4.11. CD146+ kök hücre *conditioned* medyumları ile antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi. A) P.a: *P. aeruginosa*. B) S.a: *S. aureus*.

4.5. Biyofilmlerin Oluşturulması

CD146+ kök hücrelerin ve deselülerize edilen gruplardaki EMP'lerin üzerinde biyofilm oluşulması amacıyla, ilk dört saat boyunca bakteriyel inokulümler ile statik ortamda inkübe edilen slaytlar süre sonunda TSB besiyerinin damlamalı olarak akışının sağlanması ile 20 saat daha inkübasyona devam edildi. 24 saatin sonunda TSA besiyerlerine ekimleri yapılan hücrelerin mililitredeki koloni sayımları yapılarak

aralarındaki logaritmik fark istatistiksel olarak değerlendirildi (Şekil 4.12). Elde edilen verilere göre *P. aeruginosa* için; deselülerize edilen grupta kontrol grubuna (CD146+ kök hücreli ko-kültür) oranla mikrobiyal hücre sayısında istatistiksel olarak azalış ($6,9 \pm 0,41$ vs. $5,7 \pm 0,15$, $n=3$, $p < 0,05$) gözlemlendi. *S. aureus* için bakıldığında, hücreli ($6,7 \pm 0,6$, $n=3$) ve deselülerize ($5,7 \pm 1,25$, $n=3$) gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

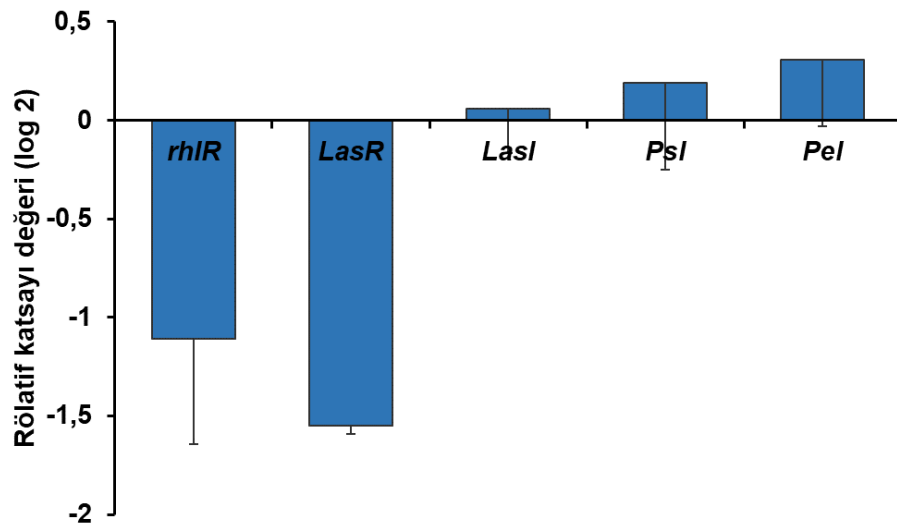


Şekil 4.12. Damlamalı akış reaktör sistemi kullanılarak oluşturulan biyofilmlerin CD146+ kök hücreler ve deselüerize gruplar üzerindeki etkileri. *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*.

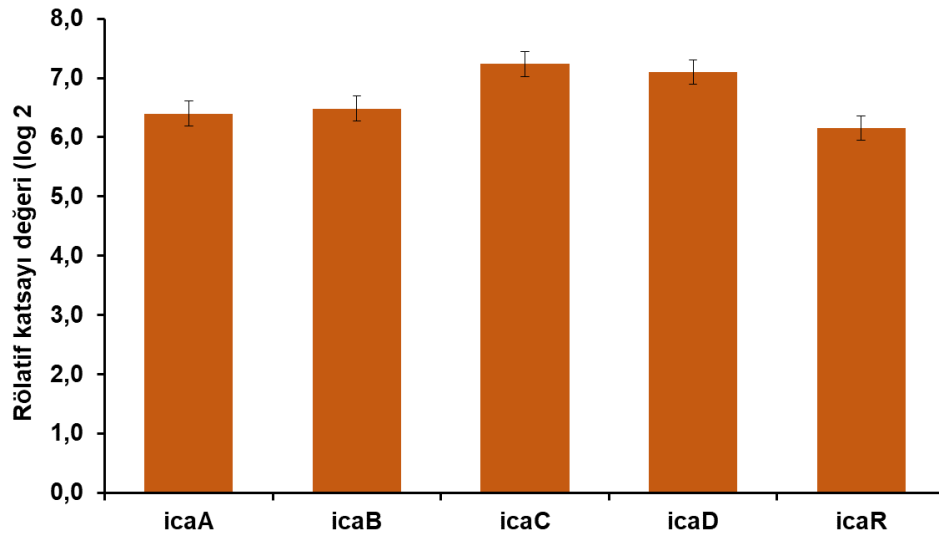
4.6. *S.aureus* ve *P.aeruginosa*' da Biyofilm ile İlişkili Genlerin İfadesi

CD146+ kök hücreli ve deselüerize edilen gruplarda, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*' un biyofilm ile ilişkili genlerindeki ekspresyon farklılıklarını gözlemlemek amacıyla eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Şekil 4.13' de *P. aeruginosa* için çalışılan genlerin ekspresyon sonuçları gösterilmektedir. *P.*

aeruginosa için *rhlR* ve *LasR* genlerinin seviyesinde anlamlı bir azalma ($2,0 (\log_2) \pm 0,53$ ve $0,84 (\log_2) \pm 0,04$, $n=3$, $p < 0,05$) olup diğer genlerdeki değişim anlamlı olarak gözlemlenmedi (Şekil 4.13). Azalım gözlenen *rhlR* ve *LasR* genleri biyofilm oluşumunun ilk basamağı olan tutunma ile ilgili genler olup biyofilm hücrelerinin sayımından elde ettiğimiz sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir. *S.aureus* için çalışılan tüm genlerin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlendi (*icaA* ($6,4 (\log_2) \pm 0,06$, $n=3$), *icaB* ($6,5 (\log_2) \pm 0,02$, $n=3$), *icaC* ($7,2 (\log_2) \pm 0,07$, $n=3$), *icaD* ($7,1 (\log_2) \pm 0,41$, $n=3$), *icaR* ($6,2 (\log_2) \pm 0,007$) $p < 0,05$) (Şekil 4.14). Bu genlerin hepsinin tutunma ile ilişkili olması bize *S. aureus*' un deselüerize edilen gruba daha iyi tutunduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.13. Hücreli ve deselüerize gruplar üzerinde oluşturulan biyofilm modelinde *P. aeruginosa* biyofilm ile ilişkili genlerin mRNA seviyelerinin kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile ölçülmesi.



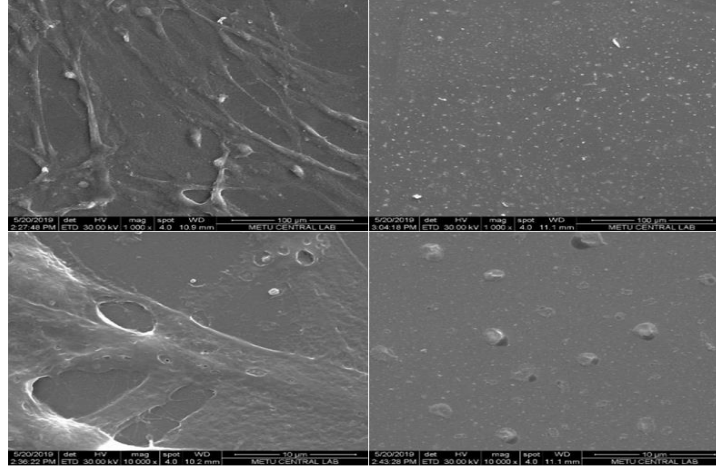
Şekil 4.14. Hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde oluşturulan biyofilm modelinde *S. aureus* biyofilm ile ilişkili genlerin mRNA seviyelerinin kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile ölçülmesi.

