



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MATERNAL KANDAN İZOLE EDİLEN FETAL  
MİKROKİMERİK HÜCRELERİN BEYİN HASARINA  
ETKİLERİNİN FAREDE ARAŞTIRILMASI**

AYSUN ÇAĞLAYAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL 2022

## **TEZ ONAY FORMU**

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Aysun ÇAĞLAYAN  
Tez Başlığı : Maternal Kandan İzole Edilen Fetal Mikrokimerik Hücrelerin  
Beyin Hasarına Etkilerinin Farede Araştırılması  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 23.06.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

<b><u>Danışman</u></b>	<b><u>Kurumu</u></b>	<b><u>İmza</u></b>
Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ	İstanbul Medipol Üniversitesi	

### **Sınav Jüri Üyeleri**

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK	İstanbul Medipol Üniversitesi
Dr.Öğr.Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	İstanbul Medipol Üniversitesi
Prof.Dr. Mehtap KAÇAR	Yeditepe Üniversitesi
Doç.Dr. Birsen ELİBOL	Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun  
...../...../ ..... tarih ve ...../..... - ..... sayılı kararı ile şekil  
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Aysun CAĞLAYAN

## İTHAF



*'Bu tez canım kardeşim Aycan Dilden,  
kıymetli annem Öznur Dilden ve kıymetli babam Hüseyin Dilden'e ithaf edilmiştir.'*

## TEŞEKKÜR

Bilgi, tecrübe ve disipliniyle tez çalışmalarım sırasında her zaman bana ilham veren danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a teşekkürü bir borç bilirim. Zaman ve emek isteyen bu yolda çalışma ortamımızı huzurlu kıldığı, bilimsel çalışmalarda bize rehberlik etmesinin yanı sıra bir danışmanın ötesinde her daim abi gibi güler yüzle bizi dinleyerek, bu hayatta yalnız olmadığımızı hissettirdiği için en içten sevgi ve saygılarımı sunarım.

Değerli tez jüri üyelerime katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Başta Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar Beker olmak üzere bir parçası olmaktan gurur duyduğum ve ihtiyacım olan her zaman bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen laboratuvar ekibimize teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı tamamlarken ve tezimi yazarken desteklerini esirgemeyen, yorgun düştüğümde elimden tutan, ekip arkadaşlığından çok bana dost olan meslek arkadaşlarım Nilay Ateş Özsoy ve Reyhan Zeynep Gündoğdu Özdemir'e çok teşekkür ederim.

İstanbul Medipol Üniversitesi SABİTA bünyesinde çalışan, her zaman güler yüzle sorularıma cevap vererek benden yardımlarını esirgemeyen Büşra Batgi ve Mehtap Şimşek'e teşekkür ederim. Yine İstanbul Medipol Üniversitesi MEDİTAM ailesine çalışmalarına olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Beni sevgi ve şefkatle büyüten, aldığım her kararda yanımda olan ailem kardeşim Aycan Dilden, annem Öznur Dilden ve babam Hüseyin Dilden'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Ve büyükbabam Abdi Dilden'e bana inandığı ve kendime inanmamı sağladığı için onu sevgi ile anarak teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışma azmi ve bilgisiyle bana örnek olan, hayat yolunda desteğini her zaman yanımda hissettiğim, arkadaşım, dostum, sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak Çağlayan'a en derin sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Mikrokimerizm.....	4
4.2. Mikrokimerizm Türleri.....	5
4.2.1. Yapay olarak oluşan mikrokimerizm.....	5
4.2.1.1. Kan Transfüzyonu ve mikrokimerizm .....	5
4.2.1.2. Organ transplantasyonu ve mikrokimerizm.....	6
4.2.2. Doğal olarak oluşan mikrokimerizm.....	7
4.2.2.1. Fetal mikrokimerizm .....	7
4.3. Fetal Mikrokimerizm ve Maternal Sağlık .....	10
4.4. Fetal Mikrokimerik Hücreleri Tespit Etme Yöntemleri.....	13
4.5. Fetal Mikrokimerizm ve Kök Hücre Tedavisi .....	13
4.6. İskemik Beyin Felci.....	14
4.7. İskemik Beyin Felci Patofizyolojisi .....	15
4.7.1. Ekstraselüler alanda meydana gelen glutamat birikimine bağlı ekzitotoksisite.....	16
4.7.2. Hücre içi kalsiyum artışını takip eden oksidatif stres .....	17
4.7.3. İskemi sonrası hücre içi kalsiyum birikimi ve buna bağlı endoplazmik retikulum stresi.....	18
4.7.4. İnflamatuar yanıt .....	18

4.7.5.	Peri-infarakt depolarizasyonu ile yayılan depresyon.....	19
4.8.	İskemik Beyin Felci ve Fetal Mikrokimerizm .....	20
<b>5.</b>	<b>MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>22</b>
5.1.	Deney Dizaynı .....	22
5.2.	Hayvanların Çiftleştirilmesi .....	25
5.3.	Maternal Kandan Akış Sitometrisi Kullanılarak GFP (+) Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Ayırıştırılması .....	25
5.4.	Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO).....	26
5.5.	GFP (+) Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Enjeksiyonu .....	27
5.6.	Fetal Mikrokimerik Hücrelerin İskemik Farelerde Tespiti .....	28
5.6.1.	Akış sitometrisi yöntemiyle beyinde GFP (+) hücrelerin tespiti .....	28
5.6.2.	Akış sitometrisi yöntemiyle kanda GFP (+) hücrelerin tespiti .....	30
5.6.3.	Beyin kesitlerinde GFP (+) hücrelerin tespiti .....	31
5.6.3.1.	<i>Örneklerin toplanması .....</i>	<i>31</i>
5.6.3.2.	<i>GFP (+) hücrelerin tespiti.....</i>	<i>31</i>
5.7.	Kısa Dönem Ödem Oluşumu ve Uzun Dönem Post-iskemik Hemisfer, Korpuz Kallozum ve Striatum Alanının Değerlendirilmesi.....	32
5.8.	Kısa Dönem ve Uzun Dönem Nöronal Sağkalımın Belirlenmesi.....	33
5.9.	F4/80 Boyaması ile Kısa Dönemde Makrofajların Değerlendirilmesi.....	34
5.10.	İskemik Beyin Felci Sonrası Hücre Tedavisi Uygulanan Hayvanlarda Uzun Dönem Fetal Hücre Dağılımının Değerlendirilmesi .....	35
<b>6.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>36</b>
6.1.	Uterus Veninde Tespit Edilen GFP (+) Fetal Mikrokimerik Hücreler.....	36
6.2.	Maternal Kanda Akış Sitometrisi Yöntemiyle Tespit Edilen Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Analizi .....	38
6.3.	İskemik Farede Fetal Mikrokimerik Hücre Tedavisi Sonrası Juguler Venin Görüntülenmesi .....	40

6.4. İskemik Farede Akış Sitometrisi Yöntemi ile Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Tespiti.....	42
6.5. İskemik Striatumda Kısa Dönemde Tespit Edilen Fetal Mikrokimerik Hücre Görseli.....	44
6.6. Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Kısa Dönemde İskemi Sonrası Ödem Oluşumuna Etkisi.....	46
6.7. Fetal Mikrokimerik Hücre Tedavisinin Kısa Dönemde Nöronal Sağkalım Üzerine Etkisi.....	47
6.8. Kısa Dönemde Hücre Tedavisinin İskemik Striatumda Makrofajlar Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	48
6.9. Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Vücuttaki Dağılımının Değerlendirilebilmesi İçin Vücut Alanlarının Belirlenmesi.....	49
6.10. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Zamana Bağlı Dağılımının Belirlenmesi.....	50
6.11. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Beyin Kesitlerinde Tespiti.....	53
6.12. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Hemisfer, Korpus Kallozum ve Striatum Alanına Etkisi.....	55
6.13. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Nöronal Sağkalıma Etkisi.....	57
<b>7. TARTIŞMA.....</b>	<b>59</b>
<b>8. SONUÇ.....</b>	<b>67</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>68</b>
<b>10. ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>87</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>88</b>



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AMPA</b>	Alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazolpropiyonik
<b>BLT</b>	Biyolüminesans Tomografi
<b>BLT/CT</b>	<i>in vivo</i> Biyolüminesans Üç Boyutlu Görüntüleme Yöntemi
<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumin
<b>CaM</b>	Kalmodulin
<b>CT</b>	Bilgisayarlı Tomografi
<b>DAPI</b>	4,6-Diamidino-2-Fenilindol
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>FBS</b>	Fetal Bovin Serum
<b>FDA</b>	Amerika Gıda ve İlaç İdaresi
<b>FISH</b>	<i>in situ</i> Hibridizasyon
<b>FMH</b>	Fetal Mikrokimerik Hücreler
<b>GFAP</b>	Glial Fibriler Asidik Protein
<b>GFP</b>	Yeşil Floresan Proteini
<b>LUC</b>	Lüsiferaz Enzimi
<b>NeuN</b>	Nöronal Nükleer Protein
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartat
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	Nitrik Oksit Sentaz
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit

<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroksinitrit
<b>OSAO</b>	Orta Serebral Arter Oklüzyonu
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi
<b>PFA</b>	Paraformaldehit
<b>ROI</b>	İlgili Bölge
<b>tPA</b>	Doku Plazminojen Aktivatörü
<b>UPR</b>	Katlanmamış Protein Yanıtı



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1	Uzuvlarını üç farklı hayvandan alan kimera.....	4
Şekil 4.2.2.1.1	Fetal ve maternal kan dolaşımı .....	9
Şekil 4.7.1	İskemik koşullarda beyin hücrelerinde meydana gelen patolojik olaylar	16
Şekil 5.1.1	Deney dizaynının şematik görüntüsü .....	24
Şekil 5.3.1	Maternal kandan fetal mikrokimerik hücrelerin eldesi.....	26
Şekil 5.4.1	Orta Serebral Arter Oklüzyonu Yöntemi (OSAO) .....	27
Şekil 5.5.1	Fare kuyruk arteri kanülasyonu ile fetal mikrokimerik hücrelerin hasarlı hayvana verilmesi.....	28
Şekil 5.6.1.1	Akış sitometrisi yöntemiyle fetal mikrokimerik hücrelerin hasarlı hayvanın beyin dokusunda tespiti. ....	29
Şekil 5.6.2.1	Hasarlı hayvanların kanında fetal mikrokimerik hücrelerin tespiti .....	30
Şekil 5.6.3.1.1	Kryostat cihazı ile hasarlı hayvanın beyninden alınan kesitler .....	31
Şekil 6.1.1	Uterus veninde (kırmızı kare içerisinde) tespit edilen GFP (+) fetal mikrokimerik hücreler.....	36
Şekil 6.2.1	Maternal kandan izole edilen hücreler Akış Sitometri Cihazı ile değerlendirilmesi.....	38
Şekil 6.3.1	Hücre tedavisinden 72 saat sonra fetal hücrelerin Juguler vende tespiti.	40
Şekil 6.4.1	İskemik erkek farelerin kanından ve beyninden izole edilen hücrelerin Akış Sitometri Cihazı ile değerlendirilmesi. ....	42
Şekil 6.5.1	İskemik striatumda hücre tedavisinden 72 saat sonra GFP (+) fetal mikrokimerik hücrelerin değerlendirilmesi.....	44
Şekil 6.6.1	Cresyl Violet boyaması ile ödemin değerlendirilmesi.....	46
Şekil 6.7.1	Kısa dönemde nöronal sağkalımın değerlendirilmesi.....	47
Şekil 6.8.1	Kısa dönemde hücre tedavisinin striatumda makrofajlar üzerine etkisinin değerlendirilmesi.....	48
Şekil 6.9.1	Biyoluminesans/ Bilgisayarlı Tomografi (BLT/CT) görüntülemesinde segmentasyon ile baş, beyin ve vücut bölgeleri belirlenmesi. ....	49
Şekil 6.10.1	Uzun dönemde iskemi sonrası fetal mikrokimerik hücrelerin zamana bağlı dağılımını gösteren BLT/CT görüntüleri. ....	50
Şekil 6.10.2	Uzun dönemde iskemi sonrası fetal mikrokimerik hücrelerin zamana bağlı beyin, baş ve gövde bölgesinde değişimi.....	51

<b>Şekil 6.11.1</b> İskemik striatumda hücre tedavisinden 30 gün sonra GFP (+) fetal mikrokimerik değerlendirilmesi.....	53
<b>Şekil 6.12.1</b> Hücre tedavisi sonrası uzun dönemde iskemik hemisfer, striatum ve korpus kallozum alanlarının değerlendirilmesi.....	55
<b>Şekil 6.13.1</b> Fetal mikrokimerik hücrelerin uzun dönemde nöronal sağkalıma etkisi. .....	57



## 1. ÖZET

### MATERNAL KANDAN İZOLE EDİLEN FETAL MİKROKİMERİK HÜCRELERİN BEYİN HASARINA ETKİLERİNİN FAREDE ARAŞTIRILMASI

Fetal kökenli hücrelerin az miktarda maternal dolaşımında ve maternal dokularda bulunması fetal mikrokimerizm olarak tanımlanmaktadır. Fetal mikrokimerik hücrelerin (FMH) hamilelik sırasında plasentayı geçerek maternal dolaşıma katıldığı ve maternal dokulara göç ettiği bilinmektedir. Ayrıca, hamilelik sonrasında fetal mikrokimerik hücreler, maternal kan ve dokularda tespit edilebilmiştir. Maternal dokuda hasar olduğu durumlarda ise hasara yönelerek burada fonksiyonel hücrelere dönüştüğü ve hasarlı bölgenin onarılmasına katkıda buldukları düşünülmektedir. İskemik beyin felci dünyada ölüm nedenleri arasında ön sıralarda gelmekte, fonksiyonel ve psikolojik aktivitelerde bozulmaya yol açmaktadır. Uygulanabilir tek tedavisi doku plazminojen aktivatörü (tPA) olmasına rağmen, tedavi uygulamasındaki zaman kısıtlaması nedeniyle çoğu hasta bu tedavi için elverişli değildir. Bu durum FMH'leri iskemi beyin felci tedavisinde yeni bir yaklaşım olabileceğini akla getirmiştir. FMH'lerin iskemik beyin felci üzerine etkilerini anlayabilmek için, insanda beyin felci hastalarının %80'ine yakınının etkilendiği iskemik beyin felci olan orta serebral arter oklüzyonu modeli kullanılmıştır. Tedavi olarak uygulanan FMH'lerin maternal ortam dışında kan-beyin bariyerini geçebildikleri, kısa dönemde (72 saat) iskemik hasarda nöronal sağkalımı artırıp ödemi azaltarak tedavi potansiyeline sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca, FMH'lerin, immün sisteminden saklanarak uzun dönemde (30 gün) hayatta kalabildikleri görülmüştür. FMH'lerin hasar sonrası uzun dönemde iskemik beyin bölgesine göç ettiği biyoluminesans tomografi tekniği kullanılarak gösterilmiştir. Ayrıca yapılan immünfloresan boyamalarla bu hücrelerin hasarlı beyin alanında nörona farklılaştığı tespit edilmiştir. FMH'lerin fetal ve maternal doku dışında başka bir canlının immün sistemini aşarak uzun dönem hayatta kalması, kan beyin bariyerini geçmesi ve hasara yönelmesi hücre tedavisi temelli translasyonel çalışmalarda kullanılması için umut vadetmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Fetal mikrokimerizm, Hücre tedavisi, Hücre geçişi, İskemik beyin hasarı, Serebral iskemi

## **2. ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF FETAL MICROCHIMERIC CELLS ISOLATED FROM MATERNAL BLOOD ON BRAIN INJURY IN MICE**

The presence of fetal-derived cells in small amounts in the maternal circulation and maternal tissues is defined as fetal microchimerism. Transition of fetal microchimeric cells (FMC) into the maternal circulation by crossing the placenta during pregnancy, migration of them to maternal tissues is already known. FMCs are also detectable in maternal blood and tissues after pregnancy. In cases where the maternal tissue is damaged, it is thought that FMCs head towards to damaged tissues, turn into functional cells and contributes to the repair of the damaged area. Ischemic stroke is the leading causes of death in the world, and it leads to deterioration in functional and psychological activities. Although the only applicable treatment is tissue plasminogen activator (tPA), most of the patients are not eligible for this treatment because of time limitation of it. This suggests that FMCs can be a new approach in the treatment of ischemic stroke. In order to understand the effects of FMCs on ischemic stroke, the middle cerebral artery occlusion model, in which up to 80% of human stroke patients are affected, was used. It has been observed that FMCs applied as treatment can cross the blood-brain barrier and have therapeutic potential by increasing neuronal survival and reducing edema in ischemic damage in the short term (72 hours) outside the maternal environment. In addition, it has been observed that FMCs can survive in the long term (30 days) by hiding from the immune system. Migration of FMCs to the ischemic brain region was shown via bioluminescent tomography technique in the long-term after ischemia. Moreover, it was detected that FMCs were differentiated into neurons in the damaged brain area by immunofluorescent staining. The long-term survival of FMCs by exceeding the immune system of another organism other than fetal and maternal tissue, their ability to cross the blood-brain barrier and tend to migrate damaged area are promising for their use in cell therapy-based translational studies.

**Key Words:** Cell therapy, Cell transfer, Cerebral ischemia, Fetal microchimerism, Ischemic brain injury

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir bireyde başka bir bireye ait hücre popülasyonunun ya da kalıtsal materyalin az miktarda bulunması mikrokimerizm olarak adlandırılır (1). Mikrokimerizm kan transfüzyonu, organ transplantasyonu gibi iki farklı birey arasında gerçekleştirilen transfer sonucu yapay olarak ortaya çıkabildiği gibi, doğal fizyolojik bir süreç olan gebelik sırasında da gözlemlenebilir (2). Hamilelik sırasında ve sonrasında fetal kökenli hücrelerin düşük miktarda maternal kanda ve dokuda bulunması fetal mikrokimerizm olarak tanımlanmaktadır (3). Fetal mikrokimerik hücrelerin plasental bariyeri geçerek maternal dolaşıma katıldığı sonrasında maternal kemik iliği, karaciğer, kalp ve beyin gibi organlara göç ederek bu organlara entegre olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (4-8). Son yıllarda birçok farklı maternal dokuda bulunduğu gösterilen fetal mikrokimerik hücrelerin, göç ettikleri hasarlı maternal dokuda fonksiyonel hücrelere dönüşerek hasarlı dokunun yeniden modellenmesine katkı sağladığı bildirilmiştir (9, 10).

İskemi beyin felci dünyada önde gelen ölüm sebepleri arasında yer almasına rağmen Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylı tek tedavisi doku plazminojen aktivatörüdür (tPA) (11). Klinik çalışmalarda test edilen ilaçların kan-beyin bariyerini geçmekte başarısız olması, klinik verinin yetersiz olması ve hastalık hakkında yeterli farkındalığın olmaması; hastalığı bu denli ölümcül yapan faktörler arasındadır (12). Bu durum araştırmacıları güvenilir, uygulanabilir, tedavi potansiyeli yüksek olduğu düşünülen hücre temelli tedavi çalışmalarına itmiştir (13).

Bu tezde maternal kandan izole edilen fetal mikrokimerik hücrelerin, orta serebral arter oklüzyonu yöntemiyle iskemik beyin felci indüklenen farelerde tedavi amaçlı kullanılması amaçlanmıştır. İskemik beyin felci indüklenen farelere reperfüzyon başlangıcında kuyruk arteri kanülasyonu ile verilen hücreler kısa dönem (72 saat) ve uzun dönem (30 gün) olmak üzere farklı zaman dilimlerinde takip edilmiştir. Fetal mikrokimerik hücrelerin kısa ve uzun dönemde iskemik beyin hasarı parametreleri üzerine etkisi ve biyoluminesans üç boyutlu *in vivo* hücre görüntüleme yöntemi kullanılarak uzun dönemde dağılımını araştırmak amaçlanmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Mikrokimerizm

Kimera, uzuvlarını üç farklı canlı olan aslan, keçi ve yılandan alan bir yaratığı temsil etmek için Yunan mitolojisinde kullanılan bir terimdir (14). Günümüzde kalıtsal olarak birbirinden farklı hücre popülasyonlarının bir arada bulunması kimerizm olarak adlandırılmaktadır (15). Bir bireye ait hücre popülasyonunun veya kalıtsal materyalin başka bir bireyde az miktarda bulunması ise mikrokimerizm olarak ifade edilir (2).



Şekil 4.1.1 Uzuvlarını üç farklı hayvandan alan kimera

Önceleri çiftliklerde dişi ve erkek olarak dünyaya gelmiş bir çift ikiz ineğin dişi olanının genellikle kısır olduğu bilinirdi. Lillie ve arkadaşları ikizlerin anastomoz sayesinde uterusunda kan dolaşımını paylaştıklarını, dişi ikizinin erkek ikizinin dolaşımında olan hormonlara maruz kalmasının dişi ikizde kısırlığa yol açtığını göstermiştir (16). Araştırmacı Owen'ın 80'den fazla sığır ikizi üzerine yaptığı çalışma ise ikizler arasında hormonlardan daha fazlasının paylaşıldığı yönündedir. Araştırmacıya göre yetişkin hayvanın eritrositleri atalarından gelen embriyonal hücrelerdir ve bu hücreler ikizlere yerleşebilir, yaşam boyunca ikizlerde ihtiyaç duyulan kan hücresine kaynaklık edebilir. Owen ve arkadaşlarının 1945 yılında yaptıkları araştırma mikrokimerizmi anlamaya yardımcı olmaktadır. Yapılan çalışmada aynı plasentaya sahip sığır ikizlerinin genetik olarak kendisine ait ve ikizine ait kırmızı kan hücrelerine bir arada sahip olduğu ve ilerleyen yaşamlarına kadar uzanan kırmızı kan hücresi kimerizmi gösterdiği belirtilmiştir (17, 18).



Son dönemde yapılan araştırmalar mikrokimerizmin otoimmün hastalıklar başta olmak üzere kanser ve yara iyileşmesi gibi birçok konu ile ilgili ilişkisini ortaya koymaktadır. Bu bağlantı mikrokimerizmi çalışma konusu olarak ilgi çekici kılmaktadır (15, 19, 20).

## **4.2. Mikrokimerizm Türleri**

Bir bireyden başka bir bireye çeşitli yollarla gerçekleşen hücre, doku ve ya organ transferi sonucu mikrokimerizm gözlemlenmektedir (21). Transfer sonrasında iki farklı hücre popülasyonu ya da kalıtsal materyal aynı organizmada bir arada bulunmaktadır. Bu durum dışarıdan bir müdahale ile gerçekleşebildiği gibi doğal kaynaklı da ortaya çıkabilir (2). Mikrokimerizm, gerçekleşen transferin kökenine ve nasıl olduğuna bağlı olarak farklı alt başlıklarda sınıflandırılmaktadır (21, 22).

### **4.2.1. Yapay olarak oluşan mikrokimerizm**

Doğal yollarla gerçekleşmemiş, dışarıdan bir müdahale sonucu ortaya çıkan mikrokimerizm yapay mikrokimerizm olarak adlandırılmaktadır. Yapay mikrokimerizmin görüldüğü durumlar genellikle kan transfüzyonu, organ veya kemik iliği transplantasyonudur (23-25). Bu gibi durumlarda donör bireye ait hücre ve/ veya kalıtsal materyal transferin yapıldığı alıcı bireye geçiş yapmakta ve alıcı bireyde tespit edilebilmektedir (26).

#### **4.2.1.1. Kan Transfüzyonu ve mikrokimerizm**

Kan transfüzyonu uzun yıllardır gerçekleştirilen rutin bir klinik prosedürdür. Küçük bir allojenik hücre popülasyonunun alıcıda gözlemlenmesi sebebiyle mikrokimerizm kaynakları arasında gösterilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu tekniği geliştikçe kan transfüzyonuna bağlı mikrokimerizm hakkında yeni bilgiler edinilmiştir (27). Yaşam boyu kırmızı kan hücresi transfüzyonuna bağımlı talasemi hastalarında transfüzyon ile ilişkili mikrokimerizm oluştuğu gözlemlenmiştir. Gözlemlenen mikrokimerizmin düzenleyici T hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerinin immün yanıtlarıyla değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (28). Kan transfüzyonunun alıcıda immün baskılayıcı etkileri olduğu bilinmektedir (29). Kan transfüzyonunun bu etkilerini kullanmak amaçlı bazı transplantasyon operasyonlarından önce donöre özğü kan transfüzyonu yapılmaktadır (30). İmmün

baskılayıcı bu etkinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamasa da transfüzyon sonrasında gelişen mikrokimerizmin immün düzenleyici rol oynadığı düşünülmektedir (31).