4.7. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

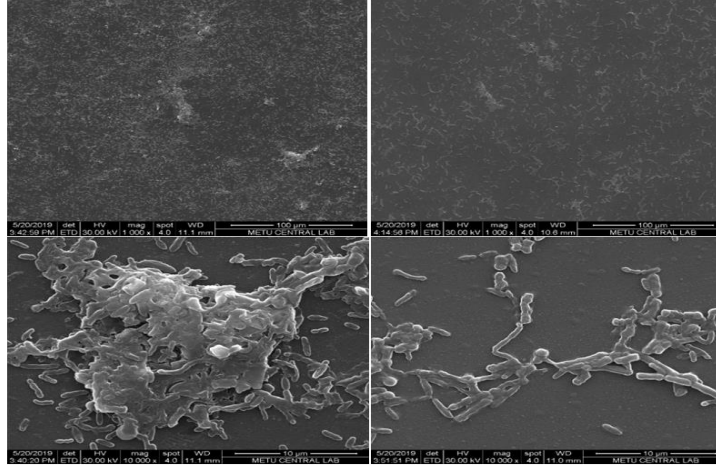
4.7.1. Hücreli ve Deselülerize Gruplarda Oluşturulan Olgun Biyofilmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

CD146+ kök hücreli ve deselülerize slaytlar üzerinde oluşturulan *P. aeruginosa* ve *S. aureus* biyofilmlerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 4.15' de görülmektedir. Gerek *S. aureus* gerekse de *P. aeruginosa*'nın hücreli gruplar üzerinde yoğun bir biyofilm tabakası oluşturduğu görüntüleri Şekil 4.15' de verilmektedir. Kontrol grubuna kıyasla deselülerize gruplarda, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* için daha az biyofilm oluşumu gözlemlendi. Bu görüntüler, *P. aeruginosa* için elde edilen sayım sonuçlarındaki anlamlı azalımı destekler niteliktedir.

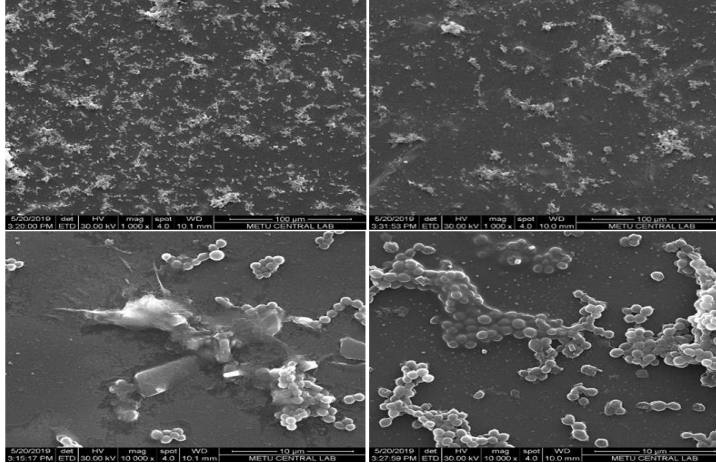
A. CD146+ Kök Hücreli Kontrol Deselülerize Matriks Kontrol



B. CD146+ Kök Hücre + P.a Deselülerize Matriks + P.a



C. CD146+ Kök Hücre + S.a Deselülerize Matriks + S.a



Şekil 4.15. CD146+ kök hücreli ve deselülerize gruplar üzerinde *P. aeruginosa* ve *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. A) CD146+ kök hücreli kontrol ve deselülerize kontrol grupları, B) P.a: *P. aeruginosa*, C) S.a: *S. aureus*. Scale bar = 1000x, 10.000x.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, insan göbek kordon veni CD146+ kök hücreleri kullanılarak bu hücrelerin ve onlardan elde edilen EMP' lerinin *in vitro* biyofilm oluşumuna katkıları ve CD146+ kök hücrelerin antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildi. İlk olarak PGM ile kültüre edilen CD146+ kök hücrelerinde gözlemediğimiz büyük fibroblast benzeri hücre görünümünün, yapılan diğer çalışmalardaki morfolojik görünüme benzer olduğu görüldü [153, 202]. Literatürde ve yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi [194], bu hücrelerin perisit hücrelerine özgü hücre yüzey belirteci olan CD146' yı ve CD105' i yüksek oranda ifade ettikleri gözlemlendi. Bu hücrelerin, adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan boyamalar sonucunda; kontrol gruplarına kıyasla adipojenik farklılaşma gruplarında yağ damlacıklarının olduğu, ancak osteojenik farklılaşma gruplarında kalsiyum kristalleri oluşumunun çok az olduğu gözlemlendi. Benzer sonucu ekibimiz yaptığı diğer çalışmalar ve makalelerde de sunmuştur [194, 203]. Bulgularımızla paralel çalışmalar olsa da, perisit hücrelerinin osteojenik farklılaşma kapasitesinin olduğunu gösteren çalışma sonuçları da bulunmaktadır [153, 202, 204]. Bulgulardaki bu farklılıklar, perivasküler hücrelerin izole edilme yöntemleri, hücre kültür koşulları ve çeşitli dış faktörlere bağlı olarak ortaya çıkıyor olabilmektedir [205-207].

Deselülerizasyon işleminde amaç; ekstraselüler matriks yapısında bulunan kollajen, elastin, fibronektin, GAG gibi doğal bileşenlerin korunarak hücre yapısının ve kalıntılarının ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Literatürde deselülerizasyon işlemi ve karakterizasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında gerekli literatür incelemeleri yapılarak CD146+ kök hücrelerin deselülerizasyonu için üç farklı protokol denendi. İlk olarak; 2×10^{-2} M amonyum hidroksit ile 10 dakika muamele edildi ve 120 kU/mL DNaz-1 ile inkübe edildi. İkinci yöntem olarak; %0,5 triton X-100 ve 20 mM amonyum hidroksit ve ardından 180 U/mL DNaz-1 kullanıldı. Literatürden derlenen bu protokoller sonucunda deselülerize matriks eldesinin beklenen düzeyde olmaması (Datalar gösterilmemiştir) üzerine üçüncü ve son olarak uygulanan protokol ile deselülerize matriks yapısı elde edilmiş oldu. Bu protokolde, CD146+ kök hücrelerinin deselülerizasyon işlemi için, 2×10^{-2} M amonyum hidroksit ve %0,5 triton X-100 karışımından oluşan bir muamele sonrasında

180 U/mL DNaz-1 ilave edilerek işlem gerçekleştirildi. Uyguladığımız deselülerizasyon protokolüne benzer olarak Brown ve arkadaşlarının perisit hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada [13], 10 mM amonyum hidroksit ve %0,5 triton X-100 ile muamele ettikten sonra 180 U/mL DNaz-1 ile 30 dakika 37°C' de inkübe etmişlerdir. Elde ettikleri EMP' nin karakterizasyonu için, LC/MS-MS analizi, ve *immunoblotting* analizlerini yapmışlardır [13]. Yapılan bir başka çalışmada ise, hücreler 2×10^{-2} M amonyum hidroksit ile 10 dakika bir çalkalayıcıda muamele edilmiş, ardından 3 kez soğuk PBS ile yıkanarak DNaz-1 ile 30 dakika 37°C' de inkübe edilmiştir [208]. EMP karakterizasyonu için ise, taramalı elektron mikroskobu analizi, western blot analizi, Masson-Trikrom ve picrosirius red histolojik boyaması yapmışlardır [208]. Scherzer ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, fibroblast hücreleri PBS ile yıkandıktan sonra 50 mM amonyum hidroksit ve %0,05 triton ile oda sıcaklığında 2 dakika bekletip 3 kez PBS ile yıkanmış ardından 20 U/mL DNaz-1 ile 37°C' de 1 saat inkübe etmişlerdir [209]. DAPI boyaması ve western blot ile EMP karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise, yapılan diğer çalışmalara benzer olarak EMP karakterizasyonu için, nLC/MS-MS analizi, Masson-Trikrom histolojik boyama ve DAPI immünfloresan boyaması yapıldı. Verilen literatürlere benzer şekilde, Masson-Trikrom boyaması sonucu, hücre yapısının uzaklaştığı ancak hücrelerin sentezlemiş olduğu ağısı yapıdaki ekstraselüler matriks yapısının varlığı gözlemlendi. EMP, hücresel süreçler (çoğalma, farklılaşma, migrasyon), hücreler arası etkileşim, yapısal-mekanik destek sağlama gibi konularda önemli görevleri olan, hücrelere üç boyutlu bir ortam oluşturan ağısı bir yapıdadır [210]. Bu tez çalışmasında, ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik görüntüleme, kontrol grubuna göre deselülerize grupta hücre yapısı uzaklaştırılmış (DAPI boyama sonucuna göre) ve bahsedilen ağısı EMP yapısı (Masson-Trikrom boyama sonucuna göre) net bir şekilde gözükmemektedir.