#### **4.2.1.2. Organ transplantasyonu ve mikrokimerizm**

Organ transplantasyonu sonrasında donöre ait az sayıda hücrenin transplante edilen organ dışına çıktığı, alıcının dolaşımına katıldığı ve uzun süreler alıcının farklı dokularında tespit edilebilir olduğu gösterilmiştir (32). Starlz ve arkadaşları sağlıklı erkeklerden alınan karaciğer transplantasyonu yapılan dokuz kadın hastanın 8'inde Y kromozomuna rastladığı çalışmayı literatüre kazandırmıştır (25). Yine Starlz ve arkadaşları böbrek transplantasyonu yapılan beş hastanın kanında, lenf nodlarında ve derisinde donöre ait hücreleri transplantasyondan yıllar sonra tespit ettiğini bildirmiştir (33). Transplantasyon yapılan hastalarda donörden gelen bu hücrelerin oluşturduğu mikrokimerizmin aynı zamanda donörden gelen organa karşı tolerans geliştirmeye yardımcı olduğu ve organın reddini engellediği düşünülmektedir (34).

Organ transplantasyonlarında alıcının donörden gelen organı reddetmesini engellemeye yönelik immün baskılayıcı ajanlar kullanılmaktadır. Her ne kadar immün baskılayıcı ajanlar donör organın alıcı bireyde reddini engellese de uzun süreli kullanımları alıcı hastada kardiyovasküler hastalıkların ya da malignant tümör oluşumlarının tetiklenmesine yol açmaktadır (35, 36). Yaşam boyu immün baskılayıcı ajan kullanımının hastaya olan yan etkileri araştırmacıları alıcı hastanın donör organı reddetmesini engelleyecek alternatif tedavi yöntemlerini geliştirmeye yöneltmiştir. Alıcı hastada yapay kimerizm oluşturarak donöre özgü indüklenmiş immün tolerans oluşturmak bu yöntemlerden biridir (37). Son yıllarda hematopoietik kök hücre transplantasyonu yapay kimerizm kaynağı olarak kullanılmaktadır (38, 39). Bir diğer yapay kimerizm kaynağı ise kemik iliği transplantasyonudur (40). Organ transplantasyonu sonrası immün baskılayıcı ajan tedavisinin yanında aynı donörün hematopoietik kök hücreleri ya da kemik iliği de alıcı hastaya tedavi amaçlı verilir (41). Bu tedavi yöntemiyle organ transplantasyonu yapılan alıcı hastada donöre hücreleri ile kimerizm oluşturulur. Böylelikle oluşturulan kimerizm ile alıcının donöre özgü immün tolerans geliştirmesi sağlanır ve transplante edilen organı reddetmesinin önüne geçilir (32). Ayrıca bu tedavi yöntemi immün baskılayıcı ajanların yaşam boyu

kullanımı yerine daha kısa süreli kullanılmasını sağlamaktadır. Bu sebeple de immün baskılayıcı ajanların uzun süreli kullanımına bağlı gelişen yan etkilerin ortaya çıkmasının önüne geçmektedir (42, 43).

Organ transplantasyonu sonrası yapay olarak indüklenen kimerizm karışık ve tam kimerizm olarak adlandırılmaktadır. Karışık kimerizm hem donörün hem de alıcının hematopoietik hücrelerinin bir arada bulunduğu durumdur (44, 45). Tam kimerizm tanımı ise yalnızca donör hematopoietik kök hücrelerinden farklılaşan hematopoietik hücrelerin alıcıda görüldüğü kimerizmi tanımlamak için kullanılır (42, 46). Organ transplantasyonunda kimerizm hücrelerin saptanabilirliğine göre de isimlendirilir. Alıcı hastada donöre ait hücreler eğer yalnızca polimeraz zincir reaksiyonu gibi hassas yöntemlerle saptanabiliyorsa ya da akış sitometrisi yöntemiyle alıcıda %1'den daha az tespit ediliyorsa bu kimerizm mikrokimerizm olarak ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra karışık ve tam kimerizm, makrokimerizm olarak ifade edilir (42).

#### **4.2.2. Doğal olarak oluşan mikrokimerizm**

Dışarıdan bir müdahale olmaksızın, bireyler arasında fizyolojik olarak gerçekleşen hücre veya kalıtsal materyal değişimiyle ortaya çıkan mikrokimerizm doğal olarak kazanılmış mikrokimerizm olarak adlandırılmaktadır (2). Doğal olarak oluşan mikrokimerizm, fetal mikrokimerizm, maternal mikrokimerizm ve ikizler arasında görünen mikrokimerizm olmak üzere üç ana grupta incelenebilir (47, 48). Bu ana başlıkların yanında grandmaternal mikrokimerizm, gebelikte düşüğe ya da kürtaja bağlı mikrokimerizm ve cinsel birliktelik sonrası ortaya çıkan mikrokimerizm de fizyolojik olarak oluşan doğal mikrokimerizm olarak kabul edilmektedir (49-51).

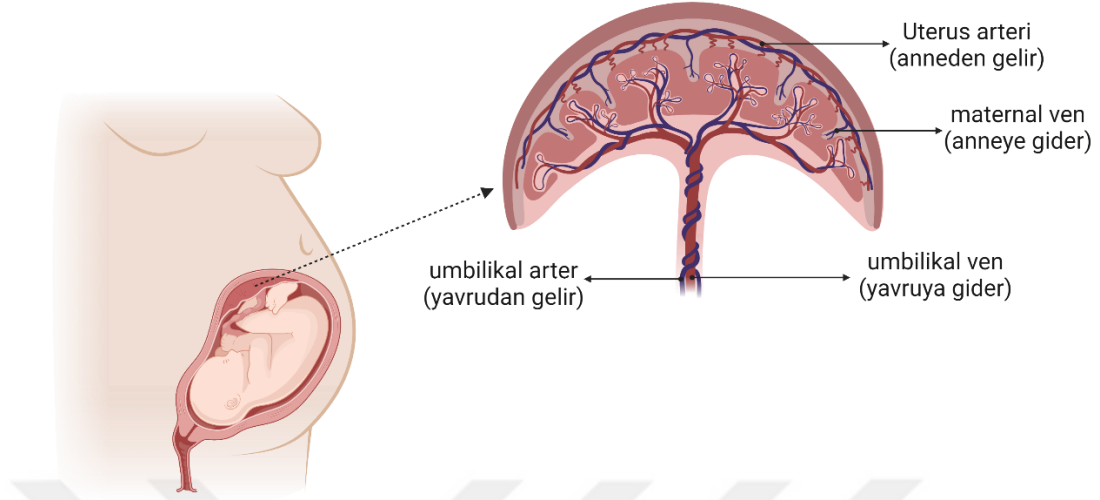
##### **4.2.2.1. Fetal mikrokimerizm**

Gebelik sırasında anne ile fetus arasında maternal, fetal ve plasental hücrelerin çift yönlü fizyolojik hareketi bilinmektedir (52). Bu süreçte fetal kökenli hücrelerin maternal dokuda gözlemlenmesi fetal mikrokimerizm ya da fetomaternal mikrokimerizm olarak ifade edilmektedir (53).

Patolog Georg Schmorl'un 1893 yılında eklampsi tanısı ile hayatını kaybeden 17 kadın hasta üzerinde yaptığı otopsi sonucunda fetüsten anneye hücre geçişi

konusunda merak uyandıran bulgularla karşılaşmıştır (54). Yaptığı otopsi sonrasında Schmorl, maternal pulmoner damarlarda plasental kökenli trofoblast hücrelerine rastladığını raporlamıştır (55). Daha sonra trofoblastlar maternal dolaşımında da görülmüştür (56). Bunun yanı sıra yapılan araştırmalarda maternal dolaşımında fetal kökenli lenfosit, eritroblast, mezenkimal ve hematopoietik öncü hücreler gibi birçok farklı hücre grubunun varlığı gösterilmiştir (57-60). Asıl amacı preeklampsi ve eklampsinin patofizyolojisini anlamak olan Schmorl zaman içerisinde sürekli gelişen hücre geçişi ile ilgili bilgi birikiminin temellerini oluşturmuştur (61).

Fetomaternal hücre geçişini anlamak için plasenta anatomisini, plasentanın fetal ve maternal dolaşım ile olan etkileşimini anlamak gerekmektedir. İnsan ve fare plasentasındaki maternal kanın doğrudan koryon trofoblastlarının fetomaternal etkileşim halinde olduğu hemokoryal özellik göstermektedir. Fetal ve maternal kan dolaşımı, plasental bölgede zigot kökenli hücrelerle sınırlandırılmış; farede labirent, insanda ise fetal plasenta diye bilinen kanallar içerisinde gerçekleşmektedir (62). Trofoblast hücreleri fetal ve maternal dolaşım arasında plasental bir bariyer oluşturmaktadır. Farede tek bir trofoblast katmanı maternal dolaşım ve fetal dokuları birbirinden ayırırken insanda bu üç katmanlı olarak görülmektedir. Fetal kan umbilikal kordda bulunan ven ve arter aracılığıyla labirent ya da fetal plasentaya girer ve çıkar. Maternal kan ise utero-plasental dolaşım ile labirent ya da fetal plasentaya giriş çıkış yapar (62, 63). Fare ve insan plasenta anatomisinde ve plasental dolaşımdaki benzerlikler fetüs ve maternal geçişte plasentanın yerini anlayabilmek adına fare çalışmalarını önemli bir yere koymaktadır (1, 64).



**Şekil 4.2.2.1.1** Fetal ve maternal kan dolaşımı

Her ne kadar plasenta fetal ve maternal dolaşım arasında bir bariyer oluştursa da hem farede hem de insanda fetal hücrelerin gebelik sırasında maternal dolaşıma geçtiği gösterilmiştir (65). Plasenta bariyeri boyunca gerçekleşen fetomaternal hücre geçişinin mekanizması tamamen anlaşılacakla beraber araştırmacıların bu konuyu aydınlatmak adına ortaya koyduğu birtakım hipotezler bulunmaktadır (66, 67). Trofoblast hücre atıklarının plasentadan maternal kana bırakıldığı ve sonrasında uterustan uzaklaştırıldığı süreçte fetal hücrelerin ya da kalıtsal materyalin maternal kana geçişi olasılığı bu hipotezlerden biridir. Bir diğer hipotez ise bu geçişin plasental kan damarlarında travmaya bağlı mikro yırtıklar ile hasar oluşması sonucu gerçekleştiği yönündedir (68). Hücrelerin aktif adezyon mekanizmalarını kullanarak plasenta bariyerini geçtikleri de bir başka hipotezdir (1, 69).

Fetal mikrokimerik hücrelerin patofizyolojik rollerini anlayabilmek için maternal dokuya nasıl, ne zaman ve hangi bölgeye geçiş yaptıklarını anlamak önemlidir (61). Fetal mikrokimerizm genellikle insanlarda, kemirgenlerde ve maymunlarda çalışılmaktadır (70, 71). Fetomaternal hücre trafiğinin insanlarda gebeliğin 4'üncü ile 6'ncı haftalarda başladığı, kemirgenlerde bu trafiğin 11'inci günden itibaren görülmeye başladığı, maymunlarda ise 4'üncü haftadan sonra

gözlemlendiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (70, 72, 73). Geçiş yapan fetal hücrelerin az sayıda olmalarına rağmen gebelik sırasında maternal periferik kanda tespit edilebilir olduğu gösterilmiştir (72). Maternal kanda tespit edilen fetal kökenli bu hücrelerin trofoblast, monosit, eritrosit, hemotopoitik öncü hücre, B ve T lenfositleri olduğu belirtilmiştir (61). Çoğu fetal kökenli hücre gebelikten sonraki ilk haftalarda maternal immün sistem tarafından elimine edilerek maternal dolaşımdan kaybolmaya başlamaktadır (74). Ancak maternal dolaşıma katılan fetal hücrelerin uzun yıllar sonra dahi maternal kanda tespit edilebilir olduğu araştırmacılar tarafından raporlanmıştır. Bianchi ve arkadaşları fetal hücrelerin doğum gerçekleştikten 27 yıl sonra bile maternal kanda kalabileceğini gösteren çalışmalarını ile ilk defa fetal hücrelerin maternal kanda uzun süreli yaşayabildiğini kanıtlamıştır (75). Sonrasında fetal mikrokimerizmin oluşması için canlı doğumun şart olmadığını, gebelik sonlansa da maternal dokuda fetal mikrokimerizmin oluştuğunu göstermiştir (76-78). Placenta bariyerini geçerek maternal dolaşıma giren, doğumdan sonra da maternal immün sistemden kurtulan fetal hücrelerin hayatta kalabilecekleri farklı maternal dokulara doğru göç ettiği bilinmektedir. Bu hücreler doğum gerçekleştikten sonra da maternal dokularda tespit edilebilmiştir (8, 79). Hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda fetal hücrelerin kemik iliği, hipofiz bezi, deri, akciğer, karaciğer ve beyin gibi birçok organa göç ettiği ve bu organlara entegre olduğu gösterilmiştir (4).

### **4.3. Fetal Mikrokimerizm ve Maternal Sağlık**

Anne ve yavrunun birbiri üzerine olan etkisi, her iki tarafın da sağlıklı olarak hayatta kalmasını sağlamak olacak şekilde bir iş birliği içerisinde devam etmektedir. Ancak yapılan araştırmalarda fetal hücreler ve maternal sağlık olumlu şekilde ilişkilendirildiği gibi literatürde fetal hücrelerin maternal sağlığı olumsuz yönde etkilediği ile ilgili yayınlara rastlamak da mümkündür (19, 80). Bu iki farklı etkinin anne ve yavrunun çıkarları doğrultusunda geliştiği düşünülebilir (81).

Fetal hücrelerin maternal dokudaki işlevlerini anlayabilmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde fetal hücrelerin anne sağlığı üzerine etkisi hakkında birbirinden farklı üç ana hipotez bulunmaktadır. Bu hipotezlerden ilki fetal hücrelerin anne sağlığına zararlı olduğu yönündedir. Bu hipoteze göre fetal hücreler maternal doku hasarına katkıda bulunabilen inflamatuvar bir tepkiye katkıda

bulunur (21, 81). Otoimmün hastalıklar kadınlarda erkeklerden daha yaygındır. Hormon değişimleri, fetal mikrokimerizm gibi gebelikle ilgili faktörlerin maternal otoimmün hastalıkları tetikleyebileceği düşünüldüğü için fetal mikrokimerizm sıklıkla otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (82). Khashan ve arkadaşları bir grup hastada yaptıkları çalışmada, ilk gebeliklerinden sonra sezaryen ve vajinal doğum yapmış kadınların hiç gebelik geçirmemiş kadınlara göre daha fazla otoimmün hastalığa yakalanma riski olduğunu bildirmiştir. Çalışmada sezaryen ile doğum yapanların ise vajinal doğum yapanlara göre daha riskli durumda oldukları belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada gebeliği sonlandırılan kadınların sezaryen ile doğum yapanlara kıyasla daha riskli grup olduğu raporlanmıştır. Yazarlara göre bu durum sezaryen ve kürtaj gibi durumlarda ortaya çıkan fetomaternal hemoraj sırasında daha fazla fetal hücrenin maternal dolaşıma geçişinden kaynaklanmaktadır (83). Maternal kanda sezaryen doğum sonrasında vajinal doğuma kıyasla daha fazla fetal mikrokimerizm görüldüğünü açıklayan bir başka çalışma bu durumu kanıtlar niteliktedir (82, 84). Daha önce doğum yapmış sistemik sklerozu bulunan kadınların deri lezyonlarında ve diğer organlarında mikrokimerik fetal kök hücrelere rastlanırken doğum yapmamış kontrol grubunda bu hücrelere rastlanmamıştır. Yazarlar hiç doğum yapmamış kadın ya da sistemik skleroz hastalarında bu hastalığın görülmesini ise maternal mikrokimerik hücrelerle açıklamışlardır (85). Haşimato hastalarında tiroid bezinde nodüler goiter bulunan hastalara göre fetal mikrokimerizmin daha yaygın olduğunu gösteren bir başka çalışma ise Haşimato hastalığının gelişiminde fetal mikrokimerizmin rol oynayabileceğini belirtmiştir. Fetal mikrokimerizm otoimmün hastalıkların dışında oto immün olmayan hepatit C ve kanser ile de ilişkilendirilmiştir (21). Cha ve arkadaşları yaptıkları çalışmada servikal kanser patogeneğinde fetal mikrokimerizmin rolü olduğunu düşündüklerini dile getirmiştir (86).

Fetal hücrelerin anne sağlığına etkisi üzerine diğer hipoteze göre fetal hücreler koruyucudur. Fetal öncü hücreler maternal dokuya entegre olarak dokuyu onarmaya ve korumaya yardımcı olmaktadır (21, 81). Bu hipoteze göre fetal kökenli hücreler otoimmün hastalıkları tetiklemez, yalnızca bu hastalıktan etkilenen maternal dokuda toplanırlar (53). Nelson ve arkadaşları gebeliğin romatoid artirid üzerine iyileştirici bir etkisi vardır. Yaptıkları araştırma sonucunda bu iyileştirici etkinin fetal mikrokimerik kök hücre görülme sıklığıyla bir korelasyon içinde olduğunu belirtmişlerdir (87).

Florim ve arkadaşları ise böbrek biyopsisinde fetal mikrokimerizme rastlanan hastaların böbrek fonksiyonlarının mikrokimerizm rastlanmayan hastalara göre da iyi olduğu yönünde yayın yapmıştır (88). Otoimmün olmayan meme kanseri, tiroid kanser gibi hastalıklarda da fetal mikrokimerik hücrelerin koruyucu etkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan kontrollü bir çalışmada sağlıklı kadınlarda meme kanseri kadınlara oranla fetal mikrokimerik hücelere daha sık rastlanmıştır (89). Elli yedi papilar tiroid kanseri hastası kadın ve 49 sağlıklı kadın arasında yapılan bir çalışmada papilar tiroid kanseri olan kadınlarda daha az fetal kökenli kalıtsal materyale rastlandığını gösteren bulgular elde edilmiştir. Yayımlanan makalede bulgular fetal hücre kimerizminin tiroid kanseri üzerine koruyucu etkileri olduğu yönünde yorumlanmıştır (90). Bütün bunların yanı sıra solid tümörleri, hasar bölgelerini inceleyen birçok araştırma incelendiğinde fetal hücrelerin bu bölgelerde yoğunlaştığı görülmektedir. Son zamanlarda araştırmacılar hücrelerin bu bölgelere göçme sebeplerini ve bu bölgelerdeki işlevlerini anlamaya çalışmaktadır (91, 92). Fetal hücrelerin hasarlı dokuya göç ederek bu dokuya entegre olduğu ve hatta dokuya özgü hücelere farklılaşabildiği gözlemlenmiştir (59). Bu durum ortaya atılan ana hipotezlerin yanı sıra fetal mikrokimerik hücrelerin hasarlı maternal dokuya yerleştikten sonra farklılaşarak hasarı onarmaya yardımcı kök hücre ya da öncü hücreler olduğu yönündedir (59). Fetal kökenli mezenkimal hücrelerin maternal dolaşıma katıldıktan sonra maternal kemik iliğine yerleştiği ve bu dokuya uyum sağlayarak dokuda yaşamını yıllarca devam ettirdiği gösterilmiştir (93). Daha önce kan transfüzyonu olmamış ve bir erkek çocuk dünyaya getirmiş iki kadın hastanın kalbinde kardiyak kökenli olmayan, erkek kalıtsal materyaline sahip kardiyomiyositlere rastlanmıştır. Araştırmacılar bu durumu kadın hastaların kalbinde kolonize olmuş ve mikro-çevreden gelen uyarımlarla kardiyomiyositlere farklılaşmış fetal öncü hücreler ile açıklamaktadır (94). Ayrıca farelerle yapılan çalışmalarda fetal mikrokimerik hücrelerin beyinde perivasküler makrofajlara, nöronlara, astrositlere ve oligodendrositlere dönüşebildiği gösterilmiştir (10).

Araştırmacılara göre bir diğer hipotez ise fetal hücrelerin maternal sağlık üzerine bir etkisi olmadığı yalnızca maternal dokularda var olduğunu savunur (21, 81).



#### 4.4. Fetal Mikrokimerik Hücreleri Tespit Etme Yöntemleri

Fetal kökenli hücreleri özellikle maternal kan ve dokuda çalışmak birtakım zorlukları beraberinde getirmektedir. Buradaki zorluklardan en önemlisi çok düşük sayıda hücreyi tespit etmeye çalışmaktır. Bir diğer zorluk ise hücrelerin maternal kökenli mi yoksa fetal kökenli mi olduğunu ayırt etmektir (81). Fetal mikrokimerizmi tespit etmeye yönelik floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), cinsiyet belirleyici *SRY* geni amplifikasyonu için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu gibi birçok teknik Y kromozomunu hedef almaktadır (95, 96). Maternal dokudaki mikrokimerik hücreler erkek yavrulardan geldiği gibi dişi yavrulardan da gelmektedir. Y kromozomunu hedef alan teknikler dişi yavrulardan gelen fetal hücreleri tespit edememektedir (97). Erkek yavrulardan gelen hücreleri tespit eden bu yöntemlerin dışında insan lökosit antijeni (HLA) tiplmesi ile maternal dokuda hem dişi hem de erkek yavruya ait hücreler başarıyla tespit edebilmektedir (98). Yapılan *in vivo* çalışmalarda genellikle yapay olarak floresan protein ifade edebilen transgenik hayvanlar kullanılmaktadır. Bu hayvanlardan geçiş yapan hücrelerin tespiti ise akış sitometrisi ve/veya immünfloresan tekniklerle yapılmaktadır (10, 99).

#### 4.5. Fetal Mikrokimerizm ve Kök Hücre Tedavisi

Kök hücreler doku ve organların gelişimi ve rejenerasyonundan sorumlu hücrelerdir. Bu hücreler kendilerini yenileyebildikleri gibi birçok hücre grubuna farklılaşabilme özelliğine sahiptir (100). Kök hücreler hasarlı bölgeye direkt transplante edilerek uygulanabilirken doku mühendisliğinde uygun bir iskeleye ekilen hücreler ihtiyaç duyulan doku veya organa entegre edilerek kullanılabilir (101, 102). Kök hücre transplantasyonu çeşitli hematolojik ve onkolojik maligniteler için kullanılan terapötik potansiyeli yüksek bir tekniktir (103). Nörolojik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik hastalıklar gibi sıklıkla görülen hastalıklarda da bu terapötik potansiyelden faydalanmak adına araştırmalar devam etmektedir (104-106).

Fetal kökenli kök hücrelerin immün düzenleyici sinyalizasyonda görev aldığı, yetişkin hücrelere göre daha uzun telomerlere sahip olduğu, bu sebeple de geçiş yaptığı maternal dokuda yıllarca yaşamlarını sürdürebildikleri düşünülmektedir. Ayrıca fetal kökenli kök hücrelerin tedavi potansiyellerinin ifade ettikleri Nanog, Oct4, Rex1 gibi

embriyonik kök hücrelerin pluripotent olmalarında rol oynayan markörlerden kaynaklandığını belirten çalışmalar bulunmaktadır. Bu markörler sayesinde fetal kök hücreler çeşitli doku ve organa entegre olarak bu doku ve organa özgü hücelere farklılaşabilecek potansiyele sahip olmaktadır (107).

#### **4.6. İskemik Beyin Felci**

Beyin felci beyni besleyen kan damarlarının tıkanması ya da yırtılması ile karakterize nörolojik bir hastalıktır. Beyinde oluşan pıhtılar kan damarlarının tıkanmasına ve/veya damarların zedelenecek kanamasına sebep olarak beyinde düzenli kan akışını bozmaktadır. Düzenli kan akışının bozulması beyin hücrelerinin oksijen eksikliğine bağlı ani ölümüne yol açmaktadır (108, 109).