Deselülerize matriks yapısındaki proteinleri belirlemek için yapılan nLC/MS-MS analizi sonucunda, literatürde verilen ekstraselüler matriks proteinlerinden kollajenler, glikoproteinler, proteoglikanlar ve çeşitli büyüme faktörleri bu tez çalışmasında da tespit edildi. Tespit ettiğimiz deselülerize matriks proteinleri ile benzer sonuçların elde edildiği bir çalışmada [211], ekstraselüler matriksin ana bileşenlerinden biri olan kollajen tiplerinden kollajen tip I, III, IV, V, VI, XII' ye ek olarak bu tez çalışmasında kollajen tip XVI ve XVIII bulunmuştur. Ekstraselüler

matriks yapısında bulunan kollajen, anjiyojenik özellikte olup hücre adezyonunun sağlanmasında önemli görevleri vardır [211, 212]. Brown ve arkadaşlarının [211] tespit ettiği glikoproteinlerden; fibronektin (%68), fibrillin (%49), tenaskin (%53), fibulin, periostin, vitronektin, laminine ek olarak hücre iskeletinin önemli bileşenlerinden biri olan vimentin (%93), nidojen, von Willebrand Faktör A, kaldesmon, ekstraselüler matriks proteini I, fibrinojen bu tez çalışmasında bulundu. Brown ve arkadaşlarının [211] yaptığı çalışmayla benzer şekilde proteoglikan olarak; versikan, biglikan, bazal membrana özgü heparan sülfat (%49) tespit edildi. Aynı zamanda, büyüme faktörü beta kaynaklı protein Ig-h3, büyüme farklılaşma faktörü XV, insülin benzeri büyüme faktörü II, transforme edici büyüme faktörü beta I, epidermal büyümek faktörü protein VII, fibroblast büyüme faktörü II, insülin benzeri büyüme faktörü mRNA-bağlayıcı protein III bulundu. nLC/MS-MS analizi sonucunda, deselülerizasyon işleminin başarıyla gerçekleştirilerek hücrelerin uzaklaştırıldığı aynı zamanda CD146+ kök hücrelerin sekrete ettikleri ekstraselüler matriks proteinlerinin zarar görmediği tespit edildi. Elde ettiğimiz bu veriler yapılan benzer çalışmalar ile desteklendi.

CD146+ kök hücrelerin biyofilm oluşumuna katkısını değerlendirmek adına bu hücreler, yaralardan sıklıkla izole edilen *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterileri ile birlikte ko-kültürlere edilerek WST-1, Annexin V/PI ve kristal viyole boyaları ile boyandı. WST-1 sonuçlarına göre, CD146+ kök hücreler + bakterilerin ko-kültüre edildiği grupta, kontrol hücre ve kontrol bakteri gruplarına kıyasla daha yüksek bir proliferasyon gözlemlendi. Bu da bize, hücre ve bakteri birlikteliğinden her iki tarafında negatif yönde etkilenmediğini göstermektedir. Hücreli ve deselülerize edilen gruplarda yapılan kristal viyole boyaması sonucunda, hücreli gruplarda hücrelere tutunmuş halde bulunan *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakteri yapıları küçük hücre kümeleri şeklinde görüldü. Deselülerize gruplarda ise bu bakteriyel hücre kümeleri nerdeyse hiç görülmemiş olup, çalışma sonuçlarımız bize deselülerize grupların bakteriyel tutunma için uygun yüzey koşulları sağlamadığını düşündürmektedir. CD146+ kök hücrelerin sekrete ettikleri biyomoleküllerin *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmek amacıyla her üç farklı grup için, kültürün birinci ve yedinci günlerinde alınan besiyerleri disk difüzyon testi ile karşılaştırıldı. Kültürün birinci ve yedinci günlerinde alınan besiyerlerinin, *P.*

aeruginosa üzerinde inhibisyon çapları bakımından herhangi bir fark gözlenmedi ve antimikrobiyal bir etkileri olmadığı bulundu. *S. aureus* için ise, kontrol grubunda 11 mm ve kültürün yedinci gününde alınan kültür besiyerinde inhibisyon çapı 13 mm olarak ölçüldü. Aradaki bu fark anlamlı bir farklılık ifade etmemekle birlikte kontrol grubunda dahi oluşan inhibisyon çaplarının penisilin/streptomisin içeren kültür besiyerinden kaynakladığı düşünülmektedir. Dolayısıyla tasarlanmış deney koşullarında, hücre sekresyonlarının *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerine herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği bulunmuştur. Sutton ve arkadaşlarının [10] yaptığı bir çalışmada, MKH' ler tarafından üretilen biyomoleküllerin *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* bakteri kolonilerini azalttığı ve MKH süpernatantlarının antimikrobiyal özelliklerinin bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliğini arttırabileceği önerilmiştir [10]. Ancak aynı çalışmada, süpernatantın antimikrobiyal etkisinin farklı bakterilerin kullanılmasına bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği de belirtilmektedir [10]. MKH' nin ortama salgıladığı LL-37 aracılığıyla bakteri hücre duvarında oluşan bozulmaların, antibakteriyel maddelere daha duyarlı hale gelmesine yol açarak farklı bakteriler üzerinde farklı antimikrobiyal etkiler oluşturabileceği literatürde yapılan çalışmalar ile belirtilmektedir [146, 213]. Antimikrobiyal etkinin mikroorganizmaların Gram (+) ve/veya Gram (-) oluşuna, MKH ve LL-37' nin etkinliğine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği rapor edilmiştir [10, 211]. Ayrıca bu antimikrobiyal etkinin, MKH' lerin kültür koşullarına, farklı donör ve bakteri türüne göre değişkenlik gösterebileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmektedir [10]. Çalışmamızda, CD146+ kök hücre *conditioned* medyumların (hücreler tarafından besiyeri ortamına salınan faktörler ile besiyeri bileşeni), *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etkilerinin gözlenmemesi yukarıda bahsedilen farklı deney koşullarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Biyofilm oluşumunun ilk aşamasında adezin proteinleri ile hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlamakta sonrasında da ekstraselüler matriks sentezleyerek olgun biyofilmleri oluşturmaktadır. Ekzopolisakkaritler, hücre dışına ve hücre yüzeyine bağlanan proteinler/adezinler ve ekstraselüler matriks DNA' sından oluşan ekstraselüler matriks, biyofilm kuru ağırlığının %90' nını oluşturmaktadır [214]. Bu ekstraselüler matriks bileşenleri ortamda bulunma yoğunluklarına ve biyofilm

ortamına bağılı olarak farklılık gösterebilir [214, 215]. Çalışmamızda akışkan modelde oluşturulan *P. aeruginosa* ($p < 0,05$) ve *S. aureus* ($p \geq 0,05$) için biyofilm sonuçlarımızda hücreli ile deselülerize ortam arasındaki gözlemediğimiz biyofilm hücre sayılarındaki farklılıklar yukarıda bahsedilen faktörlerden kaynaklanabilir [214, 215]. Biyofilm oluşumu esnasındaki asidik pH ve pozitif yüklü proteinler, ekstraselüler DNA ve negatif yüklü teikoik asit ve fosfolipitler arasında elektrostatik etkileşim oluşturarak hücrelerin yapışmasını destekler [216, 217]. Bu güçlü elektrostatik etkileşim, *S. aureus*' un yüzeylere daha sıkı bağlanmasını sağlayarak olgun biyofilmlerin oluşmasını destekler. *S. aureus*' un farklı yüzeylere tutunmasının altında yatan mekanizma/mekanizmaların aydınlatılmasının *S. aureus* kaynaklı yaraların tedavisinde yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Riis ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [218], adipoz kökenli kök hücreler deselülerize edilmiş ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin korunarak başarılı bir şekilde hücresel bileşenlerin uzaklaştırıldığı bildirilmiştir. Deselülerize matriks karakterizasyonu için, immünboyama, proteom analizi ve ekstraselüler matriks ile ilişkili genlerin transkripsiyonel aktivitesine bakılmıştır [218]. Deselülerize ekstraselüler matriksin, fibroblast ve endotel hücrelerinin gelişmesini desteklediği, bu deselülerize matriks yapılarının yara iyileşmesi süreçlerinde ve potansiyel bir biyomateryal olabileceğini önermişlerdir [218]. Choi ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada [219], insan plasentasından elde edilen hücreler, SDS ve nükleazlar kullanılarak deselülerize edilmiş ve ekstraselüler matriks yapısında bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerin korunduğu bildirilmiştir. Elde edilen deselülerize matriks yapısı, sıçan yara modeline *in vivo* olarak implante edilmiş ve deselülerize matriks ile tedavi edilen grubun kontrol grubuna göre 28 günlük iyileşme süresince yara bölgesini koruyarak iyi bir yapışma ve iyileşme ortamı sağladığını bildirmişlerdir [219]. Deselülerize matrikslerin klinikte kullanılmasına yönelik yapılan bir çalışmada [220], çift katmanlı deri eşdeğerleri (SASS) ve deselülerize edilmiş dermal matriksin (SASS-DM) entegrasyonu hayvan yara modelinde değerlendirilmiştir. İnsan derisine çok benzer olan SASS' ler farklılaşmış epidermis tabakasının bazal katmanında bulunan epitel kök hücrelerin korunmasını sağlamakla birlikte üretimi uzun zaman almaktadır. Bu nedenle üretimi daha hızlı olan SASS-DM adı verilen keratinosit ve fibroblastların üzerinde geliştirilebildiği bir yapı geliştirilmiştir. Bu iki deri eşdeğerinin, hücresel

farklılaşmaları, histolojik durumları ve entegrasyonu farelere aktarıldıktan altı hafta sonra yeşil floresan proteini ve *in vivo* görüntüleme sistemi ile kontrol edilmiştir [220]. Çalışma sonunda Cloutier ve arkadaşları [220], klinikte sıklıkla kullanılan SASS' ler ile SASS-DM' lerin üç boyutlu yapısının birbirinize benzer olduğu ve böylece deselülerize matrikslerin yara tedavilerinde umut veren bir deri alternatifi olduğunu, diğer deri eşdeğerlerine göre üretiminin daha kısa süreli olmasından dolayı klinikte hızlı uygulanması bakımından avantajları olduğunu bildirmişlerdir. Kİ kaynaklı MKH' ler ile denatüre aselüler dermal matriks (DADM) birlikteliğinin derin yanıklar için iyi bir tedavi alternatifi olabileceğini test etmek için yapılan bir çalışmada, DADM üzerinde MKH' ler geliştirilerek farelerin kutanöz yaralarına implant edilmiş ve bu deri eş değerinin deri rejenerasyonu üzerine etkisi değerlendirilmiştir [221]. Histolojik boyama, hücre canlılığı analizi ve taramalı elektron mikroskopu analizi sonuçlarına göre, MKH' lerin canlılıklarını koruduğu DADM-MKH deri eş değerinin anjiyogenez ve epitelizasyonu arttırarak yara iyileşmesini desteklediği görülmüştür [221]. Qi ve arkadaşları çalışma sonunda [221], DADM-MKH derin yanıkların tedavilerinde kullanılabilecek alternatif bir tedavi aracı olabileceğini önermişlerdir.

El Masry ve arkadaşlarının [15] yaptığı bir çalışmada, sıçan yara modelinde deselülerize perikardiyal kollajen matriks üzerine *P. aeruginosa* ve *S. aureus* enfeksiyon modelinde uygulanmış olup kontrol gruplarına kıyasla yara iyileşmesi değerlendirilmiştir [15]. Deselülerize gruplarda *P. aeruginosa* ve *S. aureus* hücre çoğalması engellenmiş ve yaranın tamamen kapandığı gözlenmiştir. Çalışma sonunda, deselülerize matrikslerin yara iyileşmesini destekleyen bir yapı sağladığı ve klinikte kullanılabileceği önerilmiştir [15]. Suhaeri ve arkadaşları [16] tarafından yapılan çalışmada, insan akciğer fibroblast kaynaklı hücrelerin deselülerize edilmesi ile elde edilen ekstraselüler matriks ile antibakteriyel bir ajanın birlikteliğinden oluşan yara yaması üretilmeye çalışılmış ve bu yapı hayvan modeli üzerinde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, deselülerize matriksin hücre göçünü desteklediği ve hücrelerle sıkı bağlantılar kurarak enfekte yaraların tedavisinde umut verebilecek bir aday olduğu önerilmiştir [16].

Hücreli ve deselülerize gruplar için, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* biyofilm hücre sayılarında fark gözlenmiş olup bu farkın altında yatan mekanizma çalışmamızda gen düzeyinde incelenmiştir. Bu amaçla *P. aeruginosa* ve *S. aureus*' un biyofilm ile ilişkili

bilinen genlerinin ekspresyon seviyeleri kantitatif PZR analizi ile belirlenmiştir. *P. aeruginosa* için biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan tutunma basamağı ile ilişkili genlerden *rhIR* ve *lasR*' nin mRNA seviyelerinde anlamlı azalım gözlenmiş olup bu azalım biyofilm hücre sayımından elde ettiğimiz sonuçlar ile de tutarlılık göstermektedir. *P. aeruginosa* ile ilgili diğer genlerin seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. *S. aureus* için ise, tutunma basamağı ile ilişkili olan ica (A-D ve R) genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri hücreli gruba kıyasla deselülerize edilen grupta daha fazla oranda istatistiksel anlamda artış göstermiştir ($p < 0,05$). Sonuçlarımız deselüerize ortamın *S. aureus*' un tutunmasına daha elverişli bir ortam yarattığını düşündürmektedir. PZR yöntemi ile edilen ica genlerinin hepsi tutunma ile ilgili olmalarına rağmen biyofilm sayım sonuçlarında bu bulgularla paralel bir anlamlı bir artış gözlenmemiştir. *S. aureus* biyofilm oluşumunun ilk aşamasında adezin proteinleri ile hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlamakta sonrasında da ekstraselüler matriks sentezleyerek olgun biyofilmleri oluşturmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, insan göbek kordonundan elde edilen, antimikrobiyal etkiye sahip olabilecek CD146+ kök hücreler ve bu hücrelerden elde edilen ekstraselüler matriks proteinleri *in vitro* akışkan biyofilm modellerinde değerlendirildi. MKH atası olarak kabul edilen CD146+ kök hücrelerinin antimikrobiyal etkileri disk difüzyon testi ile değerlendirilerek, MKH'lerin aksine bu hücrelerin tez kapsamında tasarlanmış olan deney koşullarında herhangi bir antimikrobiyal etkilerinin olmadığı gözlemlendi. Aynı zamanda, CD146+ kök hücrelerin deselülerizasyonu ile ilgili çeşitli yöntemler bu tez kapsamında denendi ve en uygun yöntem bulunarak CD146+ kök hücrelerin başarılı bir şekilde deselülerizasyonu sağlandı. Yaralardan sıklıkla izole edilen *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin laboratuvar suşları, deselülerize yapı ile hücreli yapı üzerinde damlamalı akış reaktör sistemi kullanılarak kültürlendi ve biyofilm hücre sayıları karşılaştırıldı. *P. aeruginosa*'nın biyofilm hücre sayısı deselülerize gruplarda hücreli gruplara kıyasla azalım gösterdi. Çalışmamızda elde edilen deselülerize matriks yapısının, *in vitro* ortamda *P. aeruginosa* üremesini azaltması ilerde yapılabilecek detaylı çalışmalar sonrasında bu yapının yara yaması olarak kullanılabileceği önerisini sunmaktadır. Aynı durum *S. aureus* için gözlenmemiş olup, deselülerize matriks yapısının etkisinin bakteriyel türe bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda deselülerize gruplar üzerinde klinik yara suşları kullanılarak yapılabilecek hayvan deneyleri ile klinikte kullanıma yönelik ön çalışmalar hızlandırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Bi, H. and Y. Jin, *Current progress of skin tissue engineering: Seed cells, bioscaffolds, and construction strategies*. Burns Trauma, 2013. **1**(2): p. 63-72.
2. Sheikh, E.S., E.S. Sheikh, and D.E. Fetterolf, *Use of dehydrated human amniotic membrane allografts to promote healing in patients with refractory non healing wounds*. International Wound Journal, 2014. **11**(6): p. 711-717.
3. Klimov, M., et al., *Bioengineered Self-assembled Skin as an Alternative to Skin Grafts*. Plast Reconstr Surg Glob Open, 2016. **4**(6): p. e731.
4. Yu, S.C., et al., *Construction of tissue engineered skin with human amniotic mesenchymal stem cells and human amniotic epithelial cells*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(23): p. 4627-35.
5. Parmaksiz, M., A.E. Elcin, and Y.M. Elcin, *Decellularized bSIS-ECM as a Regenerative Biomaterial for Skin Wound Repair*. Methods Mol Biol, 2019. **1879**: p. 175-185.
6. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
7. Isakson, M., et al., *Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 831095.
8. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4195-200.
9. Krasnodembskaya, A., et al., *Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37*. Stem Cells, 2010. **28**(12): p. 2229-38.
10. Sutton, M.T., et al., *Antimicrobial Properties of Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Potential for Cystic Fibrosis Infection, and Treatment*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 5303048.
11. Mills, S.J., A.J. Cowin, and P. Kaur, *Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process*. Cells, 2013. **2**(3): p. 621-34.
12. Caplan, A.I., *All MSCs are pericytes?* Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 229-30.
13. Brown, L.A., et al., *Proteomic Analysis of the Pericyte Derived Extracellular Matrix*. Cellular and Molecular Bioengineering, 2015. **8**(3): p. 349-363.
14. Chan, B.P. and K.W. Leong, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. Eur Spine J, 2008. **17 Suppl 4**: p. 467-79.
15. El Masry, M.S., et al., *Stabilized collagen matrix dressing improves wound macrophage function and epithelialization*. FASEB J, 2019. **33**(2): p. 2144-2155.
16. Suhaeri, M., et al., *Novel skin patch combining human fibroblast-derived matrix and ciprofloxacin for infected wound healing*. Theranostics, 2018. **8**(18): p. 5025-5038.

17. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. *Biomaterials*, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
18. Brennan, E.P., et al., *Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(10): p. 2949-55.
19. Duscher, D., et al., *Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine? A Mini-Review*. *Gerontology*, 2016. **62**(2): p. 216-25.
20. Milan, P.B., et al., *Accelerated wound healing in a diabetic rat model using decellularized dermal matrix and human umbilical cord perivascular cells*. *Acta Biomater*, 2016. **45**: p. 234-246.
21. Parmaksiz, M., et al., *Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine*. *Biomed Mater*, 2016. **11**(2): p. 022003.
22. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. *Exp Dermatol*, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
23. Ajani, G., et al., *Cellular responses to disruption of the permeability barrier in a three-dimensional organotypic epidermal model*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(14): p. 3005-15.
24. Hsu, Y.C., L. Li, and E. Fuchs, *Emerging interactions between skin stem cells and their niches*. *Nat Med*, 2014. **20**(8): p. 847-56.
25. Scalise, A., et al., *Microenvironment and microbiology of skin wounds: the role of bacterial biofilms and related factors*. *Semin Vasc Surg*, 2015. **28**(3-4): p. 151-9.
26. Baum, C.L. and C.J. Arpey, *Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events*. *Dermatol Surg*, 2005. **31**(6): p. 674-86; discussion 686.
27. Tomic-Canic, M., et al., *Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes*. *J Dermatol Sci*, 1998. **17**(3): p. 167-81.
28. Bartkova, J., et al., *Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing*. *Arch Oral Biol*, 2003. **48**(2): p. 125-32.
29. Toriseva, M. and V.M. Kahari, *Proteinases in cutaneous wound healing*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(2): p. 203-24.
30. Gainza, G., et al., *A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice*. *J Control Release*, 2014. **185**: p. 51-61.
31. Menke, N.B., et al., *Impaired wound healing*. *Clin Dermatol*, 2007. **25**(1): p. 19-25.
32. Wong, V.W., et al., *From germ theory to germ therapy: skin microbiota, chronic wounds, and probiotics*. *Plast Reconstr Surg*, 2013. **132**(5): p. 854e-861e.

33. Ayton, M., *Wound care: wounds that won't heal*. Nurs Times, 1985. **81**(46): p. suppl 16-9.
34. Britland, S., et al., *The lactate conundrum in wound healing: clinical and experimental findings indicate the requirement for a rapid point-of-care diagnostic*. Biotechnol Prog, 2012. **28**(4): p. 917-24.
35. Resch, A., et al., *Differential gene expression profiling of Staphylococcus aureus cultivated under biofilm and planktonic conditions*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(5): p. 2663-76.
36. Gray, E.D., et al., *Effect of extracellular slime substance from Staphylococcus epidermidis on the human cellular immune response*. Lancet, 1984. **1**(8373): p. 365-7.
37. Percival, S.L., et al., *Antiseptics for treating infected wounds: Efficacy on biofilms and effect of pH*. Crit Rev Microbiol, 2016. **42**(2): p. 293-309.
38. Li, Y.H. and X. Tian, *Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms*. Sensors (Basel), 2012. **12**(3): p. 2519-38.
39. Sutherland, I., *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 1): p. 3-9.
40. Kong, E.F., J.K. Johnson, and M.A. Jabra-Rizk, *Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: An Enemy amidst Us*. PLoS Pathog, 2016. **12**(10): p. e1005837.
41. Arnold, J.W. and S. Silvers, *Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation*. Poult Sci, 2000. **79**(8): p. 1215-21.
42. Lindsay, D., et al., *Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated Bacillus cereus and a Pseudomonas fluorescens isolate*. J Appl Microbiol, 2002. **92**(2): p. 352-61.
43. Fletcher, M. and G.I. Loeb, *Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces*. Appl Environ Microbiol, 1979. **37**(1): p. 67-72.
44. Kumar, C.G. and S.K. Anand, *Significance of microbial biofilms in food industry: a review*. Int J Food Microbiol, 1998. **42**(1-2): p. 9-27.
45. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 711-45.
46. Hoiby, N., et al., *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **35**(4): p. 322-32.
47. Fux, C.A., et al., *Survival strategies of infectious biofilms*. Trends Microbiol, 2005. **13**(1): p. 34-40.
48. Prigent-Combaret, C., et al., *Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1999. **181**(19): p. 5993-6002.

49. O'Toole, G.A., *To build a biofilm*. J Bacteriol, 2003. **185**(9): p. 2687-9.
50. Han, T.L., R.D. Cannon, and S.G. Villas-Boas, *The metabolic basis of Candida albicans morphogenesis and quorum sensing*. Fungal Genet Biol, 2011. **48**(8): p. 747-63.
51. Lejeune, P., *Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it*. Trends Microbiol, 2003. **11**(4): p. 179-84.
52. Bohn, Y.S., et al., *Multiple roles of Pseudomonas aeruginosa TBCF10839 PilY1 in motility, transport and infection*. Mol Microbiol, 2009. **71**(3): p. 730-47.
53. Makin, S.A. and T.J. Beveridge, *The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of Pseudomonas aeruginosa to surfaces*. Microbiology, 1996. **142** (Pt 2): p. 299-307.
54. Friedman, L. and R. Kolter, *Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix*. J Bacteriol, 2004. **186**(14): p. 4457-65.
55. Overhage, J., et al., *Expression of the psl operon in Pseudomonas aeruginosa PAO1 biofilms: PslA performs an essential function in biofilm formation*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(8): p. 4407-13.
56. Ma, L., et al., *Pseudomonas aeruginosa Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide*. J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 8353-6.
57. Branda, S.S., et al., *Biofilms: the matrix revisited*. Trends Microbiol, 2005. **13**(1): p. 20-6.
58. Belas, R., *Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria*. Trends Microbiol, 2014. **22**(9): p. 517-27.
59. Lee, V.T., et al., *A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production*. Mol Microbiol, 2007. **65**(6): p. 1474-84.
60. Sintim, H.O., et al., *Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules*. Future Med Chem, 2010. **2**(6): p. 1005-35.
61. Cramton, S.E., et al., *The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation*. Infect Immun, 1999. **67**(10): p. 5427-33.
62. Kavanaugh, J.S., et al., *Identification of Extracellular DNA-Binding Proteins in the Biofilm Matrix*. MBio, 2019. **10**(3).
63. Gerke, C., et al., *Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18586-93.