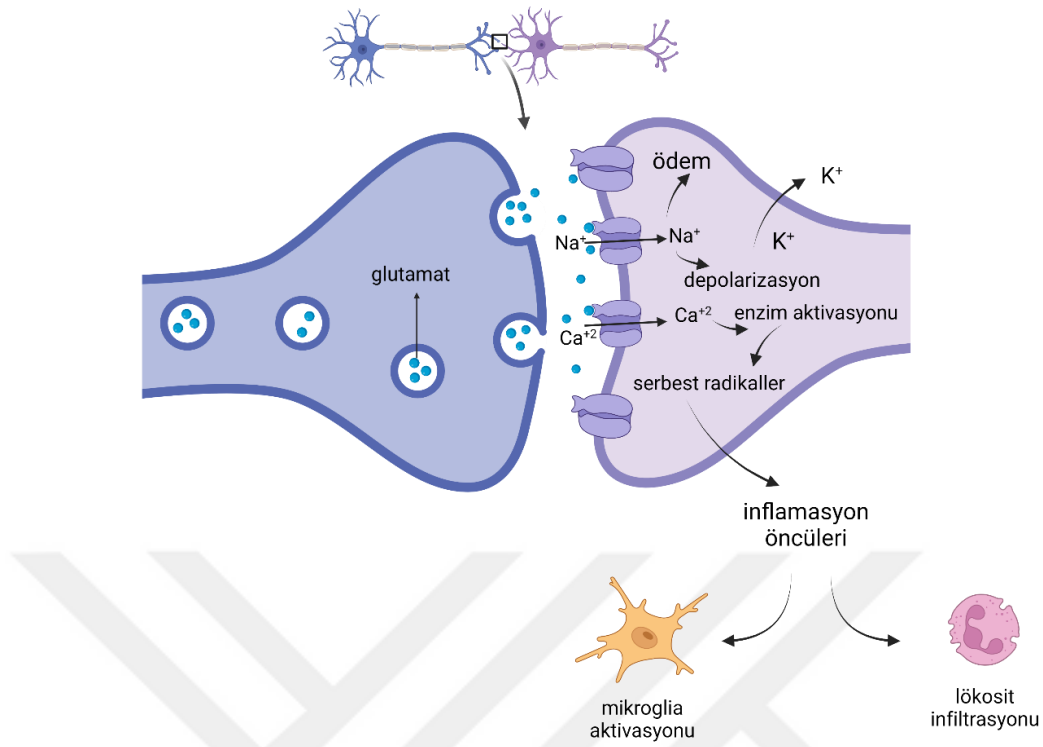
Beyin felci en yaygın serebrovasküler hastalık olmakla beraber dünya genelinde en çok ölüme neden olan ikinci hastalıktır. On üç milyondan fazla insanı etkileyen beyin felci neredeyse beş milyondan fazla insanın ölümüne yol açmaktadır (108). Beyin felci sonrası hayatta kalan hastaların temel ihtiyaçlarını yerine getiremedikleri bilinmektedir. Bunun yanı sıra bu hastaların motor aktiviteleri gerçekleştirmekte güçlük çektikleri, nörolojik ve psikolojik bozukluklar yaşadıkları, hayatlarını bakımlarını gerçekleştirecek bir başka bireye bağlı olarak idame ettirmeye çalıştıkları görülmektedir (110). Hastaların tedavileri, tedavi sonrası ihtiyaç duydukları bakım ve gereksinimler düşünüldüğünde beyin felci ülke ve hasta ekonomisine olan maliyeti oldukça yüksek bir hastalıktır (111). Dünya genelinde sağlık harcamalarının %34'ü beyin felcine yönelik kullanılmaktadır (112). Oldukça yaygın görülen, hasta ve ülkeler için maliyeti yüksek olan bu hastalığın tedavisi için kullanılabilen Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı tek ilaç doku plazminojen aktivatörüdür (tPA). Ancak tPA kullanım aralığı sınırlı bir ilaçtır. Hastalar bu ilaca beyin felci sonrası 3,5 ile 4 saat arasında ulaşmalıdır; aksi takdirde ilaç toksiktir. Bu nedenle hastaların birçoğu beyin felci tedavisinde tPA'den yararlanamamaktadır (113).

İskemik beyin felci düzensiz perfüzyon sonucu beyne yeterli kan ve oksijen iletilmemesinden kaynaklanmaktadır. Beyin felci hastalarının %85'ini oluşturan iskemik beyin felci beyinde trombotik ve embolik durumlar meydana getirmektedir (114). Tromboz durumunda kan akışı, ateroskleroz sebebiyle daralan kan damarlarından etkilenmektedir. Plak oluşumu ile daralan damarlar trombotik iskemiye

sebeptir. Embolik iskemi ise kan pıhtısı ya da hava sebebiyle beyinde azalan kan akışı sonucu meydana gelmektedir. Azalan kan akışı stres yaratarak nekrotik hücre ölümüne yol açmaktadır. Plazma membranının bozulması, organellerin şişmesi ve hücre içi yapıların ekstraselüler bölgeye sızması nekrotik hücre ölümünü takip etmektedir. Bu sürecin sonunda ise beyin hücreleri fonksiyonlarını yitirmektedir (115).

#### **4.7. İskemik Beyin Felci Patofizyolojisi**

Düzenli olarak kan akışının sağlanamaması ihtiyaç duyduğu oksijen ve glikozun beyne iletilmediği anlamına gelmektedir. Yetersiz oksijen ve glikoz beyin için gerekli enerjinin üretilmesine engel olur. Enerji eksikliği membran potansiyelinin kaybolmasına, nöron ve gliaların depolarize olmasına neden olur. Bu durum pre-sinaptik nöronda bulunan voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarının aktive olması ve sinaptik aralığa glutamat salınmasıyla sonuçlanır. Enerji ile geri alımı sağlanabilen glutamat, ortamda yeterli enerji olmadığından geri alınamaz ve sinaptik boşlukta birikir. Bu da glutamat reseptörlerinin gereğinden fazla aktive olmasına sebep olmaktadır. Gereğinden fazla aktive olan glutamat reseptörleri hücre içinde ve dışında  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+}$ ,  $Cl^{-}$ ,  $K^{+}$  iyonlarının yer aldığı iyonik dengeyi bozar. Böylece hücre içinde ve dışında iskemik beyin felci patofizyolojisini oluşturan, *Şekil 4.7.1*'de gösterilen bir dizi olay başlamış olur (116). İskemik beyin felci patofizyolojisini oluşturan bu önemli olaylar glutamat ekzitotoksitesi, artmış hücre içi kalsiyum seviyesi, oksidatif stres, inflamasyon ve peri-infarkt bölgede görülen depolarizasyon olarak sınıflandırılabilir (117-119).



**Şekil 4.7.1** İskemik koşullarda beyin hücrelerinde meydana gelen patolojik olaylar

#### **4.7.1. Ekstraselüler alanda meydana gelen glutamat birikimine bağlı ekzitotoksisite**

Beyin dokusu enerji üretiminin çoğunu oksidatif fosforilasyon ile gerçekleştirdiği için diğer dokulara kıyasla daha fazla oksijen ve glikoza ihtiyaç duymaktadır. Serebral kan akışının bozulması iyonik gradyanların korunması için gereken enerji üretiminde kullanılan oksijen ve glikoz gibi önemli maddelerin beyne iletimini engellemektedir (120, 121). Enerji üretimi için ihtiyaç duyulan oksijen ve glikozun beyne iletilememesi, beyinde enerji eksikliğine yol açmaktadır. Yetersiz enerji durumunda membran potansiyeli kaybolur, nöronlar ve glialar depolarize olur (122). Böylece voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanalları aktive olmaya başlar ve ekstraselüler bölgeye eksitator aminoasitler salınır. Bu aşamada enerjiye ihtiyaç duyulan hücrel süreçlerden biri olan eksitator aminoasitlerin geri alınımı enerji eksikliğinden dolayı gerçekleştirilememektedir. Eksitator aminoasitlerin geri alınamaması ekstraselüler

alandanda glutamat birikimine yol açar. Bu birikim iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerinin gereğinden fazla aktive olması ile sonuçlanır. Glutamat, reseptörlerine bağlanarak iyon kanallarının açılmasını, dolayısıyla iyonik gradyanın bozulmasına neden olur. İyonotropik glutamat reseptörlerinden N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörünün fazlaca aktive olması hücre içi  $Ca^{+2}$  birikimini, sonrasında da buna bağlı fosfolipaz C sinyalizasyonunu tetikler (123). Ayrıca, glutamat aracılı aşırı aktivasyon, glutamat reseptörü olan alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) aktivasyonu ile açılan kanallardan  $Na^{+}$  ve  $Cl^{-}$  iyonlarının nöronlara girişine neden olmaktadır.  $Na^{+}$  ve  $Cl^{-}$  iyonlarının nöronlara girişi  $K^{+}$  iyonunun çıkışından daha fazla olduğundan bu durum nöronların içine pasif olarak su girişini dolayısıyla da ödemin oluşmasını sağlamaktadır (124).

#### **4.7.2. Hücre içi kalsiyum artışını takip eden oksidatif stres**

Hücre içerisinde ikincil haberci  $Ca^{+2}$  artışı, doku hasarına yol açan bir dizi sitoplazmik ve nükleer olayları başlatmaktadır. Proteolitik enzimlerin aktivasyonu ile aktin ve spektrin gibi hücre iskeleti proteinlerinin parçalanması, aktive olan proteazların radikal yakalama mekanizmasını zora sokan fazladan serbest oksijen türlerini üreterek lipid preroksidasyonuna ve membran hasarına yol açması bu olaylardandır (125).

İskemi sonrası bozulan membran bütünlüğü hücre içerisine daha fazla  $Ca^{+2}$  girişine yol açmaktadır. Birçok enzimatik olayda görev alan ikincil mesajcı  $Ca^{+2}$ , hücre içerisinde bulunan enzimlerin aktivasyonunda görev almaktadır. Kalpainler kalsiyum ile aktive olan proteazlardandır. Fonksiyonları  $Ca^{+2}$  tarafından düzenlenen kalpainler, hücre içerisinde  $Ca^{+2}$  gereğinden fazla arttığında; hücre iskeleti proteinleri, membran proteinleri gibi hücrenin yapı ve işlevi açısından önemli yapıların kontrolsüzce yıkımına sebep olur. Bunun yanı sıra yine hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarı artışına bağlı olarak aktive olan endonükleazlar hücre içinde bulunan nükleik asitlere, lipazlar ise membranı oluşturan lipidlere hasar verir (126).

İskemik koşullarda mitokondriyal elektron taşıma zinciri tarafından süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) gibi reaktif oksijen türleri üretilmektedir. Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla sentezlenen bir serbest radikaldir (127). Nitrik oksit sentazın aktivasyonu  $Ca^{+2}$ 'un kalmoduline (CaM) bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. İskemik

beyin felci sonrası nöronlarda nitrik oksit sentaz 1 (NOS1) aktivasyonunun arttığı bilinmektedir (128). Olağandan fazla sentezlenen NO, süperoksitlerle birleşerek oldukça reaktif bir madde olan peroksinitriti (ONOO<sup>-</sup>) oluşturur (127). Hücrelerin sitoplazma ve mitokondrilerinde reaktif oksijen türlerini yakalayıp antioksidan özellik gösteren glutatyon bulunmaktadır. Glutatyon depolarının hasar görmesi ya da hücrede glutatyon gibi antioksidanların yakalayabileceğinden daha fazla reaktif oksijen türlerinin üretilmesi durumunda hücrede oksidatif stres meydana gelmektedir (129). Üretilen bu reaktif oksijen türleri mitokondriyal ve hücre DNA'ya zarar vererek hasarı arttırmaktadır (130).

#### **4.7.3. İskemi sonrası hücre içi kalsiyum birikimi ve buna bağlı endoplazmik retikulum stresi**

Endoplazmik retikulum (ER) nöronların akson, dentrit, presinaptik sinir terminalleri gibi bölgelerinde yaygın olarak dağılmış hücre içi bir organeldir (131). Yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasından, hücre içi Ca<sup>+2</sup> iyonunun depolanmasından ve Ca<sup>+2</sup> sinyalizasyonundan sorumludur. ER fonksiyonunun bozulması, ER stresi olarak bilinen patolojik bir duruma neden olur. ER stresi, başlangıçta protein sentezinin inhibisyonuna, sonrasında protein katlama genlerinin aktive olmasına ve yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasına yol açan süreci başlatmaktadır. Bu süreç katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak da bilinir (132). Endoplazmik retikulumun Ca<sup>+2</sup> depolarının boşalması ve oksidatif stres, ER fonksiyonunu bozarak UPR mekanizmasını tetikleyebilmektedir (133). Ayrıca bu durumun hücrede apoptoz, nekroz ve otofaji gibi ölüm yollarının aktive olmasına neden olduğu da bilinmektedir (134, 135).

#### **4.7.4. İnflamatuar yanıt**

İskemik koşullarda hücre içerisinde biriken ikincil mesajcı Ca<sup>+2</sup>, hücre içerisinde birçok mekanizmanın aktivasyonunu sağlamanın yanı sıra NFκB, Hif1, IRF, STAT3 gibi transkripsiyon faktörleri regüle ederek pro-inflamatuar genlerin ifadesini tetiklemektedir. Ayrıca, hasarlı hücrelerde inflamasyon mediatörleri olan trombosit aktive edici faktör, tümör nekroz faktörü alfa (TNFα) ve interlökin 1β üretilmektedir (136). Bunun yanı sıra endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan ICAM1 ve selektinler gibi adezyon moleküllerinin ifadesi arttırılmaktadır (137). Bu sayede nötrofiller

yüzeyleindeki reseptörler aracılığı ile endoteller üzerinde artan adezyon molekülleri ile etkileşime geçmektedir. Endotellerin üzerine tutunup vasküler duvardan geçen nötrofiller kolayca beyin parankimine yerleşirler. Pro-inflamatuar süreç hasar bölgesini immün hücrelerin periferik bölgeden göç edebilmesi için elverişli hale getirmektedir (138). İskemi sonrası CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL3 gibi kemoatraktanların seviyesinde artış gözlemlenmektedir (139). Kemoatraktanlar reseptörlerine bağlanarak periferik kandan beyin parankimine ilk geçen hücrelerin nötrofiller olmasını sağlamaktadır (138). Nötrofilleri takip eden makrofajlar ve monositler de hasarlı beyin bölgesine göç etmektedir (116).

#### **4.7.5. Peri-infarkt depolarizasyonu ile yayılan depresyon**

İskemik koşullarda meydana gelen metabolik ve iyonik değişimler iskemik bölgede homojen olarak gerçekleşmez. Hasarın merkezinde (*core*), serebral kan akışı normalin neredeyse %20 altında kalmaktadır. Bu bölgede iskemi başlar başlamaz hücreler kalıcı bir şekilde depolarize olmaktadır (140). Hücreler enerji eksikliğine bağlı iyon dengesizliği ile gelişen proteoliz, lipoliz gibi yıkıcı metabolik durumlarla ölüme sürüklenmektedir. İskeminin ölümcül olarak etki gösterdiği bu hasar merkezi ile sağlıklı beyin dokusu arasında '*penumbra*' adı verilen bir bölge yer almaktadır (141). Kan akışının sıkıntılı olduğu bu bölgede metabolik enerji kısmen korunmaktadır (140).

İskemi durumunda ortaya çıkan enerji eksikliği hasarın merkezinde bulunan nöron ve gliaların membran potansiyelini kaybederek kontrolsüz depolarize olmalarına neden olur. Depolarize olan hücreler postsinaptik boşluğa glutamat ve  $K^+$  salmaktadır (142). Kontrolsüz depolarize olan nöronlar iskemik koşullarda tekrar repolarize olamamaktadır. Penumbra bölgesinde bulunan nöronlar ise repolarize olabilirler. Yine bu nöronlar ekstraselüler ortamda artan glutamat ve  $K^+$  sebebiyle depolarize olabilir (116). Kontrolsüzce tekrarlayan bu depolarizasyonlar 'peri-infarkt depolarizasyonu' olarak tanımlanmaktadır. Glutamat ve  $K^+$  iyonu artışına bağlı olarak iyonik dengeleri bozulan nöronların birbiri ardına, bir dalga halinde depolarize olmasına ise yayılan depresyon denmektedir (143).

#### 4.8. İskemik Beyin Felci ve Fetal Mikrokimerizm

Fetal mikrokimerik hücrelerin varlığı, insanda birçok farklı organda tespit edilmiştir (144). İnsan beyni de fetal hücrelerin tespit edildiği organlardan biridir (145, 146). Hamilelik sırasında hücre geçişi mekanizmaları, fetal hücrelerin maternal dokuda dağılımı ve çoğalması tam olarak anlaşılmasa da fetal mikrokimerik hücreler klinik olarak önem taşımaktadır. Literatürde fetal mikrokimerizm hem maternal hastalıklar ile hem de maternal hastalıkları tedavi edici potansiyeli ile eşleştirilmektedir. İnsanda fetal mikrokimerizm hem sağlıklı kadınlarda hem de hasta kadınlarda karşılaşılan bir durumdur. Yapılan araştırmalar fetal hücrelerin maternal dokuya geçtiği bu dokuya özgü farklılaştığı ve bu dokuda ihtiyaç durumunda hasarı uyardığı ya da maternal dokuya geçtikten sonra maternal yanıtın oluşmasına neden olarak olası bir hastalığın prognozunu kötü yönde etkilediği şeklindedir (73, 147).

Yapılan bu çalışmalara rağmen, fetal mikrokimerik hücrelerin protektif olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Literatürde iskemik beyin felci ve fetal mikrokimerizm ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır. Ancak yapılan çalışmalar umut vadetmektedir. Bu konudaki çalışmalardan birinde Tan ve arkadaşları doğal tür dışı farelerde eksitotoksik beyin hasarı oluşturduktan iki hafta sonra bu fareleri transgenik olarak yeşil floresan proteini (GFP) ifade eden erkek farelerle çiftleştirmiştir. Çalışmalarına gebe olan farelerle devam eden araştırmacılar gebelik tamamlandıktan sonra bu farelerden kan ve doku örnekleri toplamış ve bu örneklerde transgenik olarak yeşil floresan proteini ifade eden fetal hücreleri tespit etmiştir. Araştırmacılar fetal hücrelerin kan beyin bariyerini geçerek hasarlı beyin bölgesine yerleştiklerini göstermiştir (10). Bir başka çalışmada araştırmacılar yine fetal mikrokimerizm elde etmek için doğal tür dışı farelerle transgenik olarak GFP ifade eden erkeklerle çiftleştirmiş ve dışı farelerin tek seferden fazla gebelik geçirmesine izin vermiştir. Son gebeliğin tamamlanmasından 3-4 ay sonra dışı farelerde iskemik beyin felci indüklenmiştir. Araştırmacılar GFP ifade eden fetal mikrokimerik hücreleri maternal kan ve hasarlı beyin dokusunda tespit edebildiklerini ve hasar indükledikten otuz gün sonra bakıldığında bu hücrelerin endotel hücre özellikleri gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca araştırmacılar birden fazla doğum yapmanın iskemik beyin felci sonrası oluşan hasara karşı protektif etkisi olduğunu göstermiştir (148).



İskemi sonrası fetal mikrokimerik hücrelerin hasarlı bölgeye göç ettiği araştırmacılar tarafından gösterilse de hasara nasıl göç ettikleri ve koruyucu etkilerinin arkasındaki mekanizmalar aydınlatılmayı beklemektedir.



## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1. Deney Dizaynı

Bu tez çalışmasında yapılan hayvan deneyleri, İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) tarafından alınan etik kurul onayı (17/09/2020 tarihinde, 55 numaralı karar) ile hayvan refahı dikkate alınarak yapılmıştır. Bütün çalışmalar ulusal ve uluslararası etik standartlar gözetilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan hayvanlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngünün düzenli olarak sağlandığı odalarda bulunan kafeslerde yetiştirilmiştir. Yine bu hayvanların yem ve suya erişimi *ad libitum* şeklindedir. Bu çalışmada 8-12 haftalık yetişkin doğal tür dişi BALB/C fareler, doğal tür erkek BALB/C fareler, transgenik olarak yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein, GFP) eksprese eden Tg(CAG-EGFP)10sb/J (#003291, The Jackson Laboratory) transgenik erkek fareler ve transgenik olarak yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein, GFP) ile birlikte ateş böceği lüsiferaz enzimi (Luc) eksprese eden Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85 transgenik erkek fareler (#025854, The Jackson Laboratory) kullanılmıştır.

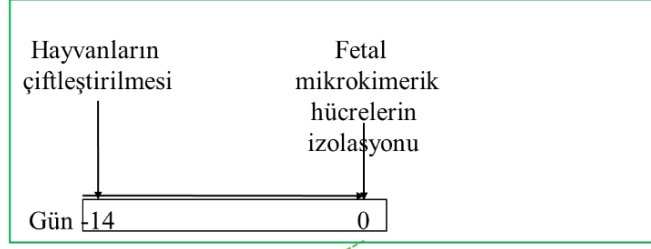
Kısa dönem çalışmalarında fetal mikrokimerik hücrelerin eldesi için doğal tür dişi BALB/C fareler, transgenik olarak yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein, GFP) eksprese eden Tg(CAG-EGFP)10sb/J transgenik erkek fareler ile çiftleştirilmiştir. Hayvanların çiftleştirilmesinden 14 gün sonra fetal mikrokimerik hücreler akış sitometrisi yöntemi kullanılarak izole edilmiştir (Şekil 5.1.1, A). Doğal tür erkek BALB/C farelerde iskemi indüklenmiş, reperfüzyon başlangıcında fetal mikrokimerik hücreler enjeksiyon ile iskemik farelere verilmiştir ve hücre tedavisi gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar 72 saat sonra sakrifiye edilmiş kan ve beyin dokuları yapılacak çalışmalara uygun olarak toplanmıştır (Şekil 5.1.1, B).

Uzun dönem çalışmalarında fetal mikrokimerik hücrelerin eldesi için doğal tür dişi BALB/C fareler, transgenik olarak yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein, GFP) ile birlikte ateş böceği lüsiferaz enzimi (Luc) eksprese eden Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85 transgenik erkek fareler ile çiftleştirilmiştir. Hayvanların çiftleştirilmesinden 14 gün sonra fetal mikrokimerik hücreler akış sitometrisi yöntemi kullanılarak izole edilmiştir (Şekil 5.1.1, A). Doğal tür erkek BALB/C farelerde iskemi indüklenmiş, reperfüzyon başlangıcında hücre tedavisi olarak fetal mikrokimerik

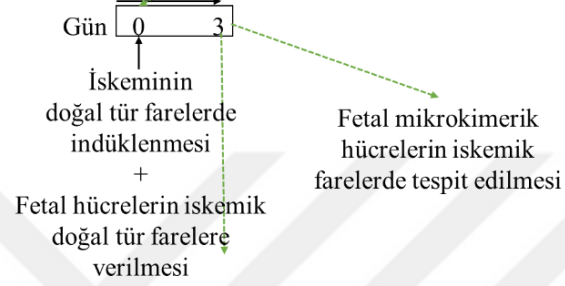
hücreler enjeksiyon ile iskemik farelere verilmiştir (Şekil 5.1.1, C). Sonrasında 30 gün boyunca belirli günlerde biyolüminesans/ bilgisayarlı tomografi ile hayvanlar görüntülenmiştir (Şekil 5.1.1, D). Hayvanlar 30 gün sonra sakrifiye edilmiş beyin dokuları yapılacak çalışmalara uygun olarak toplanmıştır (Şekil 5.1.1, E).



### A Fetal mikrokimerik hücrelerin elde edilmesi



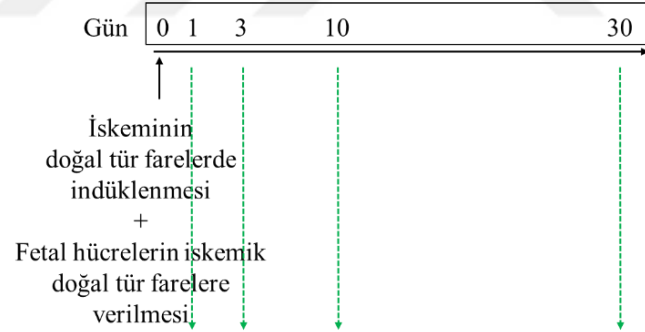
### B Fetal mikrokimerik hücre tedavisi



### Kısa dönem hasar analizi



### C Fetal mikrokimerik hücre tedavisi



### D BLT + CT *in vivo* üç boyutlu biyoluminesans tomografi ile canlı görüntüleme

İskemik hayvanların sakrifiye edilmesi

### E Uzun dönem hasar analizi



Şekil 5.1.1 Deneysel dizaynının şematik görüntüsü

## 5.2. Hayvanların Çiftleştirilmesi

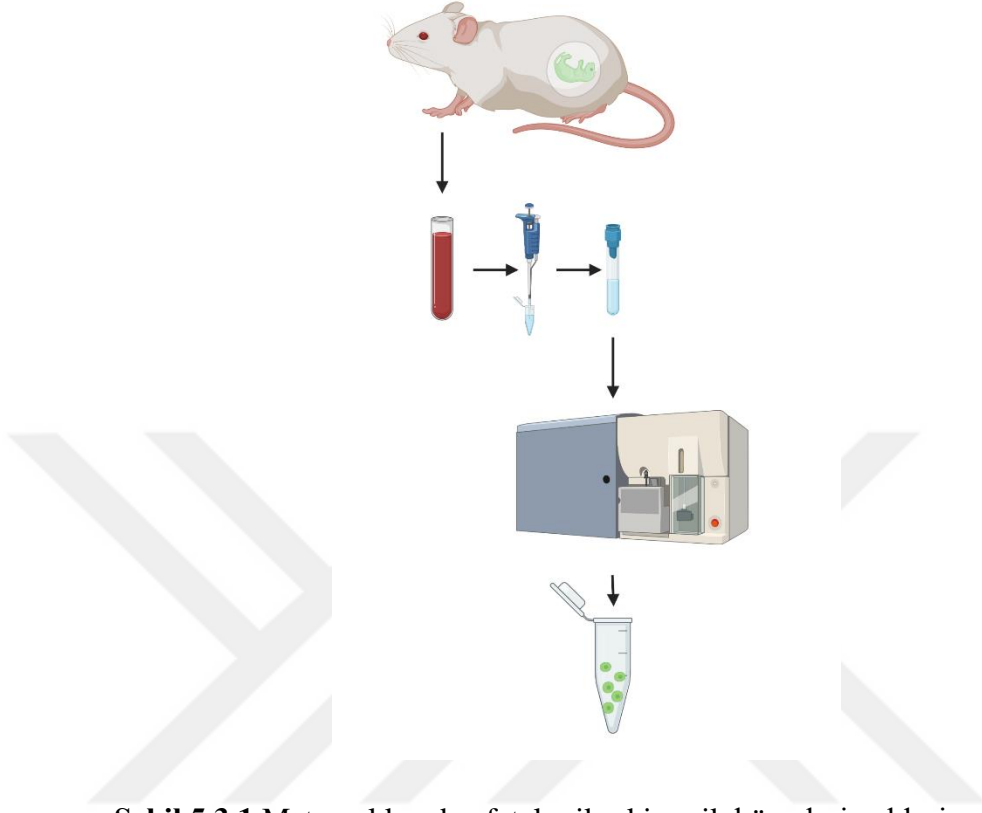
Hücre geçişi ile ilgili çalışmalar için doğal tür dışı BALB/C fareler ile transgenik olarak GFP eksprese eden Tg(CAG-EGFP)10sb/J (#003291, The Jackson Laboratory) transgenik erkek fareler çiftleştirilmiştir. Hayvanların çiftleştirilmesini takiben 14 gün sonra dişi hamile farelerden fetal mikrokimerik hücreler izole edilmiştir.

Canlı hayvan görüntüleme ile ilgili çalışmalar için doğal tür dışı BALB/C fareler ile transgenik olarak GFP ve lusiferaz enzimi eksprese eden Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85 transgenik erkek fareler (#025854, The Jackson Laboratory) çiftleştirilmiştir. Hayvanların çiftleştirilmesini takiben 14 gün sonra hamile farelerden fetal mikrokimerik hücreler izole edilmiştir.

## 5.3. Maternal Kandan Akış Sitometrisi Kullanılarak GFP (+) Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Ayrıştırılması

Transgenik olarak GFP eksprese eden farelerle çiftleşmeye konulmuş ve hamile olan doğal tür dışı BALB/C farelerden GFP (+) fetal mikrokimerik hücrelerin izolasyonu çiftleşmeden 14 gün sonra akış sitometrisi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem için hamile dişi fareler sakrifiye edilmiş, sakrifiye edilen farelerin kanları ayrı ayrı 2 ml santrifüj tüpü içerisine toplanmıştır. Hiç vakit kaybetmeden toplanan kanlar deneye başlamadan önce çift distile su ile seyreltilmiş lizis solüsyonu (10X BD Red Blood Cell Lysis Buffer, #555899, BD Bioscience) bulunan flakon tüplere aktarılmıştır. Kan örnekleri lizis solüsyonu içerisine aktarıldıktan sonra örneklerin bulunduğu tüpler ters-yüz edilerek karıştırılmış ve 15 dakika boyunca karanlıkta, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler 200xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar örneklerin pelletlerine zarar verilmeden uzaklaştırılmıştır. Pelletler %2 Fetal Bovin Serum (FBS) içeren fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS) ile çözülerek yıkama işlemi yapılmıştır. Sonrasında örnekler 200xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek yıkama işlemi tamamlanmıştır. Yıkama işlemi iki kere gerçekleştirilmiştir. Bu işlem bitiminde örnekler 250 µl %2 FBS içeren fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çözülmüştür. Ayrıştırma işlemi için Akış Sitometri Cihazı (BD, Influx Cell Sorter, ABD) kullanılmıştır. Bu işlem sonrasında GFP (+) fetal mikrokimerik hücreler ayrı bir tüpte

toplanmış (Şekil 5.3.1) ve iskemik farelere verilene kadar 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarını sağlayan inkübatörde muhafaza edilmiştir.

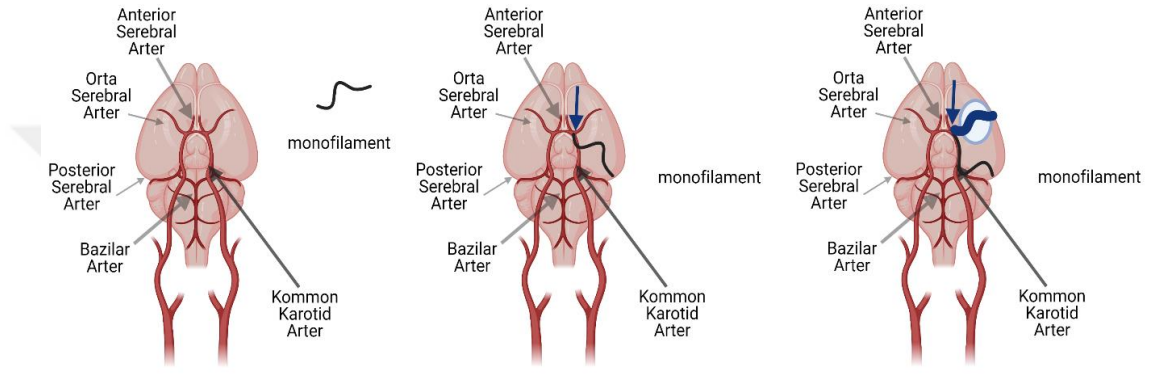


Şekil 5.3.1 Maternal kandan fetal mikrokimerik hücrelerin eldesi

#### 5.4. Orta Serebral Arter Oklüzyonu (OSAO)

Hamilelikten bağımsız olarak BALB/C erkek farelerde iskemi orta serebral arter oklüzyonu (OSAO) yöntemi kullanılarak indüklenmiştir. OSAO ve reperfüzyon uygulaması süresince fareler %1'lik izofluran gaz anestezisi altında tutulmuştur. Farelerin vücut sıcaklıkları takip edilecek ve 36,5-37,0 °C arasında olması sağlanmıştır. OSAO ve reperfüzyon uygulaması süresince beyin kan akımındaki değişimlerinin anlık takibi Laser Doppler flowmetre (Perimed, İsveç) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Farelerin hasarlı hemisferinde Bregma bölgesinin -2 mm posterior ve 6 mm laterale Laser Doppler cihazının fiberoptik probu dental yapııştırıcı ile kafatası kemiğinin üzerine sabitlenmiştir. Monofilament tekniği kullanılarak OSAO modeli oluşturulmuştur. Bu teknikte, boyun bölgesine yapılan kesi sonrası, karotid arterler izole edilecek ve 6-0 ipek (S1165, Doğan, Türkiye) ipele ligasyon yapılmıştır. Geçici olarak damarı tıkamak için mikrovasküler klips internal karotid

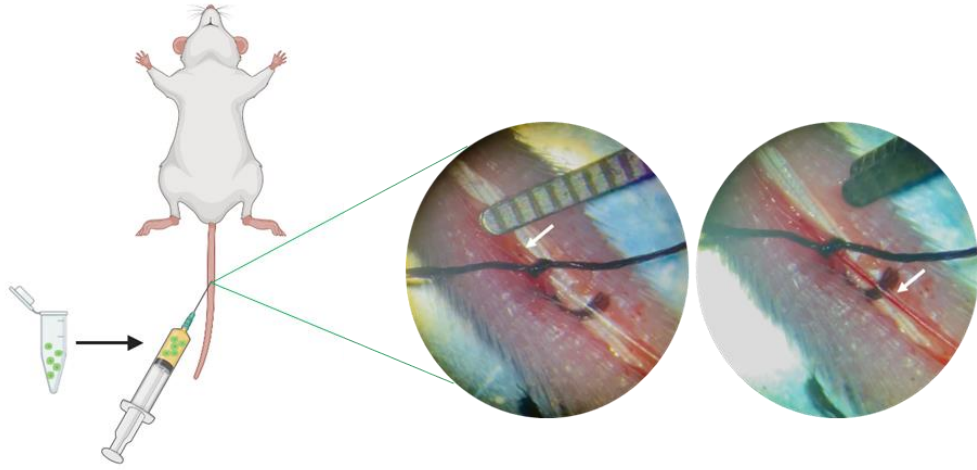
üzerine yerleştirilmiş, kommon karotid artere damar makası ile kesik atılmış ve 7-0 kalınlığındaki monofilament (#701934PK5Re, Docol, ABD) kesikten internal karotid artere doğru yaklaşık 9 mm içeriye itilmiştir (Şekil 5.4.1). Orta serebral arterin doğru olarak tıkandığı Laser Doppler flowmetre (Perimed, İsveç) cihazı yardımı ile beyin kan akımındaki düşüştan kontrol edilmiştir. Oklüzyondan 30 dakika sonra ip geri çekilmiş, reperfüzyonun takip edilmesi amacıyla kan akımı 20 dakika daha takip edilmiştir.



**Şekil 5.4.1** Orta Serebral Arter Oklüzyonu Yöntemi (OSAO)

## 5.5. GFP (+) Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Enjeksiyonu

Öncelikle hamile dişi BALB/C farelerin kanından fetal mikrokimerik hücreler akış sitometrisi yöntemiyle ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan hücrelerin verilebilmesi için erkek BALB/C farelerin kuyruk arterine iskemi sonrası kanülasyon yapılmıştır (Şekil 5.5.1). Daha önce akış sitometrisi yöntemi ile ayrıştırılan fetal kökenli GFP (+) hücreler 30 dakikalık iskemi sonrasında reperfüzyon başlangıcında kuyruk arterinden 100 µL HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, #H6642, Sigma Aldrich, ABD) içerisinde verilmiştir.



**Şekil 5.5.1** Fare kuyruk arteri kanülasyonu ile fetal mikrokimerik hücrelerin hasarlı hayvana verilmesi

## **5.6. Fetal Mikrokimerik Hücrelerin İskemik Farelerde Tespiti**

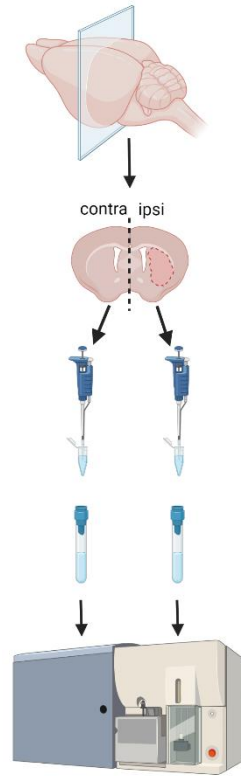
Orta serebral arter oklüzyonu yöntemi ile 30 dakika iskemi uygulanan erkek BALB/C hayvanlara reperfüzyon başlangıcında kuyruk arterine kanülasyonla fetal kökenli GFP (+) hücreler verilmiştir. Hayvanlar iskemiden 3 gün sonra sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen hayvanların beyinlerinde ve kanlarında GFP (+) hücreler tespit edilmeye çalışılmıştır.

### **5.6.1. Akış sitometrisi yöntemiyle beyinde GFP (+) hücrelerin tespiti**

Sakrifiye edilen hayvanların beyinleri izole edilmiştir. Beyinler izole edilir edilmez fare beyin matrisine yerleştirilerek OSAO'dan etkilendiği bilinen sitriatümları jilet yardımıyla kalanından ayrılmış ve papain (#P4760, Sigma Aldrich, ABD) içeren enzimatik solüsyona alınmıştır. Doksan dakika boyunca 33 °C'de enzimatik parçalanmaya bırakılan beyinler sonrasında dengeli tuz solüsyonuyla (Hank's Balanced Salt Solution, #H6648, Sigma Aldrich, ABD) yıkanmış, enzim solüsyonu ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hybernat A besi yeri içerisinde 1 mg/ml BSA (Bovin Serum Albumin, #A7906, Sigma), %0,2 DNase-1 (#A4193, Biomatik) eklenerek tritürasyon solüsyonu hazırlanmıştır. Tritürasyon solüsyonu ile beyin dokusu mekanik olarak tek hücreli hale getirilmeye çalışılmıştır. Mekanik olarak pipetaj ile tritürasyon solüsyonu içerisinde tek hücreli hale getirilen beyin dokusu 5



mg/ml BSA içeren Hybernate A besi yerine alınmıştır. Hücreler 500xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve %2 FBS içeren fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çözülerek yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi sonrasında hücreler 40 µm'lik süzgeçten (#352340, Cell Strainer, Falcon, ABD) geçirilmiştir. Hücreler karanlıkta, oda sıcaklığında %2 paraformaldehit (PFA) içerisinde 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılarak fikse edilmiştir. Hücreler, PFA'yı uzaklaştırmak için %2 FBS içeren fosfat tamponlu salin çözeltisi ile yıkanmıştır. Hücreler %0,3 Triton-X içeren fosfat tamponlu salin çözeltisi ile pörmeabilize edilmiş ve AF488 konjuge GFP antikoru (1:250, #338008, Biolegend) ile boyanmıştır. Çekirdekli hücrelerin belirlenebilmesi için hücreler 1:1000 DAPI (1mg/ml, #D9542, Sigma Aldrich, ABD) ile muamele edilmiştir. GFP (+) hücreler Akış Sitometri Cihazı (BD, Influx Cell Sorter, ABD) ile analiz edilmiştir.



**Şekil 5.6.1.1** Akış sitometrisi yöntemiyle fetal mikrokimerik hücrelerin hasarlı hayvanın beyin dokusunda tespiti

### 5.6.2. Akış sitometrisi yöntemiyle kanda GFP (+) hücrelerin tespiti

Sakrifiye edilen hayvanların kanları ayrı ayrı 2 ml santrifüj tüpü içerisine toplanmıştır. Hiç vakit kaybetmeden toplanan kanlar deneye başlamadan önce çift distile su ile seyreltilmiş lizis solüsyonu (10X BD Red Blood Cell Lysis Buffer, #555899, BDbioscience, ABD) bulunan flakon tüplere aktarılmıştır. Kan örnekleri lizis solüsyonu içerisine aktarıldıktan sonra örneklerin bulunduğu tüpler ters-yüz edilerek karıştırılmış ve 15 dakika boyunca karanlıkta, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnekler 200xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar örneklerin pelletlerine zarar verilmeden uzaklaştırılmıştır. Pelletler %2 FBS içeren fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çözülerek yıkama işlemi yapılmıştır. Sonrasında örnekler 200xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek yıkama işlemi tamamlanmıştır. Yıkama işlemi iki kere gerçekleştirilmiştir. Bu işlem bitiminde örnekler 500 µl %2 FBS içeren fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çözülmüştür. Kanda bulunan GFP (+) hücrelerin tespiti Akış Sitometri Cihazı (BD, Influx Cell Sorter, ABD) ile yapılmıştır.

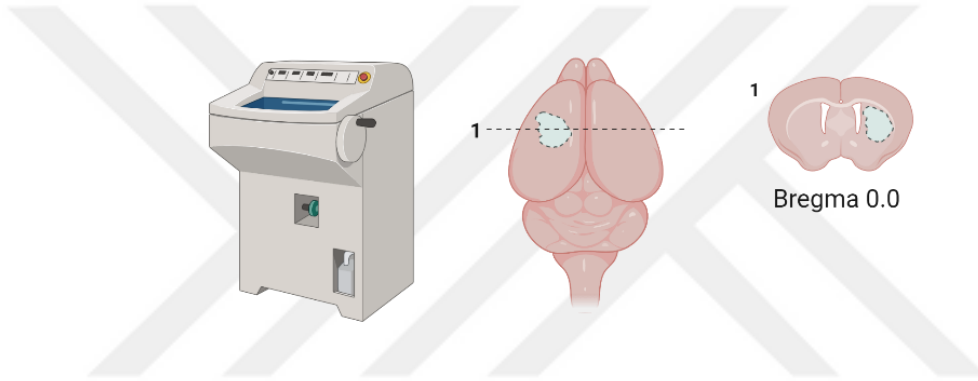


Şekil 5.6.2.1 Hasarlı hayvanların kanında fetal mikrokimerik hücrelerin tespiti

### 5.6.3. Beyin kesitlerinde GFP (+) hücrelerin tespiti

#### 5.6.3.1. Örneklerin toplanması

İzole edilen beyinler kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Beyinler kuru buzda dondurulduktan sonra doku sabitleme mediumu (Tissue Freezing Medium, #14020108926, Leica, Almanya) ile kryostat cihazının (CM1950, Leica, Almanya) aparatına sabitlenmiştir. Sonrasında beyinlerden 20 µm'lik koronal seri kesitler pozitif yüklü camlara (Isotherm) alınmıştır. Kesitler boyama yapılına kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 5.6.3.1.1 Kryostat cihazı ile hasarlı hayvanın beyininden alınan kesitler

#### 5.6.3.2. GFP (+) hücrelerin tespiti

Kesitler boyamaya başlamadan önce -80 °C'den çıkartılmış ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kesitler şale yatağına alınmış ve 10 dakika boyunca %4'lük PFA solüsyonu içerisinde fikse edilmiştir. Kesitler PFA'dan kurtulmak için 3 kere fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası kesitlerin etrafı hidrofobik bir kalem (PAP pen for immunostaining, Z672548-1EA, 2mm, Merck) ile çizilmiştir. Beyin kesitleri üzerine blok solüsyonu (antibody diluent, #003118, ThermoFisher, ABD) eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında konjuge GFP primer antikoru (Alexa Fluor® 488 Conjugate anti-GFP Antibody, #338008, Biolegend, ABD) blok solüsyonu içerisinde 1:200 seyreltilerek hazırlanmış ve beyin kesitleri üzerine eklenmiştir. Kesitler çalkalayıcı üzerinde 4

°C’de gece boyunca (16-18 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kesitler şale yatağına alınmış ve 3 kere fosfat tamponlu salin çözeltisi ile yıkanmıştır. GFP ile boyanan hücrelerin çekirdeklerinin görüntülenebilmesi için 4',6-diamidine-2'-fenilindol dihidroklorit (DAPI) içeren ve floresan boyamaya uygun olan kapatma solüsyonu (F6057, Fluoroshield with DAPI, Sigma Aldrich, ABD) damlatılarak lamelle kapatılmıştır. Boyama sonrası kesitler konfokal mikroskobu (LSM800, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir.

### **5.7. Kısa Dönem Ödem Oluşumu ve Uzun Dönem Post-iskemik Hemisfer, Korpus Kallozum ve Striatum Alanının Değerlendirilmesi**

İskemi sonrasında gruplar arası post-iskemik ipsilateral hemisfer alanlarının değerlendirilebilmesi için Cresyl Violet boyaması yapılmıştır. Otuz dakika uygulanan orta serebral arter oklüzyonu ile iskemiye maruz bırakılmış erkek BALB/C hayvanlara reperfüzyon başlangıcında kuyruk arterinden kanülasyon aracılığıyla fetal kökenli GFP (+) hücreler verilmiştir. Sonrasında hayvanlar 3 gün sonra sakrifiye edilmiş ve izole edilen beyinleri kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Doku sabitleme mediumu (Tissue Freezing Medium, #14020108926, Leica) ile kryostat cihazının (#CM1950, Leica, Almanya) aparatına sabitlenen beyinlerden 20 µm’lik koronal kesitler pozitif yüklü camlara (Isotherm) alınmıştır. Kesitler boyama yapılana kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Her hayvan için seçilen, Şekil 5.6.3.1.1’de 1 numara ile belirtilen bölgeye ait kesitler -80 °C’den çıkarılmış ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kesitler kuruduktan sonra şale yatağına alınmış ve %4’lük PFA solüsyonunda 7 dakika inkübasyona bırakılarak fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında kesitler fosfat tamponlu salin çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkanan kesitler oda sıcaklığında, 2 dakika bench üzerinde ve 13 dakika çalkalayıcı üzerinde olmak üzere toplam 15 dakika boyunca Cresyl Violet (#C5042-106, Sigma Aldrich, ABD) boyasında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kesitler sırasıyla her birinde 5’er saniye durmak üzere %70’lik, %90’lık, %95’lik ve %100’lük konsantrasyonlardaki etanol (#24102, Sigma Aldrich, ABD) serisinden geçirilmiştir. Son olarak kesitler en az 3 dk ksilende (#108684, Merck, ABD) bekletilmiş ve kesitlerin üzerine entellan (M1289, Sigma Aldrich, ABD) damlatılarak lamel ile

kapatılmıştır. Entellan yeterince kuruduktan sonra kesitler 1200 dpi çözünürlüğünde taratılmıştır. Taratılan kesitlerden elde edilen görüntülerde hemisfer ve striatum alanları ImageJ (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIH, ABD) programı kullanılarak ölçülmüştür.

### **5.8. Kısa Dönem ve Uzun Dönem Nöronal Sağkalımın Belirlenmesi**

Nöronal sağkalımın değerlendirilebilmesi için iskemi sonrasında izole edilen beyinlerin Bregma 0.0 mm striatum seviyesinden alınan 20 µm'lik koronal kesitlere NeuN boyaması yapılmıştır. Bunun için kesitler -80 °C'den çıkartılmış ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında kesitler %4 PFA solüsyonu ile fikse edilmiştir. PFA solüsyonunu uzaklaştırmak için kesitler fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Bloklama işlemi öncesinde kesitlerin etrafı hidrofobik bir kalem (PAP pen for immunostaining, Z672548-1EA, 2mm, Merck, ABD) ile çevrelenmiştir. Kesitlere blok solüsyonu (antibody diluent, #003118, ThermoFisher, ABD) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama işlemi uygulanmıştır. Bloklama işlemi bittikten sonra antikor solüsyonu blok solüsyonu içerisinde hazırlanmıştır. Antikor solüsyonunu hazırlamak için 1:100 oranında konjuge NeuN antikor (NeuN (D4G4O) XP® Rabbit mAb Alexa Fluor® 647 Conjugate, #62994, CST, ABD) blok solüsyonu içerisinde seyreltilmiştir. Sonrasında antikor solüsyonu beyin kesitlerinin üzerini kapatacak şekilde kesitlerin üzerine eklenmiştir. Kesitler çalkalayıcı üzerinde 4 °C'de gece boyunca (16-18 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kesitler fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Hücre çekirdeklerinin görüntülenebilmesi için kesitler DAPI içeren kapatma solüsyonu (F6057, Fluoroshield with DAPI, Sigma Aldrich, ABD) damlatılarak lamelle kapatılmıştır.

Boyama sonrasında görüntüleme işlemi konfokal mikroskopu (LSM800, Zeiss, Almanya) ile yapılmıştır. Boyanan kesitlerin kontralateral ve ipsilateral striatum bölgesindeki NeuN pozitif hücreler rastgele (region of interest: ROI) belirlenen 9 bölgeden sayılmış ve değerlendirilmiştir.