64. Vuong, C., et al., *Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system*. Cell Microbiol, 2004. **6**(3): p. 269-75.
65. Tran Van Nhieu, G. and R.R. Isberg, *Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density*. EMBO J, 1993. **12**(5): p. 1887-95.
66. Sinha, B., et al., *Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1*. Cell Microbiol, 1999. **1**(2): p. 101-17.
67. Jonsson, K., et al., *Two different genes encode fibronectin binding proteins in Staphylococcus aureus. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene*. Eur J Biochem, 1991. **202**(3): p. 1041-8.
68. Burke, F.M., et al., *Fibronectin-binding protein B variation in Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 160.
69. Wann, E.R., S. Gurusiddappa, and M. Hook, *The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of Staphylococcus aureus is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13863-71.
70. Roche, F.M., et al., *The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of Staphylococcus aureus to elastin*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38433-40.
71. Josse, J., F. Laurent, and A. Diot, *Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2433.
72. Passador, L., et al., *Expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes requires cell-to-cell communication*. Science, 1993. **260**(5111): p. 1127-30.
73. Ochsner, U.A. and J. Reiser, *Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(14): p. 6424-8.
74. Diggle, S.P., et al., *4-quinolone signalling in Pseudomonas aeruginosa: old molecules, new perspectives*. Int J Med Microbiol, 2006. **296**(2-3): p. 83-91.
75. Wagner, V.E., et al., *Microarray analysis of Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment*. J Bacteriol, 2003. **185**(7): p. 2080-95.
76. Hentzer, M., et al., *Quorum sensing : a novel target for the treatment of biofilm infections*. BioDrugs, 2003. **17**(4): p. 241-50.
77. Pearson, J.P., et al., *Structure of the autoinducer required for expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 197-201.
78. de Kievit, T.R. and B.H. Iglewski, *Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 4839-49.

79. Davey, M.E., N.C. Caiazza, and G.A. O'Toole, *Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. J Bacteriol, 2003. **185**(3): p. 1027-36.
80. Raina, S., et al., *Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy?* Biotechnol Appl Biochem, 2009. **54**(2): p. 65-84.
81. McKnight, S.L., B.H. Iglewski, and E.C. Pesci, *The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2000. **182**(10): p. 2702-8.
82. Kosa, G., et al., *Assessment of the scalability of a microtiter plate system for screening of oleaginous microorganisms*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018. **102**(11): p. 4915-4925.
83. Gultekinoglu, M., et al., *Polyethyleneimine brushes effectively inhibit encrustation on polyurethane ureteral stents both in dynamic bioreactor and in vivo*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **71**: p. 1166-1174.
84. Coenye, T. and H.J. Nelis, *In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation*. J Microbiol Methods, 2010. **83**(2): p. 89-105.
85. Goeres, D.M., et al., *A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor*. Nat Protoc, 2009. **4**(5): p. 783-8.
86. Secor, P.R., et al., *Staphylococcus aureus Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 143.
87. Kirker, K.R., et al., *Differential effects of planktonic and biofilm MRSA on human fibroblasts*. Wound Repair Regen, 2012. **20**(2): p. 253-61.
88. Ward, C.L., et al., *Soluble factors from biofilms of wound pathogens modulate human bone marrow-derived stromal cell differentiation, migration, angiogenesis, and cytokine secretion*. BMC Microbiol, 2015. **15**: p. 75.
89. Omar, A., et al., *Microbial Biofilms and Chronic Wounds*. Microorganisms, 2017. **5**(1).
90. Zhao, G., et al., *Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013. **2**(7): p. 389-399.
91. Tillotson, G.S. and N. Theriault, *New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance*. F1000Prime Rep, 2013. **5**: p. 51.
92. Marr, A.K., W.J. Gooderham, and R.E. Hancock, *Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(5): p. 468-72.
93. Peters, B.M., M.E. Shirtliff, and M.A. Jabra-Rizk, *Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs?* PLoS Pathog, 2010. **6**(10): p. e1001067.
94. Lee, C.R., et al., *Strategies to minimize antibiotic resistance*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(9): p. 4274-305.

95. Reddy, K.V., R.D. Yedery, and C. Aranha, *Antimicrobial peptides: premises and promises*. Int J Antimicrob Agents, 2004. **24**(6): p. 536-47.
96. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 238-50.
97. Bahar, A.A. and D. Ren, *Antimicrobial peptides*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(12): p. 1543-75.
98. Reardon, S., *Bacterial arms race revs up*. Nature, 2015. **521**(7553): p. 402-3.
99. Harman, R.M., et al., *Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 157.
100. Strong, A.L., M.W. Neumeister, and B. Levi, *Stem Cells and Tissue Engineering: Regeneration of the Skin and Its Contents*. Clin Plast Surg, 2017. **44**(3): p. 635-650.
101. Bhang, S.H., et al., *Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis*. Mol Ther, 2014. **22**(4): p. 862-72.
102. Hemphill, C., K. Stavoe, and Z. Khalpey, *First in man: amniotic stem cell injection promotes scar remodeling and healing processes in late-stage fibrosis*. Int J Cardiol, 2014. **174**(2): p. 442-3.
103. Stappenbeck, T.S. and H. Miyoshi, *The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1666-9.
104. Wu, Y., et al., *Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis*. Stem Cells, 2007. **25**(10): p. 2648-59.
105. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
106. Uckan, D., et al., *The analysis of eosinophil and lymphocyte phenotype following single dose of high-dose methylprednisolone in two siblings with marked hypereosinophilia*. Clin Lab Haematol, 2001. **23**(1): p. 33-7.
107. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**(3): p. 381-90.
108. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
109. Kluth, S.M., et al., *DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(10): p. 1471-83.
110. Rogers, I. and R.F. Casper, *Umbilical cord blood stem cells*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **18**(6): p. 893-908.
111. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.

112. Tsai, M.S., et al., *Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol*. Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1450-6.
113. Igura, K., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta*. Cytotherapy, 2004. **6**(6): p. 543-53.
114. Toma, J.G., et al., *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 778-84.
115. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 301-13.
116. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
117. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 12.
118. Wong, R.S., *Mesenchymal stem cells: angels or demons?* J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 459510.
119. Afonso Cornelio, D. and S.R. Batistuzzo de Medeiros, *Genetic evaluation of mesenchymal stem cells*. Rev Bras Hematol Hemoter, 2014. **36**(4): p. 238-40.
120. Ning, H., et al., *The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study*. Leukemia, 2008. **22**(3): p. 593-9.
121. Gneocchi, M., et al., *Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair*. Methods Mol Biol, 2016. **1416**: p. 123-46.
122. Zhang, J., et al., *The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 234.
123. Liu, X.B., et al., *Preconditioning of bone marrow mesenchymal stem cells by prolyl hydroxylase inhibition enhances cell survival and angiogenesis in vitro and after transplantation into the ischemic heart of rats*. Stem Cell Res Ther, 2014. **5**(5): p. 111.
124. Saporov, A., et al., *Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance Their Regulation of the Immune Response*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 3924858.
125. Amiri, F., A. Jahanian-Najafabadi, and M.H. Roudkenar, *In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments : In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability*. Cell Stress Chaperones, 2015. **20**(2): p. 237-51.
126. Zhou, H., et al., *Effects of Exendin-4 on bone marrow mesenchymal stem cell proliferation, migration and apoptosis in vitro*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12898.
127. Caplan, A.I. and D. Correa, *The MSC: an injury drugstore*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(1): p. 11-5.