## 5.9. F4/80 Boyaması ile Kısa Dönemde Makrofajların Değerlendirilmesi

Hasar bölgesine geçen makrofajların değerlendirilebilmesi için iskemi sonrasında izole edilen beyinlerin Bregma 0.0 mm striatum seviyesinden alınan 20 µm'lik koronal kesitler F4/80 makrofaj antikoru kullanılarak immünflorosan olarak boyanmıştır. Bunun için kesitler -80 °C'den çıkartılmış ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında kesitler %4 PFA solüsyonu ile fikse edilmiştir. PFA solüsyonunu uzaklaştırmak için kesitler fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Bloklama işlemi öncesinde kesitlerin etrafı hidrofobik bir kalem (PAP pen for immunostaining, Z672548-1EA, 2mm, Merck, ABD) ile çevrelenmiştir. Kesitlere blok solüsyonu (antibody diluent, #003118, ThermoFisher, ABD) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama işlemi uygulanmıştır. Bloklama işlemi bittikten sonra antikor solüsyonu blok solüsyonu içerisinde hazırlanmıştır. Antikor solüsyonunu hazırlamak için 1:100 oranında primer F4/80 antikoru (#019-19741, Rabbit, Fujifilm, Japonya) blok solüsyonu içerisinde seyreltilmiştir. Sonrasında antikor solüsyonu beyin kesitlerinin üzerini kapatacak şekilde kesitlerin üzerine eklenmiştir. Kesitler çalkalayıcı üzerinde 4 °C'de gece boyunca (16-18 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kesitler fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Sonrasında kesitler uygun sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kesitler tekrar fosfat tamponlu salin çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Hücre çekirdeklerinin görüntülenebilmesi için kesitler DAPI içeren kapatma solüsyonu (F6057, Fluoroshield with DAPI, Sigma Aldrich, ABD) damlatılarak lamelle kapatılmıştır.

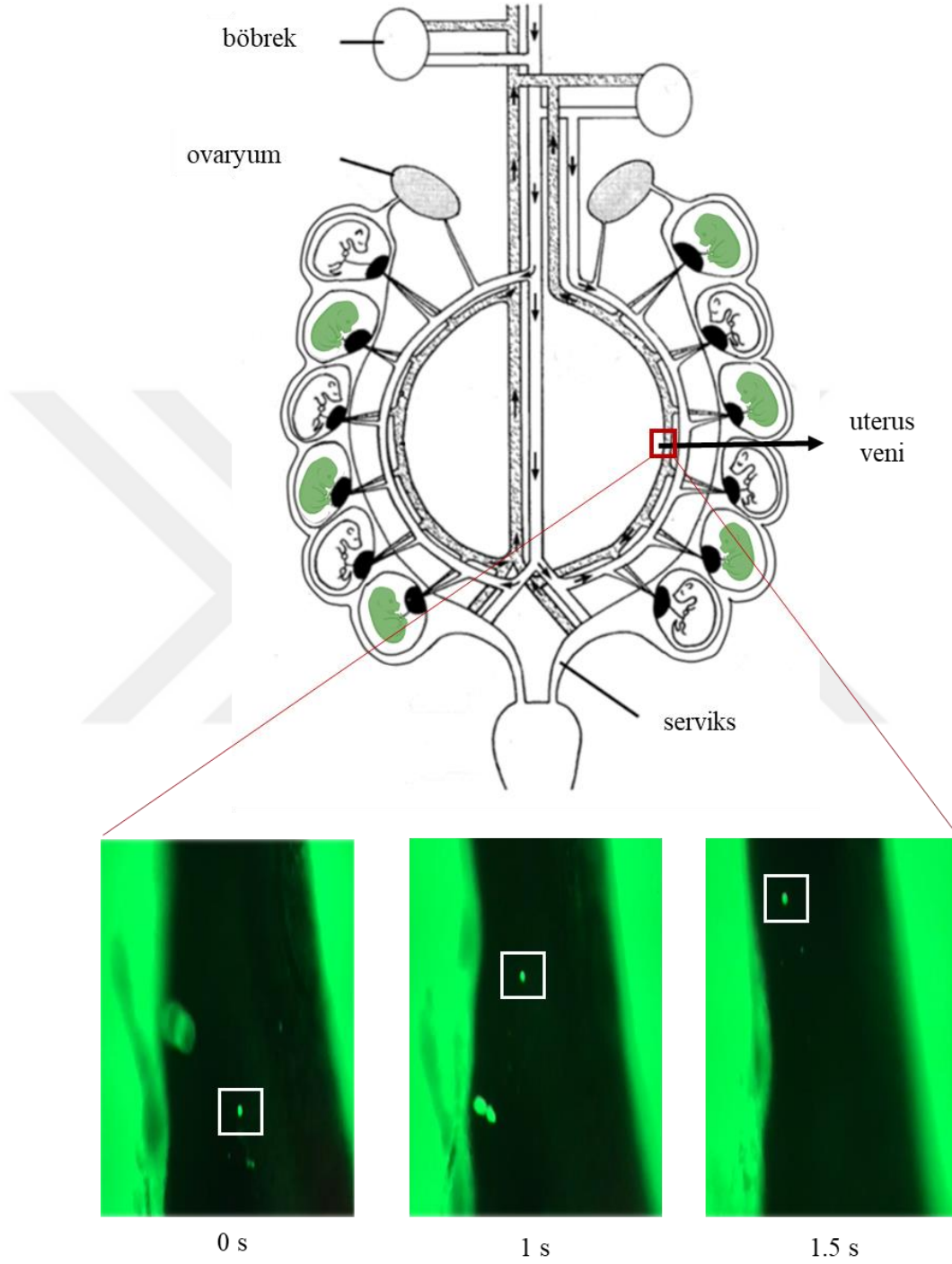
Boyama sonrasında görüntüleme işlemi konfokal mikroskopu (LSM800, Zeiss, Almanya) ile yapılmıştır. Boyanan kesitlerin kontralateral ve ipsilateral striatum bölgesindeki F4/80 pozitif hücreler rastgele (region of interest: ROI) belirlenen 9 bölgeden sayılmış ve değerlendirilmiştir.

### 5.10. İskemik Beyin Felci Sonrası Hücre Tedavisi Uygulanan Hayvanlarda Uzun Dönem Fetal Hücre Dağılımının Değerlendirilmesi

Hücre geçişinin takip edilebilmesi için doğal tür dışı fareler ile transgenik olarak yeşil floresan protein (GFP) ve ateş böceği lüsiferaz enzimi eksprese eden Tg(CAG-luc,-GFP)L2G85 transgenik fareler (#025854, The Jackson Laboratory, ABD) çiftleştirilmiştir. Sonrasında hamile dişilere yapılan analiz sonucunda yavruların bir bölümünün transgenik özellik taşıdığı görülmüştür. Akış Sitometrisi yöntemiyle fetal kökenli hücreler hamile dişilerin kanından izole edilmiştir. İzole edilen hücreler 30 dakika boyunca orta serebral arter oklüzyonu indüklenmiş doğal tür erkek BALB/C farelere kuyruk arterinden verilmiştir. Fetal mikrokimerik hücre tedavisi uygulanan hayvanlar, tedaviden 1 gün sonra, 3 gün sonra, 10 gün sonra ve 30 gün sonra *in vivo* üç boyutlu biyoluminesans tomografi (BLT) görüntüleme sistemi kullanılarak anestezi altında olarak görüntülenmiş ve fetal mikrokimerik hücrelerin vücuttaki dağılımı belirlenmiştir. Bu görüntüleme için hayvanlara 100 µl (150 mg/kg) D-lüsiferin substratı (D-Luciferin Potassium Salt, #1-360222-200, Regis Technology Inc., ABD) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan on dakika sonra görüntülemesi yapılacak hayvan izofloran ile anesteziye alınmış ve *in vivo* üç boyutlu biyoluminesans tomografi görüntüleme cihazına (MILabs Optical Imaging, Hollanda) yerleştirilmiştir. Lusiferaz enzimi tarafından parçalanmış D-lüsiferin substratı sonucu ortaya çıkan biyoluminesans toplam sinyal yoğunluğu bazında ölçülmüştür. Hayvanların baş, beyin ve gövde bölgeleri manuel olarak belirlenmiş, toplam sinyal yoğunluk grafiği ölçüm yapılan zamana bağlı olarak çizilmiştir.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Uterus Veninde Tespit Edilen GFP (+) Fetal Mikrokimerik Hücreler



Şekil 6.1.1 Uterus veninde (kırmızı kare içerisinde) tespit edilen GFP (+) fetal mikrokimerik hücreler

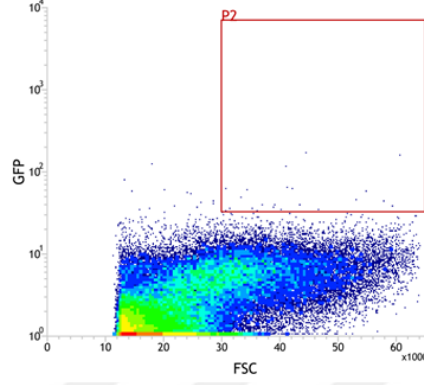


Doğal tür BALB/C dişi fareler, transgenik olarak yeşil floresan protein ifade eden erkek fareler ile çiftleştirilmiştir. Çiftleşme sonrasında hamile olan doğal tür BALB/C dişi farelerin yavrularından bir kısmı transgenik olarak yeşil floresan protein ifade etmektedir. Böylelikle yavruların hücreleri floresan mikroskobu altında ayırt edilebilmektedir.

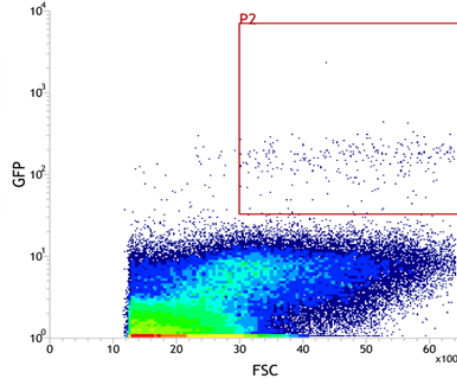
Hayvanlar iftleştirildikten 14 gün sonra fetal mikrokimerik hücreler anne kanından izole edilmiştir. Fetal hücreler izole edilmeden önce hamile fareler floresan mikroskop (Axiozoom V16, Zeiss, Almanya) altında incelenmiştir. Hamile farelerin batını anestezi altında açılmış, fareler mikroskoba sabitlenmiş ve yavrudan anneye kanın taşındığı uterus veni görüntülenmiştir. *şekil 6.1.1*'de kan akışı sırasında uterus veninden geçen GFP (+) hücreler gösterilmektedir.

## 6.2. Maternal Kanda Akış Sitometrisi Yöntemiyle Tespit Edilen Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Analizi

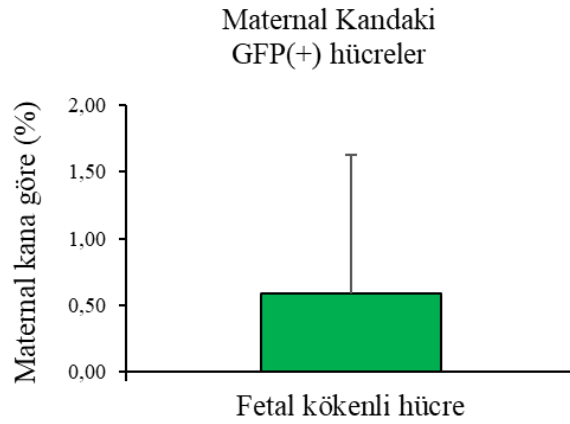
### A Doğal-tür kan analizi, nokta grafiği görseli



### B GFP (+) erkek ile çiftleşmiş doğal-tür kan analizi Nokta grafiği görseli



### C GFP (+) erkek ile çiftleşmiş doğal-tür kan analizi



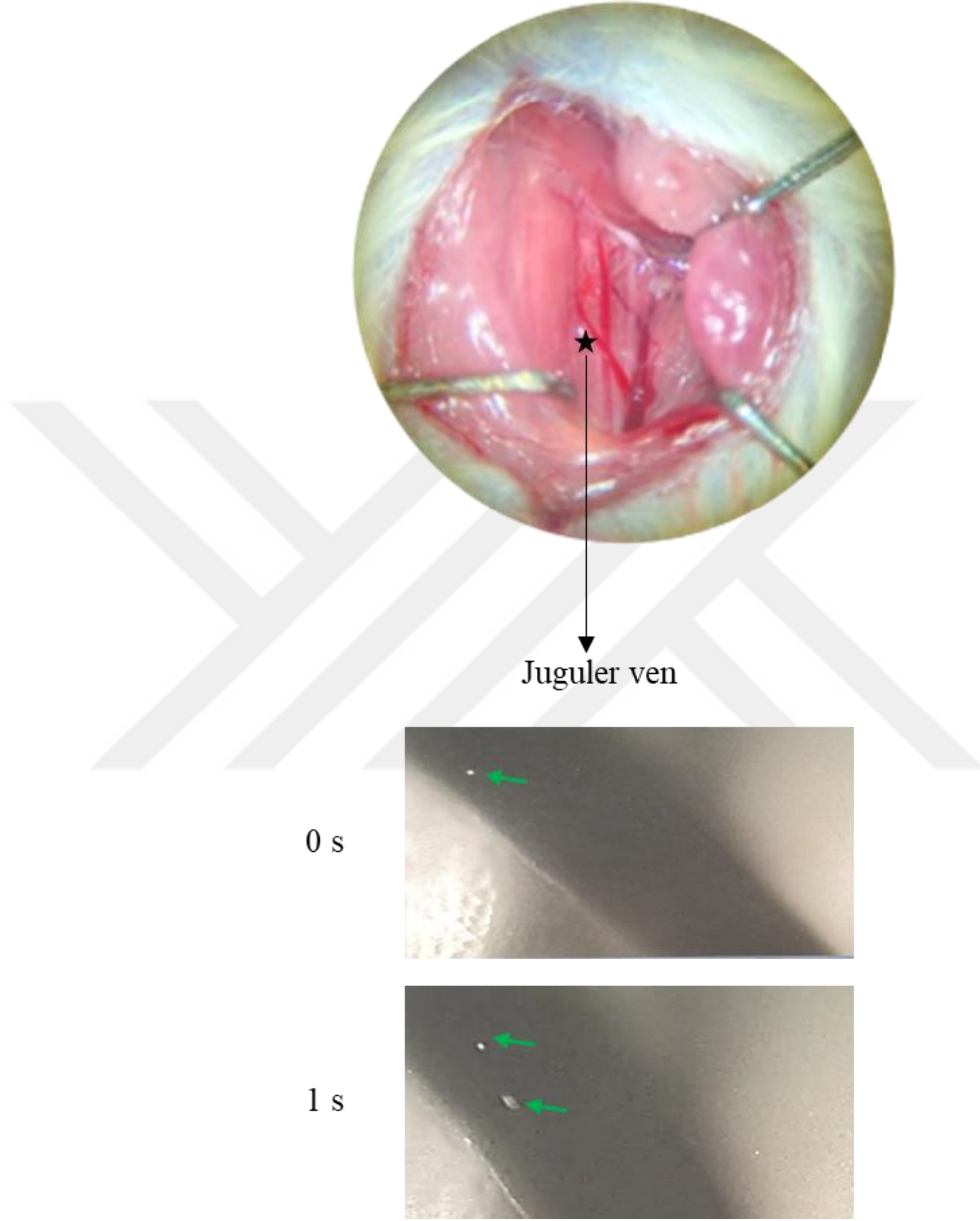
Şekil 6.2.1 Maternal kandan izole edilen hücreler Akış Sitometri Cihazı ile değerlendirilmesi. A) Doğal tür farelerin kanından yapılan, B) GFP (+) transgenik

erkeklerle çiftleşmiş doğal tür hamile dişinin kanından yapılan Akış Sitometrisi nokta grafiği görselini temsil etmektedir. C) GFP (+) transgenik erkeklerle çiftleşmiş doğal tür hamile dişinin kanında bulunan GFP (+) hücrelerin yüzdesini gösteren grafikdir.

Transgenik olarak GFP ifade eden transgenik erkeklerle çiftleşmiş ve hamile olan dişi farelerin kanı çiftleşmeden 14 gün sonra toplanmış ve Akış Sitometrisi yöntemiyle analiz edilmiştir. Yapılan analizde hamile dişilerin kanından (maternal kandan) izole edilen çekirdekli hücrelerin %0,5'nin GFP (+) fetal mikrokimerik hücreler olduğu görülmüştür (Şekil 6.2.1; C).



### 6.3. İskemik Farede Fetal Mikrokimerik Hücre Tedavisi Sonrası Juguler Venin Görüntülenmesi



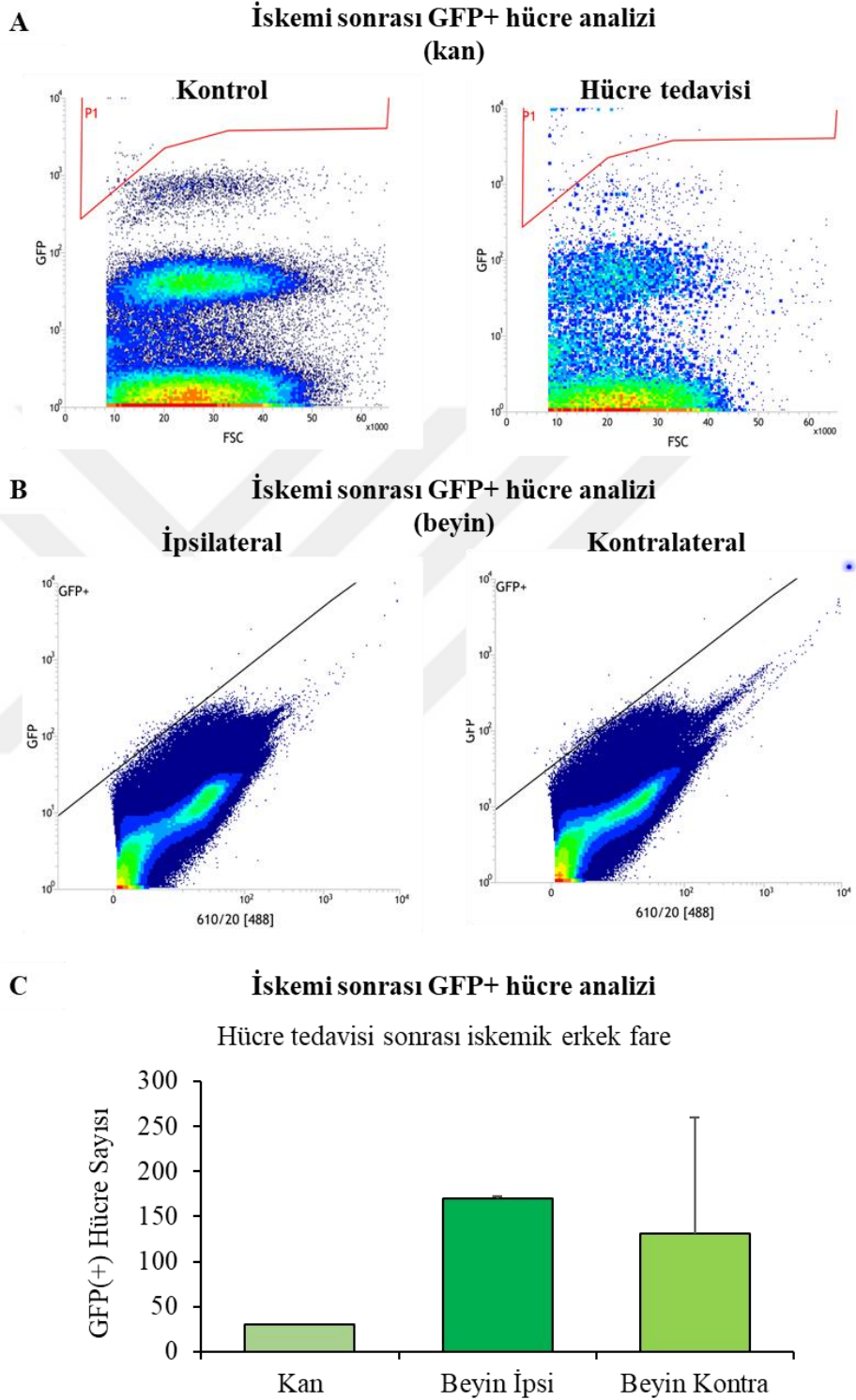
**Şekil 6.3.1** Hücre tedavisinden 72 saat sonra fetal hücrelerin Juguler vende tespiti.

Transgenik olarak GFP ifade eden transgenik erkeklerle çiftleşmiş ve hamile olan dişi farelerin kanı çiftleşmeden 14 gün sonra toplanmış, GFP (+) hücreler Akış Sitometrisi yönteminin ayırma özelliği kullanılarak diğer hücrelerden ayrılmıştır.

Ayrılan GFP (+) fetal mikrokimerik hücreler, 30 dakika orta serebral arter tıkanması metoduyla serebral iskemi indüklenen doğal tür BALB/C erkek farelere reperfüzyon sırasında tedavi amaçlı kanülasyon ile verilmiştir. İskemi indüklendikten 72 saat sonra gaz anestezisi altında farelerin Juguler veni izole edilmiş ve floresan mikroskop (Axiozoom V16, Zeiss, Almanya) kullanılarak incelenmiştir. Yapılan incelemede iskemik erkek farelerin Juguler veninde Şekil 6.3.1’de yeşil ok ile gösterilen GFP (+) fetal mikrokimerik hücreler tespit edilmiştir.



#### 6.4. İskemik Farede Akış Sitometrisi Yöntemi ile Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Tespiti

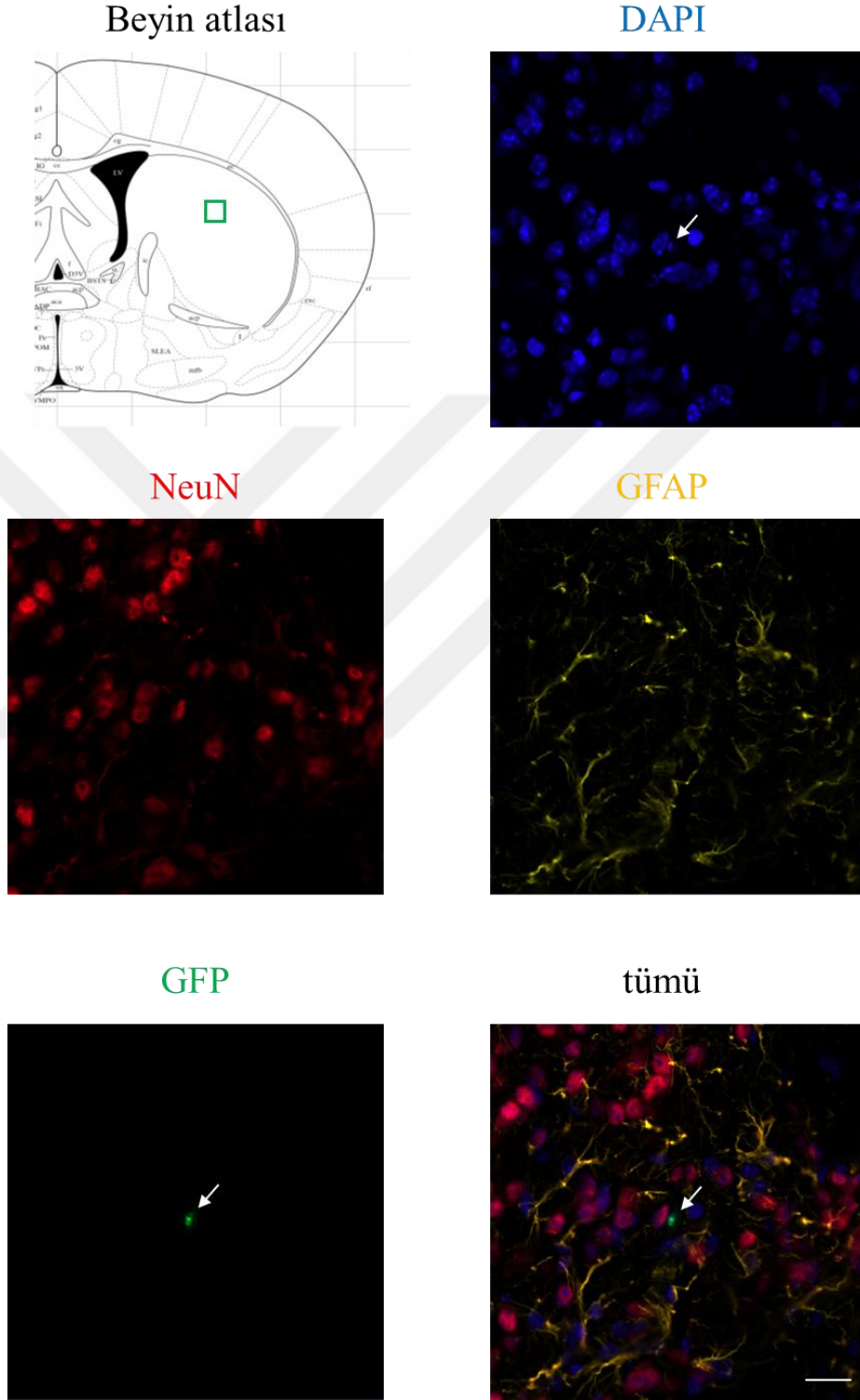


**Şekil 6.4.1** İskemik erkek farelerin kanından ve beyninden izole edilen hücrelerin Akış Sitometri Cihazı ile değerlendirilmesi. A) Hücre tedavisi uygulanan

iskemik erkek farelerin kanından yapılan, B) Hücre tedavisi uygulanan iskemik erkek farelerin beyin dokusundan yapılan Akış Sitometrisi nokta grafiği görselini temsil etmektedir. C) Hücre tedavisi sonrası iskemik erkek farelerin kan, ipsilateral striatum ve kontralateral striatumunda tespit edilen GFP (+) hücrelerin grafiğidir.

Transgenik olarak GFP ifade eden transgenik erkekle çiftleşmiş, hamile dişi farelerin kanından izole edilen GFP (+) fetal mikrokimerik hücreler iskemik erkek farelere tedavi amaçlı kuyruk arteri kanülasyon ile verilmiştir. Otuz dakika orta serabral arter tıkanması ile iskemi indüklenen, reperfüzyon sırasında fetal mikrokimerik hücre tedavisi uygulanan fareler iskemi indüklendikten 72 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Hayvanların kan, kontralateral ve ipsilateral striatum beyin dokuları toplanmış ve Akış Sitometrisi yöntemi kullanılarak GFP (+) hücreler analiz edilmiştir. İskemik erkek farelerde yapılan analizde hasardan 72 saat sonra hayvanların beyinde kanlarına göre daha çok GFP (+) hücreye rastlandığı görülmüştür. İpsilateral (hasarlı) striatum ve kontralateral (hasarsız) striatum bölgeleri karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasarlı striatum bölgesinde hasarsız striatum bölgesine nazaran daha fazla GFP (+) hücre olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.4.1; C).

## 6.5. İskemik Striatumda Kısa Dönemde Tespit Edilen Fetal Mikrokimerik Hücre Görseli



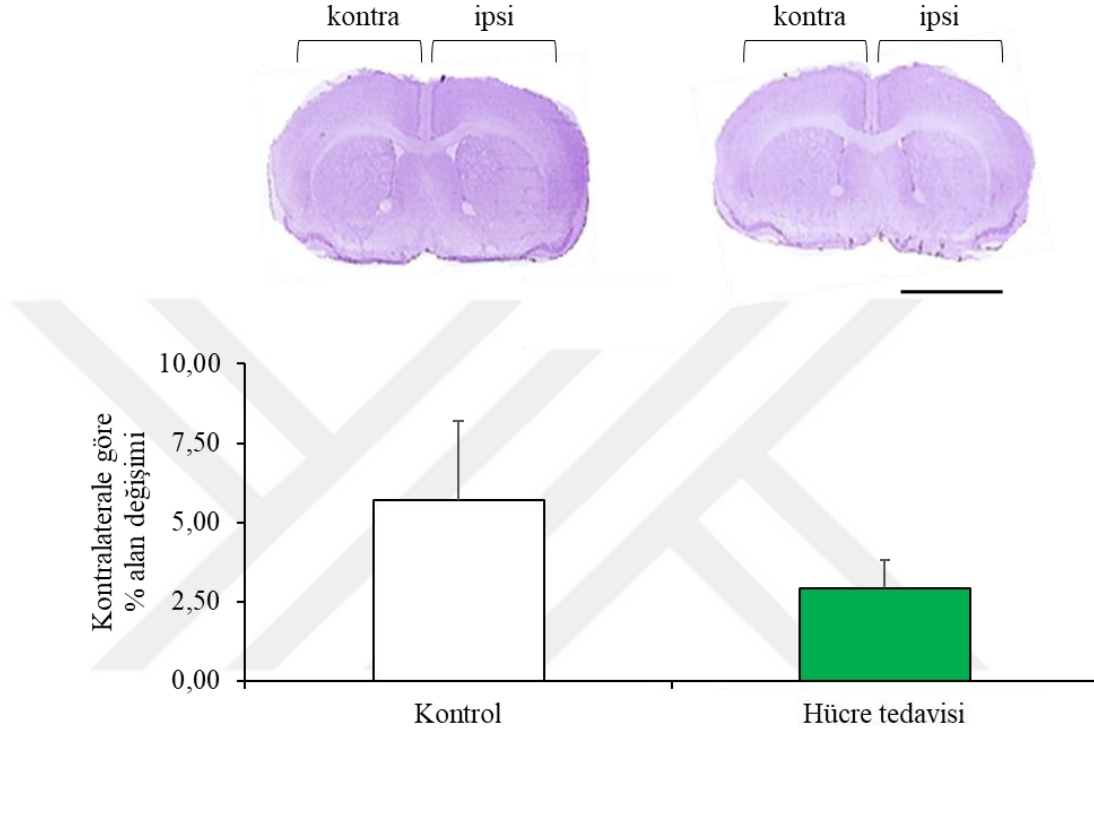
Şekil 6.5.1 İskemik striatumda hücre tedavisinden 72 saat sonra GFP (+) fetal mikrokimerik hücrelerin değerlendirilmesi.



Hücre tedavisi uygulanan iskemik erkek fareler iskemi indükledikten 72 saat sonra sakrifiye edilmiş, hayvanların beyinleri izole edilmiştir. İzole edilen beyinlerin Bregma 0.0 bölgesinden kesitler alınmıştır. Hücre tedavisi sonrası GFP (+) hücrelerin iskemiden 72 saat sonra, kısa dönemde iskemik striatuma geçişini, burada nöronal ya da glial özellik gösterip göstermediklerinin tespiti için alınan kesitlere immünofloresan GFP, NeuN ve GFAP üçlü boyaması yapılmıştır. Boyamalar konfokal mikroskobu (LSM800, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. *Şekil 6.5.1*'de mavi ile belirtilen DAPI hücrelerin çekirdeklerini, kırmızı ile belirtilen NeuN nöronal hücreleri, sarı ile belirtilen GFAP glial hücreleri, yeşil ile belirtilen GFP ise transgenik olarak yeşil floresan protein ifade eden hücreleri göstermektedir. Yapılan boyamalar sonucunda ipsilateral striatumda GFP (+) hücrelere rastlanmıştır. GFP (+) hücreler nöronal markör olan NeuN ya da glial markör GFAP ile çakışma göstermemiştir (*Şekil 6.5.1*; tümü). Bar 20µm'dir.

## 6.6. Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Kısa Dönemde İskemi Sonrası Ödem Oluşumuna Etkisi

### Ödem oluşumu

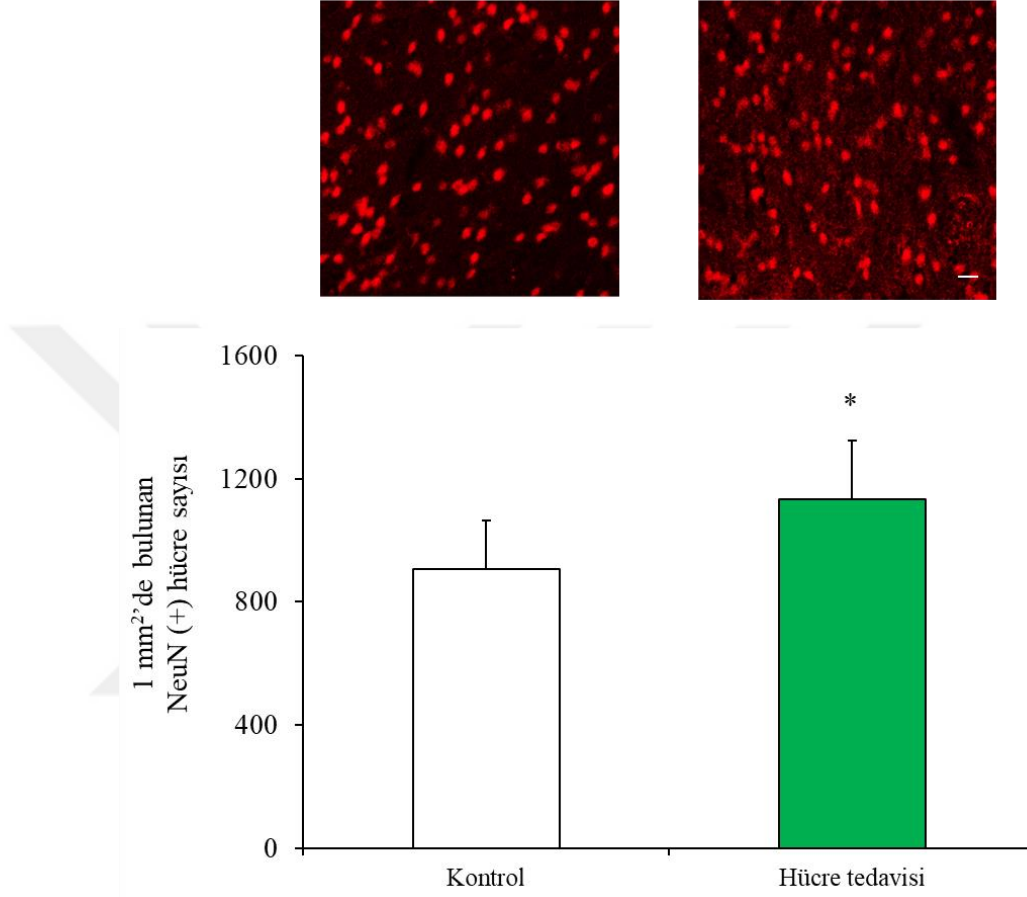


Şekil 6.6.1 Cresyl Violet boyaması ile ödemin değerlendirilmesi.

Hücre tedavisi sonrası iskemik farelerde kısa dönem ipsilateral ve kontralateral hemisfer alanlarının değişimini analiz edebilmek için *Cresyl Violet* boyaması yapılmıştır. Boyama yapıldıktan sonra hemisfer alanları Image J uygulaması ile ölçülmüş, kıyaslanmış ve kontralateral hemisfere göre ‘% alan değişimi’ hesaplanmıştır. Yapılan analiz sonrasında hücre tedavisi yapılan iskemik hayvanlar kontrol hayvanlarla karşılaştırılmış ve hücre tedavisi grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha az ödem görülmüştür (Şekil 6.6.1). Bar 2 mm’dir.

## 6.7. Fetal Mikrokimerik Hücre Tedavisinin Kısa Dönemde Nöronal Sağkalım Üzerine Etkisi

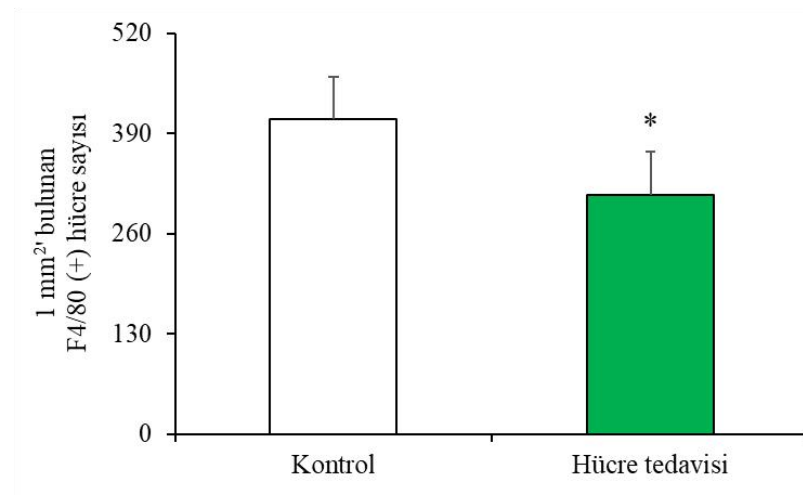
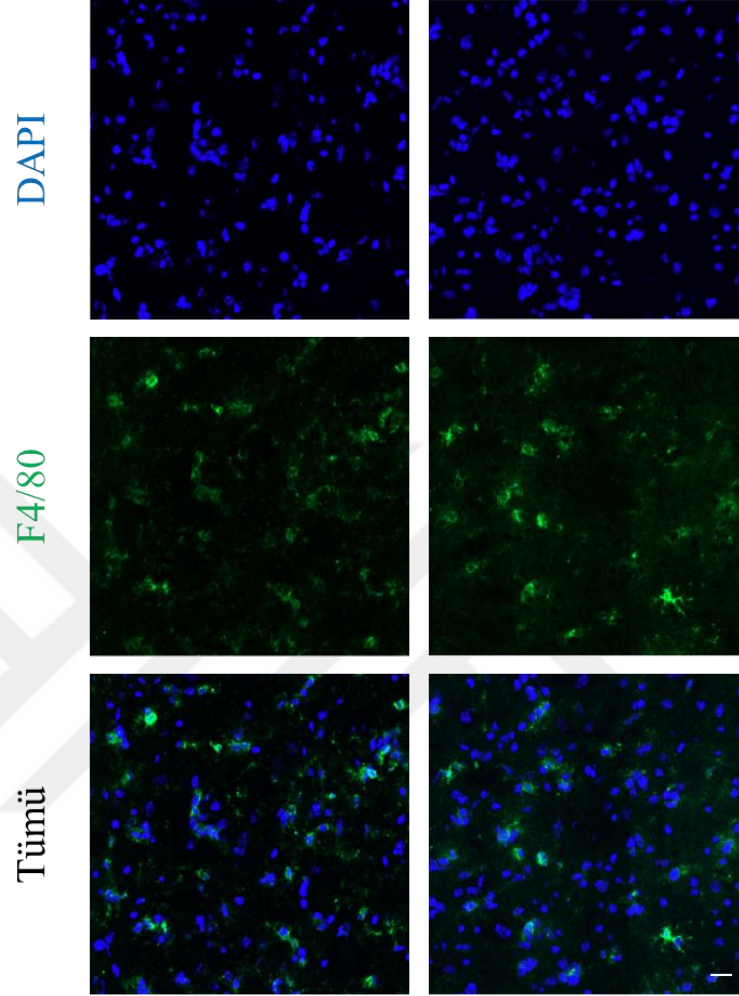
### Nöronal Sağkalım



Şekil 6.7.1 Kısa dönemde nöronal sağkalımın değerlendirilmesi.

Hücre tedavisinin kısa dönemde iskemik farelerde nöronal sağkalıma etkisini görmek için iskemiden etkilenen Bregma 0.0 bölgesinden kesitler alınmış, alınan kesitlere nöronal markör olan NeuN ile immünofloresan boyaması yapılmıştır. Boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM800, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiş, NeuN (+) hücreler sayılmış ve hasar sonrası nöronal sağkalım değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeye göre hücre tedavisi yapılan iskemik farelerde nöronal sağkalım kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 6.7.1; p=0,049). Bar 20µm'dir.

## 6.8. Kısa Dönemde Hücre Tedavisinin İskemik Striatumda Makrofajlar Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

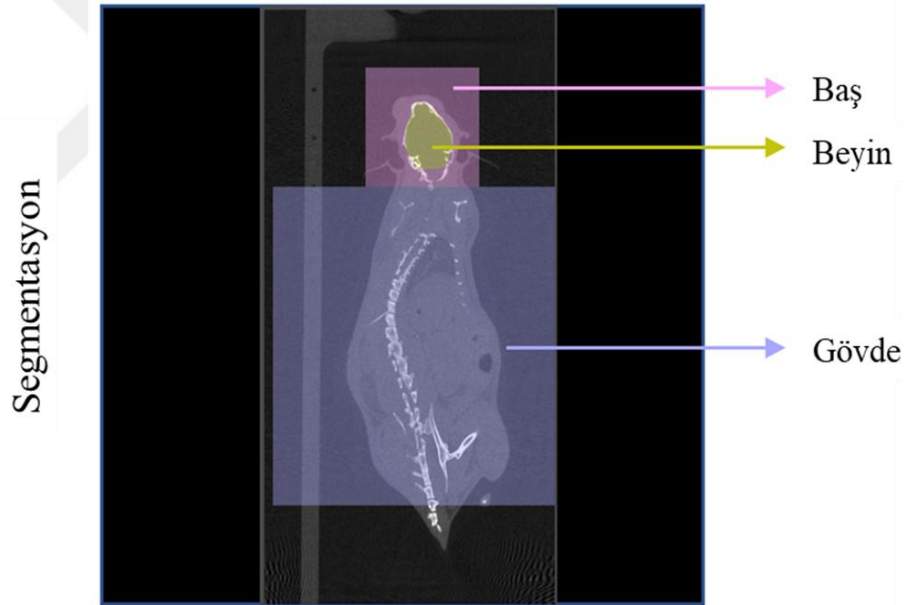


Şekil 6.8.1 Kısa dönemde hücre tedavisinin striatumda makrofajlar üzerine etkisinin değerlendirilmesi.

Hücre tedavisi sonrası kısa dönemde iskemik striatumda bulunan makrofajların değerlendirilmesi için makrofaj markörü olan F4/80 immüno Floresan boyaması yapılmıştır. Boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM800, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiş, F4/80 (+) hücreler sayılmış ve striatal makrofajlar değerlendirilmiştir. Yapılan analizlere göre hücre tedavisi uygulanan farelerin striatumunda bulunan F4/80 (+) hücre sayısı, kontrol grubunun striatumunda bulunanlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha azdır (Şekil 6.8.1;  $p=0,019$ ). Bar 20  $\mu\text{m}$ 'dir.

### 6.9. Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Vücuttaki Dağılımının Değerlendirilebilmesi İçin Vücut Alanlarının Belirlenmesi

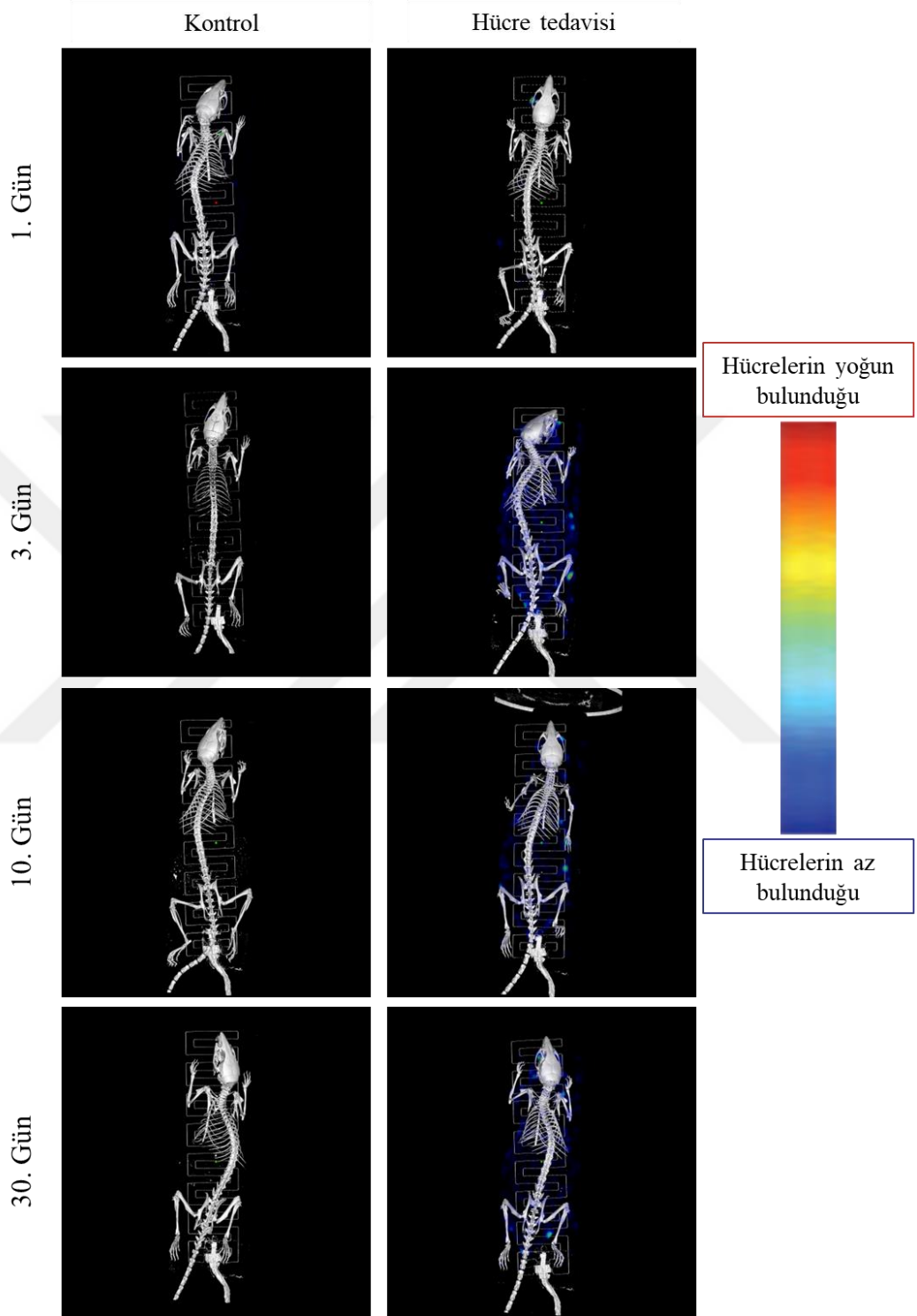
Fetal mikrokimerik hücrelerin belirli bir süre içerisinde vücuttaki dağılımının belirlenebilmesi ve karşılaştırılabilmesi için manuel segmentasyon yapılmıştır.



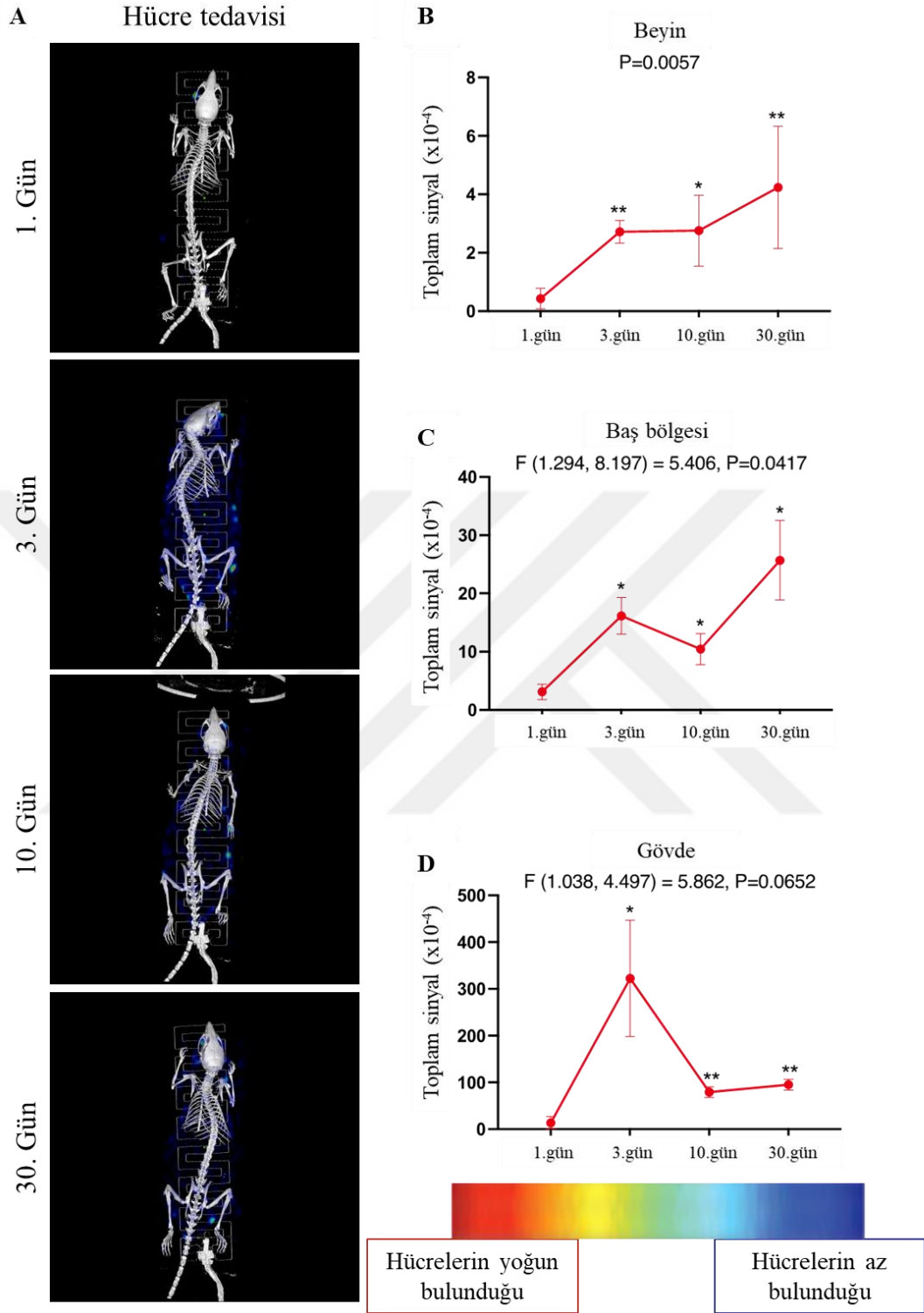
**Şekil 6.9.1** Biyoluminesans/ Bilgisayarlı Tomografi (BLT/CT) görüntülemesinde segmentasyon ile baş, beyin ve vücut bölgeleri belirlenmesi.