128. Jackson, L., et al., *Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications*. J Postgrad Med, 2007. **53**(2): p. 121-7.
129. Petrie Aronin, C.E. and R.S. Tuan, *Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2010. **90**(1): p. 67-74.
130. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-22.
131. Alcayaga-Miranda, F., et al., *Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 199.
132. Auletta, J.J., R.J. Deans, and A.M. Bartholomew, *Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense*. Blood, 2012. **119**(8): p. 1801-9.
133. Meisel, R., et al., *Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Leukemia, 2011. **25**(4): p. 648-54.
134. Maxson, S., et al., *Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair*. Stem Cells Transl Med, 2012. **1**(2): p. 142-9.
135. Gupta, N., et al., *Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine Escherichia coli pneumonia*. Thorax, 2012. **67**(6): p. 533-9.
136. Nemeth, K., et al., *Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production*. Nat Med, 2009. **15**(1): p. 42-9.
137. Park, Y.S., et al., *Improved viability and activity of neutrophils differentiated from HL-60 cells by co-culture with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **423**(1): p. 19-25.
138. Cassatella, M.A., et al., *Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils*. Stem Cells, 2011. **29**(6): p. 1001-11.
139. Sangiorgi, B. and R.A. Panepucci, *Modulation of Immunoregulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells by Toll-Like Receptors: Potential Applications on GVHD*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 9434250.
140. Le Blanc, K. and D. Mougiakakos, *Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(5): p. 383-96.
141. Johnson, V., et al., *Activated Mesenchymal Stem Cells Interact with Antibiotics and Host Innate Immune Responses to Control Chronic Bacterial Infections*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9575.
142. Chmiel, J.F. and M.W. Konstan, *Anti-inflammatory medications for cystic fibrosis lung disease: selecting the most appropriate agent*. Treat Respir Med, 2005. **4**(4): p. 255-73.

143. Nichols, D.P., M.W. Konstan, and J.F. Chmiel, *Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease*. Clin Rev Allergy Immunol, 2008. **35**(3): p. 135-53.
144. Weiss, D.J., et al., *Adult stem cells, lung biology, and lung disease. NHLBI/Cystic Fibrosis Foundation Workshop*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(3): p. 193-207.
145. Caplan, A.I., *Why are MSCs therapeutic? New data: new insight*. J Pathol, 2009. **217**(2): p. 318-24.
146. Golec, M., *Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide*. Ann Agric Environ Med, 2007. **14**(1): p. 1-4.
147. Crisan, M., et al., *Perivascular cells for regenerative medicine*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(12): p. 2851-60.
148. Schrimpf, C., et al., *The role of pericyte detachment in vascular rarefaction*. J Vasc Res, 2014. **51**(4): p. 247-58.
149. Diaz-Flores, L., et al., *Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics*. Histol Histopathol, 1991. **6**(2): p. 269-86.
150. Dias Moura Prazeres, P.H., et al., *Pericytes are heterogeneous in their origin within the same tissue*. Dev Biol, 2017. **427**(1): p. 6-11.
151. Wang, H.S., et al., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1330-7.
152. Diaz-Flores, L., et al., *Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche*. Histol Histopathol, 2009. **24**(7): p. 909-69.
153. Tsang, W.P., et al., *CD146+ human umbilical cord perivascular cells maintain stemness under hypoxia and as a cell source for skeletal regeneration*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76153.
154. Schugar, R.C., et al., *High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue*. J Biomed Biotechnol, 2009. **2009**: p. 789526.
155. Capelli, C., et al., *Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate*. Cytotherapy, 2011. **13**(7): p. 786-801.
156. Sarugaser, R., et al., *Isolation, propagation, and characterization of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs)*. Methods Mol Biol, 2009. **482**: p. 269-79.
157. Ennis, J., et al., *In vitro immunologic properties of human umbilical cord perivascular cells*. Cytotherapy, 2008. **10**(2): p. 174-81.
158. Zebardast, N., D. Lickorish, and J.E. Davies, *Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVC): A mesenchymal cell source for dermal wound healing*. Organogenesis, 2010. **6**(4): p. 197-203.

159. Chen, F.M., et al., *Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives*. *Biomaterials*, 2011. **32**(12): p. 3189-209.
160. Geesala, R., et al., *Porous polymer scaffold for on-site delivery of stem cells--Protects from oxidative stress and potentiates wound tissue repair*. *Biomaterials*, 2016. **77**: p. 1-13.
161. Gholipourmalekabadi, M., et al., *Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells?* *Cell Prolif*, 2016. **49**(1): p. 115-21.
162. Leor, J., Y. Amsalem, and S. Cohen, *Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering*. *Pharmacol Ther*, 2005. **105**(2): p. 151-63.
163. LeBleu, V.S., B. Macdonald, and R. Kalluri, *Structure and function of basement membranes*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007. **232**(9): p. 1121-9.
164. Sava, P., et al., *Human microvascular pericyte basement membrane remodeling regulates neutrophil recruitment*. *Microcirculation*, 2015. **22**(1): p. 54-67.
165. Badylak, S.F., D. Taylor, and K. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011. **13**: p. 27-53.
166. Paschos, N.K., et al., *Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015. **9**(5): p. 488-503.
167. Flynn, L., J.L. Semple, and K.A. Woodhouse, *Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. **79**(2): p. 359-69.
168. Choi, J.S., et al., *Decellularized extracellular matrix derived from human adipose tissue as a potential scaffold for allograft tissue engineering*. *J Biomed Mater Res A*, 2011. **97**(3): p. 292-9.
169. Wilson, S.L., et al., *Keeping an eye on decellularized corneas: a review of methods, characterization and applications*. *J Funct Biomater*, 2013. **4**(3): p. 114-61.
170. Mertsching, H., et al., *Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation*. *Biomaterials*, 2005. **26**(33): p. 6610-7.
171. Badylak, S.F., et al., *The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model*. *J Biomed Mater Res*, 1995. **29**(8): p. 977-85.
172. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. *Biomaterials*, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
173. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. *Acta Biomater*, 2009. **5**(1): p. 1-13.

174. Luo, X., et al., *In vitro evaluation of decellularized ECM-derived surgical scaffold biomaterials*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017. **105**(3): p. 585-593.
175. Gilbert, T.W., J.M. Freund, and S.F. Badylak, *Quantification of DNA in biologic scaffold materials*. J Surg Res, 2009. **152**(1): p. 135-9.
176. de Peppo, G.M., et al., *Engineering bone tissue substitutes from human induced pluripotent stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8680-5.
177. Marolt, D., et al., *Engineering bone tissue from human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(22): p. 8705-9.
178. Ansaloni, L., et al., *New "biological" meshes: the need for a register. The EHS Registry for Biological Prostheses: call for participating European surgeons*. Hernia, 2009. **13**(1): p. 103-8.
179. Hoglebe, N.J., J.W. Reinhardt, and K.J. Gooch, *Biomaterial microarchitecture: a potent regulator of individual cell behavior and multicellular organization*. J Biomed Mater Res A, 2017. **105**(2): p. 640-661.
180. Chun, S.Y., et al., *Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix*. Biomaterials, 2007. **28**(29): p. 4251-6.
181. Voytik-Harbin, S.L., et al., *Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa*. J Cell Biochem, 1997. **67**(4): p. 478-91.
182. Sheikholeslam, M., et al., *Biomaterials for Skin Substitutes*. Adv Healthc Mater, 2018. **7**(5).
183. Shakouri-Motlagh, A., et al., *Native and solubilized decellularized extracellular matrix: A critical assessment of their potential for improving the expansion of mesenchymal stem cells*. Acta Biomater, 2017. **55**: p. 1-12.
184. Song, M., et al., *The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **77**: p. 739-747.
185. Bourne, G.L., *The microscopic anatomy of the human amnion and chorion*. Am J Obstet Gynecol, 1960. **79**: p. 1070-3.
186. Zidan, S.M., et al., *Maximizing the safety of glycerol preserved human amniotic membrane as a biological dressing*. Burns, 2015. **41**(7): p. 1498-503.
187. Yuan, J., et al., *Transplantation of human adipose stem cell-derived hepatocyte-like cells with restricted localization to liver using acellular amniotic membrane*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 217.
188. Shi, P., et al., *Biocompatible surgical meshes based on decellularized human amniotic membrane*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **54**: p. 112-9.
189. Koob, T.J., et al., *Cytokines in single layer amnion allografts compared to multilayer amnion/chorion allografts for wound healing*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015. **103**(5): p. 1133-40.


190. Riordan, N.H., et al., *Case report of non-healing surgical wound treated with dehydrated human amniotic membrane*. Journal of Translational Medicine, 2015. **13**.
191. Gauglitz, G.G., et al., *Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies*. Mol Med, 2011. **17**(1-2): p. 113-25.
192. Burugapalli, K., et al., *Scaffold with a natural mesh-like architecture: isolation, structural, and in vitro characterization*. Biomacromolecules, 2007. **8**(3): p. 928-36.
193. Lee, S.J. and A. Atala, *Scaffold technologies for controlling cell behavior in tissue engineering*. Biomed Mater, 2013. **8**(1): p. 010201.
194. Gokcinar-Yagci, B., O. Ozyuncu, and B. Celebi-Saltik, *Isolation, characterisation and comparative analysis of human umbilical cord vein perivascular cells and cord blood mesenchymal stem cells*. Cell Tissue Bank, 2016. **17**(2): p. 345-52.
195. Gokcinar-Yagci, B. and B. Celebi-Saltik, *Comparison of different culture conditions for smooth muscle cell differentiation of human umbilical cord vein CD146+ perivascular cells*. Cell Tissue Bank, 2017. **18**(4): p. 501-511.
196. Polat, A.N., et al., *Phosphoproteomic Analysis of Aurora Kinase Inhibition in Monopolar Cytokinesis*. J Proteome Res, 2015. **14**(9): p. 4087-98.
197. Gokcinar-Yagci, B., et al., *Generation of human umbilical cord vein CD146+ perivascular cell originated three-dimensional vascular construct*. Microvasc Res, 2018. **118**: p. 101-112.
198. Gautam, V., et al., *Reliability of Kirby-Bauer disk diffusion method for detecting carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(4): p. 2003-4.
199. Goeres, D.M., et al., *Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 3): p. 757-62.
200. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
201. Wang, L., et al., *Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in Enterococcus faecalis recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment*. J Endod, 2011. **37**(5): p. 631-6.
202. Montemurro, T., et al., *Differentiation and migration properties of human foetal umbilical cord perivascular cells: potential for lung repair*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(4): p. 796-808.
203. Celebi Saltik, B. and B. Gokcinar Yagci, *Expansion of human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with cord vein pericytes*. Turkish Journal of Biology, 2017. **41**(1): p. 49-U265.

204. Ennis, J., et al., *Isolation, characterization, and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs)*. *Methods Cell Biol*, 2008. **86**: p. 121-36.
205. Murray, I.R., et al., *Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(8): p. 1353-74.
206. Greenwood-Goodwin, M., et al., *A novel lineage restricted, pericyte-like cell line isolated from human embryonic stem cells*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 24403.
207. Vezzani, B., E. Pierantozzi, and V. Sorrentino, *Not All Pericytes Are Born Equal: Pericytes from Human Adult Tissues Present Different Differentiation Properties*. *Stem Cells Dev*, 2016. **25**(20): p. 1549-1558.
208. Du, H.C., et al., *Evaluation of xenogeneic extracellular matrix fabricated from CuCl₂-conditioned mesenchymal stem cell sheets as a bioactive wound dressing material*. *J Biomater Appl*, 2017. **32**(4): p. 472-483.
209. Scherzer, M.T., et al., *Fibroblast-Derived Extracellular Matrices: An Alternative Cell Culture System That Increases Metastatic Cellular Properties*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0138065.
210. Jarvelainen, H., et al., *Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy*. *Pharmacol Rev*, 2009. **61**(2): p. 198-223.
211. Brown, K.L., et al., *Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses*. *J Immunol*, 2011. **186**(9): p. 5497-505.
212. Rozario, T. and D.W. DeSimone, *The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view*. *Dev Biol*, 2010. **341**(1): p. 126-40.
213. Stempel, N., et al., *Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa**. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e82240.
214. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(9): p. 623-33.
215. Flemming, H.C., *EPS-Then and Now*. *Microorganisms*, 2016. **4**(4).
216. O'Gara, J.P., *ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus**. *FEMS Microbiol Lett*, 2007. **270**(2): p. 179-88.
217. Arciola, C.R., et al., *Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015. **5**: p. 7.
218. Riis, S., et al., *Fabrication and characterization of extracellular matrix scaffolds obtained from adipose-derived stem cells*. *Methods*, 2019.
219. Choi, J.S., et al., *Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules*. *Tissue Eng Part A*, 2013. **19**(3-4): p. 329-39.

220. Beaudoin Cloutier, C., et al., *In Vivo Evaluation and Imaging of a Bilayered Self-Assembled Skin Substitute Using a Decellularized Dermal Matrix Grafted on Mice*. *Tissue Eng Part A*, 2017. **23**(7-8): p. 313-322.
221. Qi, Y., et al., *Denatured acellular dermal matrix seeded with bone marrow mesenchymal stem cells for wound healing in mice*. *Burns*, 2019.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



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

Sayı : 16969557 - 743

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 03 MAYIS 2018 PERŞEMBE
Toplantı No : 2018/12
Proje No : GO 18/446 (Değerlendirme Tarihi: 27.03.2018)
Karar No : GO 18/446-22

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Betül Çelebi SALTİK'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Dr. Öğr. Üyesi Didem KART ile birlikte çalışacakları ve Nur Kübra ÇANKIRILI'nın yüksek lisans tezi olan, GO 18/446 kayıt numaralı ve "İnsan Göbek Kordon Veni CD146+ Hücrelerin ve Bu Hücrelerden Elde Edilen Matriks Proteinlerinin in vitro Biyofilm Modellerinde Değerlendirilmesi" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Başkan)	10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	IZINLI	11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SAKA	(Üye)	12. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
IZINLI		IZINLI	
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM	(Üye)	13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZUGLU	(Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
IZINLI		IZINLI	
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	16. Öğr.Gör.Dr. Meltem ŞENGELEN	(Üye)
8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEY	(Üye)	17. Av. Meltem ONURLU	(Üye)

EK-2. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

- 1. Çankirili N,K.,** Altundag O., Çelebi-Saltik B., Skin Stem Cells, Their Niche and Tissue Engineering Approach for Skin Regeneration. Advances in Experimental Medicine and Biology.

EK-3. Orjinallik Ekran Çıktısı

İNSAN GÖBEK KORDON VENİ CD146+ HÜCRELERİN VE BU HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN MATRİKS PROTEİNLERİNİN in vitro BİYOFİLM MODELLERİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ Nur Kübra ÇANKIRILI YL tezi

ORIJINALLIK RAPORU

% 7	% 2	% 1	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 4
2	www.uludagtezmerkezi.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	Submitted to Dokuz Eylul Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Istanbul Medipol Āniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Haloi, Kishor, Moni Kankana Kalita, Ramesh Nath, and Dipali Devi. "Characterization and pathogenicity assessment of gut-associated	<% 1

EK-4. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Nur Kübra Çankırılı
Ödev başlığı: İNSAN GÖBEK KORDON VENİ CD1..
Gönderi Başlığı: İNSAN GÖBEK KORDON VENİ CD1..
Dosya adı: Nur KÜBRA ÇANKIRILI yuksek lisan..
Dosya boyutu: 27M
Sayfa sayısı: 68
Kelime sayısı: 13,669
Karakter sayısı: 97,917
Gönderim Tarihi: 29-Ağu-2019 11:14AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1164747536



9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Nur Kübra ÇANKIRILI
Doğum Tarihi : 08 Şubat 1994
Doğum Yeri : İzmir
Uyruk : Türkiye Cumhuriyeti
Unvanı : Biyolog
Ev Adresi : 2651. Sokak Funda Sitesi 1 Blok Daire: 5 Çayyolu / Çankaya
/ ANKARA
E-posta Adresi : kubra.cankirili12@hacettepe.edu.tr
cankirilikubra@gmail.com
Telefon (Cep) : 0555 608 9739

II. Eğitimi

Yüksek Lisans Hacettepe Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü /Kök
2017-2019 Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
Tez Adı: İnsan Göbek Kordon Veni CD146+ Hücrelerin ve Bu Hücrelerden Elde Edilen Matriks Proteinlerinin *in vitro* Biyofilm Modellerinde Değerlendirilmesi
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK
Lisans Hacettepe Üniversitesi / Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü
2012-2016 Anabilim Dalı

III. Bilimsel Faaliyetler

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. Çankirili N,K., Altundag O., Çelebi-Saltik B., Skin Stem Cells, Their Niche and Tissue Engineering Approach for Skin Regeneration. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2019

Görev Aldığı Projeler

1. İnsan Göbek Kordon Veni CD146+ Hücrelerin ve Bu Hücrelerden Elde Edilen Matriks Proteinlerinin *in vitro* Biyofilm Modellerinde Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Hızlı Destek Projesi, Araştırmacı, 2018.