Pembe ile sınırlanmış alan baş, yeşil ile sınırlanmış alan beyin, mor renk ile sınırlanmış alan ise gövdeyi göstermektedir. Bu alanlardan yapılan ölçümler sonrası toplam sinyal yoğunluğu zamana bağlı grafikleştirilmiştir.

## 6.10. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Zamana Bağlı Dağılımının Belirlenmesi



Şekil 6.10.1 Uzun dönemde iskemi sonrası fetal mikrokimerik hücrelerin zamana bağlı dağılımını gösteren BLT/CT görüntüleri.

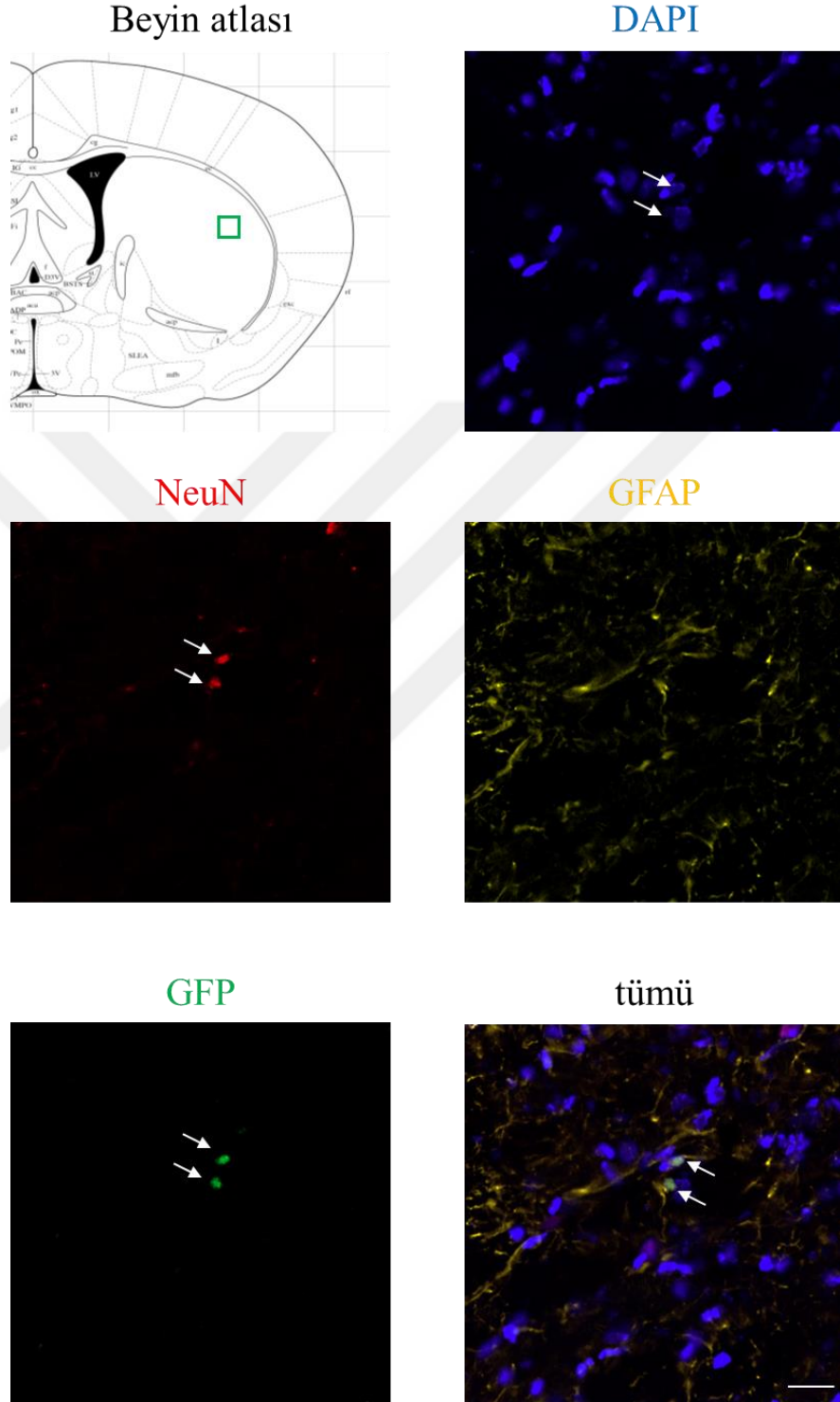


Şekil 6.10.2 Uzun dönemde iskemi sonrası fetal mikrokimerik hücrelerin zamana bağlı beyin, baş ve gövde bölgesinde değişimi.

İskemi sonrası fetal mikrokimerik hücre tedavisi uygulanan hayvanlar tedavi sonrası uzun dönemde hücrelerin vücuttaki dağılımını belirleyebilmek için *in vivo* üç boyutlu biyoluminesans tomografi (BLT) görüntüleme sistemi kullanılarak canlı olarak görüntülenmiştir. Bu görüntüleme hücre tedavisinden 1 gün, 3 gün, 10 gün ve 30 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Transgenik olarak lüsiferaz enzimi üreten fetal mikrokimerik hücrelerin varlığını görüntüleyebilmek için iskemik hayvanlara D-lüsiferin substratı görüntülemeden 10 dakika önce intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası iskemik hayvanlar anestezi altında *in vivo* üç boyutlu biyoluminesans tomografi görüntüleme cihazına yerleştirilmiş ve bu cihaz yardımıyla lüsiferaz enzimi tarafından parçalanmış D-lüsiferin substratı sonucu ortaya çıkan biyoluminesans toplam sinyal yoğunluğu bazında ölçülmüştür. Baş, beyin ve gövde bölgeleri manuel olarak belirlenmiş (Şekil 6.9.1), toplam sinyal yoğunluk grafiği ölçüm yapılan zamana bağlı olarak çizilmiştir (Şekil 6.10.2; B, C, D). Cihaz iskemik hayvanlarda fetal mikrokimerik hücrelerin bulunduğu bölgeleri Şekil 6.10.1 ve Şekil 6.10.2’de bulunan renk skalasındaki renklere göre işaretlemiştir. Fotoğraflarda Şekil 6.9.1’de belirlenen segmentasyon bölgesi içerisinde renk skalasındaki herhangi bir renkle işaretlenmiş bölgede lüsiferaz aktivitesi dolayısıyla da fetal mikrokimerik hücrelerin bulunduğu kabul edilmektedir. Kırmızı görünen bölgeler fetal mikrokimerik hücrelerin mavi görünen bölgelere göre daha çok sayıda olduğunu belirtmektedir. Şekil 6.10.1’de uzun dönemde iskemi sonrası fetal mikrokimerik hücrelerin zamana bağlı dağılımını gösteren *in vivo* üç boyutlu biyoluminesans tomografi görüntüleri ölçüm yapılan zamanlarda kontrol grubuyla karşılaştırılmış olarak gösterilmiştir. Belirli aralıklarla 30 gün boyunca izlenen fetal mikrokimerik hücrelerin hücre tedavisinden bir gün sonraya kıyasla beyin ve baş bölgesinde 30 gün sonra istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.10.2; B, C). Gövde bölgesinde ise fetal mikrokimerik hücre tedavisi sonrası üçüncü günde birinci gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 6.10.2; D).



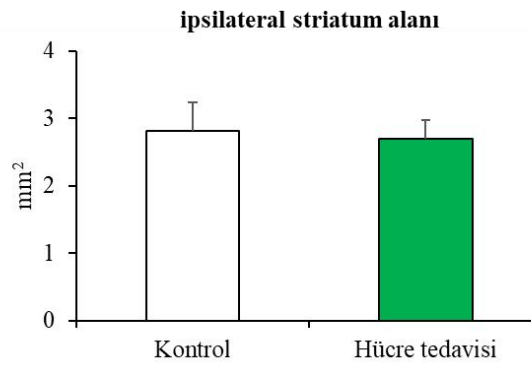
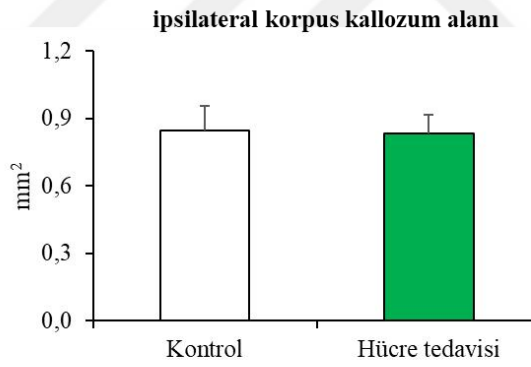
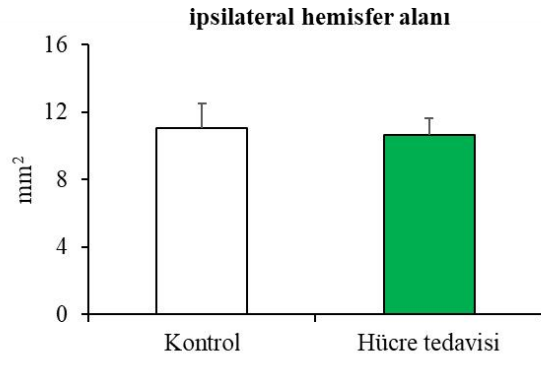
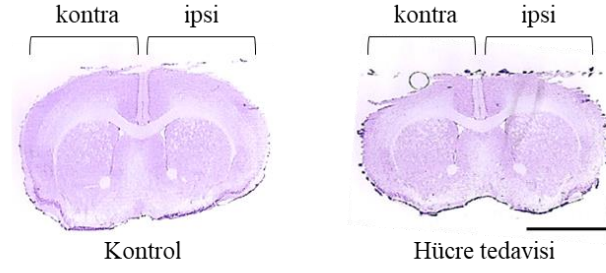
## 6.11. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Beyin Kesitlerinde Tespiti



Şekil 6.11.1 İskemik striatumda hücre tedavisinden 30 gün sonra GFP (+) fetal mikrokimerik değerlendirilmesi.

Hücre tedavisi uygulanan iskemik erkek fareler iskemi indükledikten 30 gün sonra sakrifiye edilmiş, hayvanların beyinleri izole edilmiştir. İzole edilen beyinlerin Bregma 0.0 bölgesinden kesitler alınmıştır. Hücre tedavisi sonrası GFP (+) hücrelerin iskemiden 30 gün sonra, uzun dönemde iskemik striatuma geçişini, burada nöronal ya da glial özellik gösterip göstermediklerinin tespiti için alınan kesitlere immünofloresan GFP, NeuN ve GFAP üçlü boyaması yapılmıştır. Boyamalar konfokal mikroskobu (LSM800, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiştir. *Şekil 6.11.1*'de mavi ile belirtilen DAPI hücrelerin çekirdeklerini, kırmızı ile belirtilen NeuN nöronal hücreleri, sarı ile belirtilen GFAP glial hücreleri, yeşil ile belirtilen GFP ise transgenik olarak yeşil floresan protein ifade eden hücreleri göstermektedir. Yapılan boyamalar sonucunda ipsilateral striatumda GFP (+) hücelere rastlanmıştır. GFP (+) hücrelerin aynı zamanda nöronal markör olan NeuN (+) olduğu ancak glial markör GFAP ile çakışma göstermediği gösterilmiştir (*Şekil 6.11.1*; tümü). Bar 20µm'dir.

## 6.12. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Hemisfer, Korpus Kallozum ve Striatum Alanına Etkisi



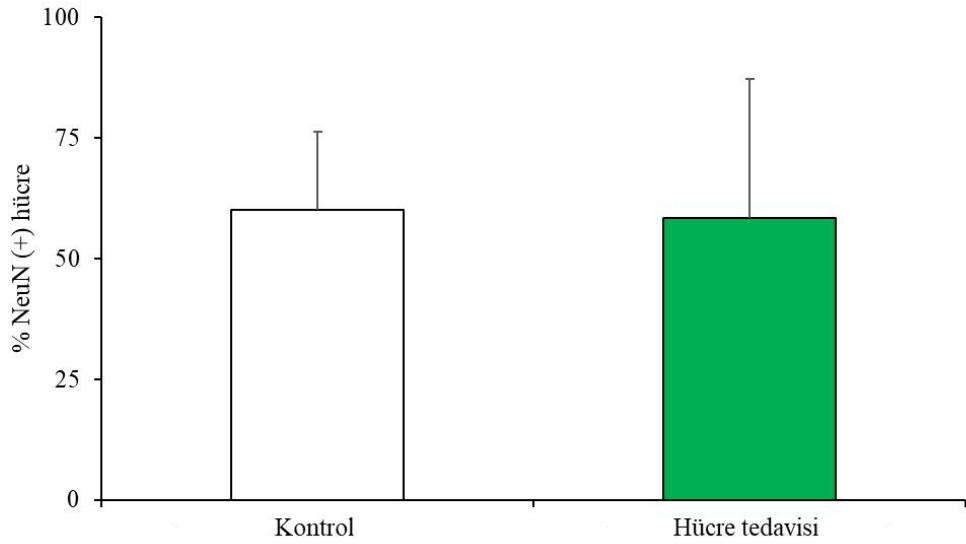
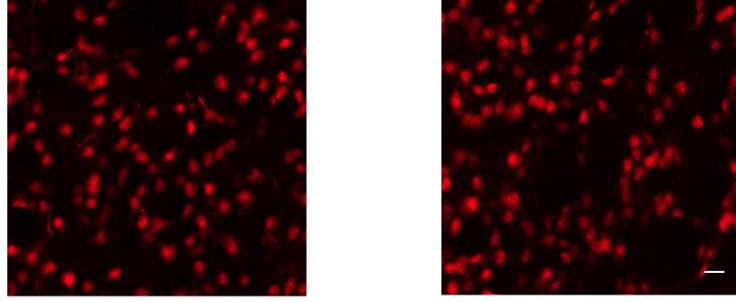
**Şekil 6.12.1** Hücre tedavisi sonrası uzun dönemde iskemik hemisfer, striatum ve korpus kallozum alanlarının değerlendirilmesi.

İskemi sonrası uzun dönemde fetal mikrokimerik hücrelerin iskemiden etkilenen beyin alanlarına etkisini araştırmak için Bregma 0.0 bölgesinden alınan kesitlere *Cresyl Violet* boyaması yapılmıştır. Boyama sonrasında Image J uygulaması kullanılarak hemisfer, korpus kallozum ve striatum alanları ölçülmüştür. Yapılan değerlendirme sonrasında iskemi sonrası ipsilateral hemisfer alanları, ipsilateral korpus kallozum alanları, ipsilateral striatum alanları karşılaştırıldığında uzun dönemde kontrol hayvanları ve fetal mikrokimerik hücre tedavisi yapılan hayvanların bu beyin alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bar 2 mm'dir.



### 6.13. İskemi Sonrası Uzun Dönemde Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Nöronal Sağkalıma Etkisi

#### Nöronal Sağkalım



**Şekil 6.13.1** Fetal mikrokimerik hücrelerin uzun dönemde nöronal sağkalıma etkisi.

Fetal mikrokimerik hücre tedavisinin uzun dönemde iskemik farelerde nöronal sağkalıma etkisini görmek için, fareler iskemi indüklendikten 30 gün sonra sakrifiye edilmiş, beyinleri izole edilmiş ve iskemiden etkilenen Bregma 0.0 bölgesinden kesitler alınmıştır. Alınan kesitlere nöronal markör olan NeuN ile immünofloresan boyaması yapılmıştır. Boyanan kesitler konfokal mikroskobu (LSM800, Zeiss, Almanya) ile görüntülenmiş, NeuN (+) hücreler sayılmış ve nöronal sağkalım değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeye göre hücre tedavisi yapılan fareler ve

kontrol grubu arasında nöronal sağkalım bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 6.13.1). Bar 20 $\mu$ m'dir.



## 7. TARTIŞMA

Bu tezde maternal kandan izole edilen fetal mikrokimerik hücrelerin farede iskemik beyne geçişi ve beyin hasarına etkisi yapılan *in vivo* çalışmalarla araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda fetal mikrokimerik hücrelerin hamilelikten bağımsız olarak maternal doku dışında hasar varlığında davranışlarının anlaşılması amaçlanmıştır. Hasar modeli olarak insanlarda iskemik beyin felci hastalarının neredeyse %80'inin etkilendiği orta serebral arter (OSA) oklüzyonu modeli kullanılmıştır (149). Bu amaç doğrultusunda iskemik beyin felci modeli oluşturulan farelere reperfüzyon başlangıcında maternal kandan izole edilen fetal mikrokimerik hücreler hücre tedavisi olarak verilmiştir. Kısa dönem (72 saat) ve uzun dönem (30 gün) olmak üzere fetal mikrokimerik hücrelerin maternal doku dışında hasar varlığında hayatta kalımları, hasarlı bölgeye göçleri ve hasara etkileri araştırılmıştır.

Hamilelik sırasında fetal ve maternal hücrelerin çift yönlü olarak geçişi yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (73, 150). Ancak yapılan çalışmalarda fetal mikrokimerik hücreler hamilelik sonlandıktan sonra ve maternal dokudaki hasarla ilişkilendirilmiştir (9, 151). Bu tez çalışmasında literatürden farklı olarak fetal mikrokimerik hücreler maternal kandan izole edilmiş ve hamilelikten bağımsız olarak iskemik erkek farelere tedavi amaçlı verilmiştir. Fetal mikrokimerik hücre çalışmalarında doğal tür dişilerin transgenik olarak floresan protein üreten erkek farelerle çiftleştirilerek bu çiftleşme sonucu taşıdıkları transgenik yavruların hücrelerinin floresan özelliğinden faydalanmak oldukça yaygındır (9, 10). Bu sebeple hem fetal mikrokimerik hücreleri maternal kandan izole edebilmek hem de hücreleri başka bir hayvanda takip edebilmek için doğal tür dişi ile transgenik olarak yeşil floresan protein (GFP) ifade eden erkek hayvanlar çiftleştirilmiştir. Bu çiftleşme sonrasında hamile olan dişilerin çiftleşmeden 14 gün sonra uterus veninde transgenik olarak GFP ifade eden hücreler olduğu görülmüştür (Şekil 6.1.1). Uterus veninin yavrudan topladığı kanı ve metabolik ürünleri anneye götürdüğü bilinmektedir (152). Transgenik olarak GFP ifade eden yavrulara hamile dişiler çiftleşmeden 14 gün sonra sakrifiye edilmiş ve kanları akış sitometrisi yöntemiyle analiz edilmiştir. Yapılan analizde Şekil 6.2.1, C'de gösterildiği gibi maternal kanda her bin çekirdekli hücrenin beşinde GFP ifade eden hücreye rastlanmıştır. Literatürde bu sayının geniş bir aralıkta olduğu bildirilmiştir. Sağlıklı bir

insan gebeliğinde maternal kanda on bin hücrenin biri ila bir milyar hücrenin biri aralığında fetal kökenli hücre bulunabileceği yönündedir (153). Bunun yanı sıra yine insan çalışmalarında bin maternal kan hücresinin içerisinde bir fetal kökenli hücreye rastlandığını bildiren çalışmalar yayımlanmıştır (154, 155).

Fetal mikrokimerik hücrelerin analizinde ve izolasyonunda akış sitometrisi yöntemi sıkça kullanılmaktadır (7, 9, 156). Bu tez çalışmasında, transgenik olarak GFP ifade eden fetal mikrokimerik hücreleri maternal kandan izole edebilmek için akış sitometrisi cihazının ayırma özelliğinden yararlanılmıştır. İzole edilen hücreler, hücre tedavisi için OSA oklüzyonu modelinde kullanılmıştır. Fetal mikrokimerik hücreler 30 dakikalık OSA oklüzyonu modelinin reperfüzyon başlangıcında iskemik farelerin kuyruklarından kanülasyon ile verilmiştir. Otuz dakika uygulanan OSA oklüzyonu modelinde hasar 72 saat sonra tamamlanmaktadır (157). Baş ve beyin bölgesinden venöz dönüşün juguler ven üzerinden gerçekleştiği bilinmektedir (158). Hücre tedavisinden 72 saat sonra, anestezi altında farelerin juguler veni izole edilerek kan akışı konfokal mikroskobu ile takip edilmiştir. Yapılan incelemede *Şekil 6.3.1*'de gösterildiği gibi iskemik hayvanların juguler veninden kan akışı sırasında GFP ifade eden hücrelerin geçtiği gözlemlenmiştir.

Fetal hücrelerin hamilelik sırasında maternal kan dolaşımına girebildiği, hamilelik tamamlandıktan sonra dahi maternal dolaşımda görüldüğü ve birçok maternal organa entegre olarak hayatlarını devam ettirdikleri fare ve insan çalışmalarıyla gösterilmiştir (75, 159-161). Hamilelik sırasında plasenta bariyerini aşarak maternal kana geçebilen fetal hücrelerin maternal beyne ulaşabilmek için kan-beyin bariyerini geçip geçemeyeceğini anlamak araştırmacılar için önem arz etmektedir. Bunu araştırmak adına bu tez çalışmasında fetal mikrokimerik hücre tedavisi uygulanan iskemik hayvanlar sakrifiye edilmiş kan ve beyin dokuları akış sitometrisiyle analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda iskemik hayvanların kanında, hasardan etkilenmiş ipsilateral beyin bölgesinde ve hasardan etkilenmemiş kontralateral beyin bölgesinde GFP ifade eden hücreler bulunduğu görülmüştür. Kan ve beyin bölgeleri karşılaştırıldığında, hasardan etkilenen ipsilateral beyin bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasardan etkilenmeyen kontralateral beyin bölgesine göre daha fazla GFP (+) hücreye rastlanmıştır (*Şekil 6.4.1*; C). Doğal tür erkek farede yeşil floresan protein üreten hücre bulunamayacağından, iskemik erkek



farede akış sitometrisi ile kanda ve beyinde tespit edilen GFP (+) hücreler fetal mikrokimerik hücreleri işaret etmektedir. Buna ek olarak, akis sitometrisi ile ilgili yapılan çalışmalarda muhtemel spesifik olmayan sinyallerin etkisini ortadan kaldırmak için negatif kontrol olarak GFP eksprese etmeyen hayvanların kan ve dokusu kullanılmıştır.

Literatürde fetal hücrelerin çeşitli organların hasarlı bölgelerine göç ettiği gösterilmiştir. Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada transgenik olarak GFP ifade eden erkek sıçanlarla doğal tür dişi sıçanları çiftleştirerek, doğal tür dişi sıçanların transgenik olarak GFP ifade eden yavrulara hamile kalmasını sağlamıştır. Doğal tür dişi sıçanlar doğum yaptıktan sonra karaciğer ve böbrek hasarına maruz bırakılmıştır. Wang ve arkadaşları sonrasında maternal organların hasarlı bölgesinde GFP (+) hücelere rastladıklarını rapor etmişlerdir. Raporladıkları çalışma fetal hücrelerin doğumdan sonra da maternal dokuda hayatta kalabildiklerini ve hasara yöneldiklerini destekler niteliktedir (162). Bu tez çalışmasında, fetal mikrokimerik hücrelerin iskemik hasardan sonra, kısa dönemde iskemik striatuma geçişinin, burada nöronal ya da glial hücelere farklılaşp farklılaşmadıklarının tespiti için 30 dakika OSA tıkanması ile oluşturulan iskemi modelinde etkilendiği bilinen Bregma 0.0 bölgesinden kesitler alınmıştır. Bu bölgeden alınan kesitlere immünofloresan GFP, NeuN ve GFAP üçlü boyaması yapılmıştır. Yapılan boyamalar sonucunda ipsilateral striatumda *Şekil 6.5.1'*de gösterilen GFP (+) hücelere rastlanmıştır. GFP (+) hücreler nöronal markör olan NeuN ya da glial markör GFAP ile çakışma göstermemiştir (*Şekil 6.5.1*; tümü). Maternal dokuda bulunan fetal kökenli hücrelerin plasenta ile yakın iletişim içerisinde oldukları için kök hücre özelliği gösterdiği, bu sebeple plasenta ve kan-beyin bariyerini geçebilme yetisine sahip olduğu araştırmacılar tarafından literatürde gösterilmiştir (163, 164). Hamilelik sırasında maternal kandan izole edilerek hücre tedavisi amaçlı kullanılan fetal mikrokimerik hücrelerin beyin kesitlerinde tespit edilebildiği için kan beyin bariyerini geçme potansiyeline sahip olduğu, ancak akut hasarın tamamlandığı 72. saatte farklılaşamadıkları için beynin fonksiyonel hücreleri olan nöron ya da gliaya dönüşemedikleri düşünülmektedir.

İskemik beyin felci çok yaygın olmasına ve birçok insanı nörolojik, psikolojik ve ekonomik yönden etkilemesine rağmen tedavisi yalnızca kısıtlı sayıda hastaya ulaşabilen doku plazminojen aktivatörüdür (165). Bunun yanı sıra beyin felcinin klinik

tedavisine yönelik yaklaşımlar geliştirilen ajanların etkin dozunun ve toksisitesinin insanlara uyarlanamaması, deneylerde kullanılan hayvanların yaş aralığının beyin felci geçiren hastaların yaş aralığından farklı olması gibi sebeplerle çoğu zaman başarısız olmaktadır (166, 167). Ancak yapılan araştırmalarda iskemik beyin felci tedavisinde hücrelerin kullanımı üzerine yapılan klinik öncesi çalışmalar, farklı tip ve kök hücre kaynaklarının uygulanmasının nörolojik defisitleri iyileştirebileceğini ve bazı durumlarda bu defisitleri önemli ölçüde azaltabileceğini açıkça göstermiştir (168). OSA oklüzyonu modeli ile indüklenen iskemik beyin felci sonucu ortaya çıkan nörolojik hasarı değerlendirmek için kullanılan yöntemlerden biri oluşan ödemi ölçmektir (169). *Cresyl violet* boyaması nöronların nissl cisimciklerini boyamaya yarayan immünohistokimyasal bir boyama yöntemidir (170). Fetal mikrokimerik hücre tedavisinin kısa dönem iskemik hasar üzerine etkisini anlamak için *Cresyl violet* boyaması yapılmıştır. Bu boyama sayesinde hemisfer alanları ölçülebilmektedir. İskemi sonrası oluşan ödemi değerlendirebilmek için ipsilateral hemisfer alanından kontralateral hemisfer anı çıkarılmış, bu değer kontralateral hemisfer alanının iki katıyla oranlanmış ve yüzde değişim hesaplanmıştır. Yapılan analiz sonucunda hücre tedavisi uygulanan iskemik farelerde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha az ödem olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.6.1).

Fetal mikrokimerik hücrelerin iskemik beyin felcinden 72 saat sonra nöronal sağkalıma etkisini değerlendirebilmek için iskemiden etkilenen Bregma 0.0 bölgesinden kesitler alınmış, alınan kesitlere nöronal markör olan NeuN ile immünofloresan boyaması yapılmıştır. NeuN, memelilerin merkezi sinir sistemindeki nöronların çoğunun çekirdeklerinde ve perinükleer sitoplazmasında lokalizedir. NeuN proteinine karşı üretilen antikorlar, nöronları değerlendirmek için immünofloresan boyamalarda aktif olarak kullanılmaktadır (171). Yapılan immünofloresan NeuN boyaması değerlendirildiğinde *Şekil 6.7.1*'de belirtildiği gibi iskemiden 72 saat sonra hücre tedavisi grubunun ipsilateral striatumunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla nöron olduğu gösterilmiştir.

İskemik koşullarda ortaya çıkan patofizyolojik olaylardan biri pro-inflamatuar sürecin başlamasıyla immün hücrelerin hasara göç etmesidir (138). Makrofajlar iskemi sonrası hasarlı bölgeye göç eden immün hücrelerdendir (116). Hasardan 72 saat sonra, kısa dönemde hasarlı bölgeye göç eden makrofajların değerlendirilebilmesi için

F4/80 immünofloresan boyaması yapılmıştır. Hücre tedavisi ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, hücre tedavisi grubunun iskemik striatumunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az F4/80 (+) hücre görülmüştür (Şekil 6.8.1). F4/80 (+) makrofajların pro-inflamatuar makrofajlar olduğu bilinmektedir (172). Hasarlı bölgeye periferik makrofajların göç etmesi, burada pro-inflamatuar faktörleri salgılamaları mikroglia ve astrositlerin aşırı aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu durum nöron hücrelerinin ölmelerine yol açarak iskemik hasarı arttırmaktadır (173).

Son yıllarda hayvan görüntüleme modeli olarak biyoluminesans görüntüleme oldukça sık kullanılmaktadır. Biyoluminesans görüntüleme bakteri ve virüs gibi patojenleri takip edebilme imkânı sağladığı gibi kök hücre, immün hücre gibi hücrelerin nakli sonrası bu hücrelerin gerçek zamanlı olarak takibini de mümkün kılmaktadır (174). Biyoluminesans görüntüleme, D-lusiferin substratının lüsiferaz enzimi tarafından parçalanmasıyla ortaya çıkan ışık emisyonunun ölçümüne dayalı bir yöntemdir (174). Biyoluminesans ve bilgisayarlı tomografinin bir araya getirildiği BLT/CT yönteminde ise enzim aktivasyonunun hangi anatomik bölgelerde ortaya çıktığını anlamaya yaramaktadır (175). Hücre tedavisi sonrası fetal mikrokimerik hücrelerin vücuttaki dağılımını canlı olarak takip edebilmek için biyoluminesans tomografi görüntüleme yöntemi kullanılmıştır (176). Bu görüntüleme yöntemini kullanabilmek için doğal tür dişi fareler, transgenik olarak yeşil floresan proteini ve lusiferaz enzimi ifade eden transgenik erkek farelerle çiftleştirilmiştir. Böylece hamile dişilerin yavrularının bir kısmının transgenik olarak yeşil floresan proteini ve lusiferaz enzimi ifade eden yavrular olması sağlanmıştır. Transgenik yavrulara hamile dişilerin maternal kanından fetal mikrokimerik hücreler izole edilmiştir. İzole edilen hücreler, OSA oklüzyonu modeliyle iskemik beyin felci indüklenen erkek farelere reperfüzyon başlangıcında hücre tedavisi olarak uygulanmıştır. Sonrasında fetal mikrokimerik hücre tedavisi uygulanan hayvanlar, tedaviden 1 gün sonra, 3 gün sonra, 10 gün sonra ve 30 gün sonra *in vivo* üç boyutlu biyoluminesans tomografi (BLT) görüntüleme sistemi kullanılarak canlı olarak görüntülenmiştir. Transgenik olarak lusiferaz enzimi ifade eden fetal mikrokimerik hücrelerin vücuttaki dağılımı, lusiferaz enzimi tarafından parçalanan D-lusiferin substratı sonucu ölçülen sinyal yoğunluğu belirlenmiştir. Şekil 6.9.1'de gösterilen baş, beyin ve gövde bölgeleri manuel olarak

işaretlenmiştir. Bu bölgelerde cihazın okuduğu toplam sinyal yoğunluk grafiği ölçüm yapılan zamana bağlı olarak çizilmiştir (Şekil 6.10.2; B, C, D). Şekil 6.10.1'de uzun dönemde iskemi sonrası fetal mikrokimerik hücrelerin zamana bağlı dağılımını gösteren *in vivo* üç boyutlu biyolüminesans tomografi görüntüleri ölçüm yapılan zamanlarda kontrol grubuyla karşılaştırılmış olarak gösterilmiştir. Belirli aralıklarla 30 gün boyunca izlenen fetal mikrokimerik hücrelerin hücre tedavisinden bir gün sonraya kıyasla beyin ve baş bölgesinde 30 gün sonra istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.10.2; B, C). Gövde bölgesinde ise fetal mikrokimerik hücre tedavisi sonrası üçüncü günde, birinci gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 6.10.2; D).

Literatürde fetal hücrelerin hasarlı maternal dokuya geçtikten sonra buradaki fonksiyonel hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Kara ve arkadaşları, transgenik olarak GFP ifade eden farelere hamile doğal tür dişilerde hamilelikleri sırasında myokard enfarktüsü indüklemiştir (7). Sonrasında kalbin hasarlı bölgesinde GFP (+) hücrelerin varlığını gösteren Kara ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bu hücrelerin kardiyomiyositlere dönüştüklerini göstermişlerdir (9). Tan ve arkadaşları ise eksitotoksik beyin hasarı indükledikleri farelerde hamilelikleri tamamlandıktan sonra fetal mikrokimerik hücrelere rastladıklarını ve bu hücrelerin nöronal özellik gösterdiklerini raporlamıştır (10). Fetal mikrokimerik hücrelerin iskemik hasardan otuz gün sonra, uzun dönemde iskemik striatuma geçişinin, burada nöronal ya da glial hücrelere farklılaşp farklılaşmadıklarının tespiti için 30 dakika OSA tıkanması ile oluşturulan iskemi sonrası beynin Bregma 0.0 bölgesinden kesitler alınmıştır. Bu bölge OSA tıkanması ile oluşturulan hasardan etkilenen bölgedir (177). Bu bölgeden alınan kesitlere immünfloresan GFP, NeuN ve GFAP üçlü boyaması yapılmıştır. Yapılan boyamalar sonucunda ipsilateral striatuma GFP (+) hücrelere rastlanmıştır. GFP (+) hücrelerin aynı zamanda nöronal markör olan NeuN (+) olduğu ancak glial markör GFAP ile çakışma göstermediği gösterilmiştir (Şekil 6.11.1; tümü). Hücre tedavisinden 30 gün sonra, iskemik hasarın olduğu beyin bölgesine göç eden GFP (+) fetal mikrokimerik hücrelerin aynı zamanda nöronal markör olan NeuN proteinini ifade etmeleri bu hücrelerin nöronlara farklılaştığı yönünde değerlendirilmiştir.

*Cresyl violet* boyaması beyin alanlarının ölçülerek analiz edilebilmesine olanak sağlamaktadır (178). Aynı zamanda *cresyl violet* boyaması iskemik beyin felci

hasarının ölçülüp değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (179). Bu tezde, OSA oklüzyonu modeli ile oluşturulan iskemik beyin hasarında fetal mikrokimerik hücre tedavisinin uzun dönemde ipsilateral hemisfer, korpus kallozum ve striatum alanlarına etkisini görebilmek için hasardan etkilenen Bregma 0.0 bölgesinden alınan kesitlere *crystal violet* boyaması yapılmıştır. Yapılan değerlendirme sonrasında fetal mikrokimerik hücrelerin tedavi amaçlı verildiği hayvanların ipsilateral hemisfer alanları, ipsilateral korpus kallozum alanları, ipsilateral striatum alanları kontrol hayvanlar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 6.12.1).

İskemik beyin felci sonrası uygulanan tedavinin nöronal sağkalıma ve hasarlı beyin bölgesini yeniden modellemeye katkısını anlamak için NeuN immünfloresan boyaması kullanılmaktadır (180). Fetal mikrokimerik hücre tedavisinin uzun dönemde nöronal sağkalıma etkisini anlayabilmek için Bregma 0.0 bölgesinden alınan beyin kesitlerine immünfloresan olarak NeuN boyaması yapılmıştır. Boyama sonucu kesitler fotoğraflanmış ve NeuN (+) hücreler sayılarak gruplar arası nöronal sağkalım değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucu fetal mikrokimerik hücre tedavisi uygulanan hayvanlar ile kontrol hayvanları arasında nöronal sağkalım bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 6.13.1).

Hücre temelli tedavi yöntemleri çalışma kolaylığı ve güvenliği sebebiyle son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken bir alan olmaktadır (181, 182). Maternal kanda ve dokuda tespit edilmiş fetal mikrokimerik hücrelerin kök hücreler gibi farklı hücrelere dönüşebildiği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (73, 150, 183). Hücre temelli tedavi yöntemlerinden biri olan kök hücre tedavisi iskemik beyin felci de dahil olmak üzere birçok merkezi sinir sistemi hastalığında çalışılmaktadır (184-187). Literatürde, transplate edilmiş kök hücrelerin iskemi hasarından etkilenen beyin bölgesini anjiyogenez ile yeniden yapılandırdığı, nöron ve gliaya farklılaşabildiği raporlanmıştır (188). Farklı kök hücre türlerini tedavi amaçlı, beyin felci sonrası farklı aşamalarında kullanmak için bir dizi klinik deneme yapılmıştır. Bu denemeler üzerine meta-analiz yapan bir grup araştırmacı, yaptıkları araştırma sonucunda kök hücre tedavisinin iskemik beyin felci sonucu ortaya çıkan nörolojik defisiti azalttığı, hastaların yaşam kalitesini arttırdığı ancak tedaviden hemen sonra hastalarda şiddetli baş ağrısı ve ateş gibi yan etkilere yol açtığı raporlamıştır (189). Fetal kökenli kök

hücreler, yetişkin kök hücelere nazaran daha fazla hücre tipine farklılaşabildiği için tedavi potansiyellerinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir (92, 190).



## 8. SONUÇ

Bu tezde elde edilen veriler ışığında fetal mikrokimerik hücrelerin kan-beyin bariyerini geçebildikleri, kısa dönemde (72 saat) iskemik hasarda nöronal sağkalımı artırıp ödemi azaltarak tedavi potansiyeline sahip oldukları görülmüştür. Bunun yanı sıra anne ve yavrudan bağımsız olarak yetişkin hasarlı fareye tedavi amaçlı verilen fetal mikrokimerik hücrelerin, bu farenin immün sisteminden saklanarak uzun dönemde hayatta kalabildikleri görülmüştür. Ayrıca biyoluminesans tomografi tekniği kullanılarak uzun dönem (30 gün) takip edilen fetal mikrokimerik hücrelerin iskemik beyin bölgesine göç ettiği ve yapılan immünfloresan boyamalarla bu hücrelerin hasarlı beyin alanında nörona farklılaştığı görülmüştür.

Fetal mikrokimerik hücrelerin fetal ve maternal doku dışında başka bir canlının immün sistemini aşarak uzun dönem hayatta kalması, kan beyin bariyerini geçmesi ve hasara yönelmesi hücre tedavisi temelli translasyonel çalışmalarda kullanılması için umut vadetmektedir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Dawe, GS, Tan, XW, and Xiao, ZC. Cell migration from baby to mother. *Cell Adh Migr* **1**, 19-27. (2007).
2. Shrivastava, S, Naik, R, Suryawanshi, H, and Gupta, N. Microchimerism: A new concept. *J Oral Maxillofac Pathol* **23**, 311. (2019).
3. O'Donoghue, K. Fetal microchimerism and maternal health during and after pregnancy. *Obstetric medicine* **1**, 56-64. (2008).
4. Cómitre-Mariano, B, Martínez-García, M, García-Gálvez, B, Paternina-Die, M, Desco, M, Carmona, S, et al. Feto-maternal microchimerism: Memories from pregnancy. *iScience* **25**, 103664. (2022).
5. Pritchard, S, Peter, I, Johnson, KL, and Bianchi, DW. The natural history of fetal cells in postpartum murine maternal lung and bone marrow: A two-stage phenomenon. *Chimerism* **3**, 59-64. (2012).
6. Beksac, MS, Fadiloglu, E, Cakar, AN, Gurbuz, RH, Atilla, P, Onbasilar, I, et al. Fetal cell microchimerism; normal and immunocompromised gestations in mice. *Fetal and Pediatric Pathology* **39**, 277-287. (2020).
7. Kara, RJ, Bolli, P, Matsunaga, I, Tanweer, O, Altman, P, and Chaudhry, HW. A mouse model for fetal maternal stem cell transfer during ischemic cardiac injury. *Clin Transl Sci* **5**, 321-328. (2012).
8. Zeng, XX, Tan, KH, Yeo, A, Sasajala, P, Tan, X, Xiao, ZC, et al. Pregnancy-associated progenitor cells differentiate and mature into neurons in the maternal brain. *Stem cells and development* **19**, 1819-1830. (2010).
9. Kara, RJ, Bolli, P, Karakikes, I, Matsunaga, I, Tripodi, J, Tanweer, O, et al. Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation. *Circ Res* **110**, 82-93. (2012).
10. Tan, XW, Liao, H, Sun, L, Okabe, M, Xiao, ZC, and Dawe, GS. Fetal Microchimerism in the Maternal Mouse Brain: A Novel Population of Fetal Progenitor or Stem Cells Able to Cross the Blood–Brain Barrier? *Stem Cells* **23**, 1443-1452. (2005).
11. Ingall, T. Stroke-incidence, mortality, morbidity and risk. *Journal of insurance medicine-new york then denver*. **36**, 143-152. (2004).



12. Girnar, GA, and Mahajan, HS. Cerebral ischemic stroke and different approaches for treatment of stroke. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* **7**, 134. (2021).
13. Krause, M, Phan, TG, Ma, H, Sobey, CG, and Lim, R. Cell-Based Therapies for Stroke: Are We There Yet? *Frontiers in neurology* **10**(2019).
14. Bazopoulou-Kyrkanidou, E. Chimeric creatures in Greek mythology and reflections in science. *Am J Med Genet* **100**, 66-80. (2001).
15. Nelson, JL. The otherness of self: microchimerism in health and disease. *Trends Immunol* **33**, 421-427. (2012).
16. Lillie, FR. The theory of the free-martin. *Science* **43**, 611-613. (1916).
17. Owen, RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* **102**, 400-401. (1945).
18. Martin, A. Ray Owen and the history of naturally acquired chimerism. *Chimerism* **6**, 2-7. (2015).
19. Hallum, S, Jakobsen, MA, Gerds, TA, Pinborg, A, Tjønneland, A, and Kamper-Jørgensen, M. Male origin microchimerism and ovarian cancer. *International Journal of Epidemiology* **50**, 87-94. (2021).
20. Castela, M, Nassar, D, Sbeih, M, Jachiet, M, Wang, Z, and Aractingi, S. Ccl2/Ccr2 signalling recruits a distinct fetal microchimeric population that rescues delayed maternal wound healing. *Nature communications* **8**, 15463. (2017).
21. Fugazzola, L, Cirello, V, and Beck-Peccoz, P. Fetal microchimerism as an explanation of disease. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 89-97. (2011).
22. Andrikovics, H, Orfi, Z, Meggyesi, N, Bors, A, Varga, L, Kovy, P, et al. Current Trends in Applications of Circulatory Microchimerism Detection in Transplantation. *Int J Mol Sci* **20**(2019).
23. Lui, YY, Chik, KW, Chiu, RW, Ho, CY, Lam, CW, and Lo, YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* **48**, 421-427. (2002).
24. Wenk, RE, and Chiafari, PA. DNA typing of recipient blood after massive transfusion. *Transfusion* **37**, 1108-1110. (1997).

25. Starzl, TE, Demetris, AJ, Trucco, M, Ramos, H, Zeevi, A, Rudert, WA, et al. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* **340**, 876-877. (1992).
26. Ascher, NL. Microchimerism in organ transplantation. *Liver Transpl Surg* **1**, 43-46. (1995).
27. Bloch, EM, Jackman, RP, Lee, TH, and Busch, MP. Transfusion-associated microchimerism: the hybrid within. *Transfusion medicine reviews* **27**, 10-20. (2013).
28. Matsagos, S, Verigou, E, Kourakli, A, Alexis, S, Vrakas, S, Argyropoulou, C, et al. High Frequency of Post-Transfusion Microchimerism Among Multi-Transfused Beta-Thalassemic Patients. *Frontiers in Medicine* **9**(2022).
29. Jensen, LS. Immunosuppression and leukocytes. *Leukocyte-depleted blood products* **60**, 64-74. (1994).
30. Jensen, LS, Kissmeyer-Nielsen, P, Wolff, B, and Qvist, N. Randomised comparison of leucocyte-depleted versus buffy-coat-poor blood transfusion and complications after colorectal surgery. *The Lancet* **348**, 841-845. (1996).
31. Starzl, TE, and Zinkernagel, RM. Transplantation tolerance from a historical perspective. *Nature Reviews Immunology* **1**, 233-239. (2001).
32. Eikmans, M, van Halteren, AGS, van Besien, K, van Rood, JJ, Drabbels, JJM, and Claas, FHJ. Naturally acquired microchimerism: implications for transplantation outcome and novel methodologies for detection. *Chimerism* **5**, 24-39. (2014).
33. Starzl, TE, Demetris, AJ, Trucco, M, Zeevi, A, Ramos, H, and Terasaki, P. Chimerism and donor-specific nonreactivity 27 To 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation* **55**, 1272-1276. (1993).
34. Starzl, TE, and Zinkernagel, RM. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. *N Engl J Med* **339**, 1905-1913. (1998).
35. Miller, LW. Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **2**, 807-818. (2002).

36. Cangemi, M, Montico, B, Faè, DA, Steffan, A, and Dolcetti, R. Dissecting the Multiplicity of Immune Effects of Immunosuppressive Drugs to Better Predict the Risk of de novo Malignancies in Solid Organ Transplant Patients. *Frontiers in oncology* **9**, 160. (2019).
37. Messner, F, Etra, JW, Dodd, OJ, and Brandacher, G. Chimerism, Transplant Tolerance, and Beyond. *Transplantation* **103**, 1556-1567. (2019).
38. Haugaard, AK, Kofoed, J, Masmus, TN, Madsen, HO, Marquart, HV, Heilmann, C, et al. Is microchimerism a sign of imminent disease recurrence after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? A systematic review of the literature. *Blood reviews* **44**, 100673. (2020).
39. Oura, T, Cosimi, AB, and Kawai, T. Chimerism-based tolerance in organ transplantation: preclinical and clinical studies. *Clinical and experimental immunology* **189**, 190-196. (2017).
40. Nadazdin, O, Abrahamian, G, Boskovic, S, Smith, RN, Schoenfeld, DA, Madsen, JC, et al. Stem cell mobilization and collection for induction of mixed chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *The Journal of surgical research* **168**, 294-300. (2011).
41. Sachs, DH, Sykes, M, Kawai, T, and Cosimi, AB. Immuno-intervention for the induction of transplantation tolerance through mixed chimerism. *Seminars in immunology* **23**, 165-173. (2011).
42. Scandling, JD, Busque, S, Lowsky, R, Shizuru, J, Shori, A, Engleman, E, et al. Macrochimerism and clinical transplant tolerance. *Human immunology* **79**, 266-271. (2018).
43. Scandling, JD, Busque, S, Dejbakhsh-Jones, S, Benike, C, Millan, MT, Shizuru, JA, et al. Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* **358**, 362-368. (2008).
44. Sykes, M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* **14**, 417-424. (2001).
45. Pilat, N, and Wekerle, T. Transplantation tolerance through mixed chimerism. *Nature reviews. Nephrology* **6**, 594-605. (2010).

46. Lowsky, R, and Strober, S. Establishment of Chimerism and Organ Transplant Tolerance in Laboratory Animals: Safety and Efficacy of Adaptation to Humans. *Frontiers in immunology* **13**, 805177. (2022).
47. Waszak, M, Cieřlik, K, Wielgus, K, Słomski, R, Szalata, M, Skrzypczak-Zielińska, M, et al. Microchimerism in twins. *Archives of medical science : AMS* **9**, 1102-1106. (2013).
48. Rosner, M, Kolbe, T, and Hengstschläger, M. Fetomaternal microchimerism and genetic diagnosis: On the origins of fetal cells and cell-free fetal DNA in the pregnant woman. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **788**, 108399. (2021).
49. Tapia, G. Grandmaternal microchimerism: interesting curiosity or clinically relevant phenomenon? *EBioMedicine* **74**, 103743. (2021).
50. Peterson, SE, Nelson, JL, Gadi, VK, and Gammill, HS. Fetal cellular microchimerism in miscarriage and pregnancy termination. *Chimerism* **4**, 136-138. (2013).
51. Yan, Z, Lambert, NC, Guthrie, KA, Porter, AJ, Loubiere, LS, Madeleine, MM, et al. Male microchimerism in women without sons: Quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *The American Journal of Medicine* **118**, 899-906. (2005).
52. Boyon, C, Collinet, P, Boulanger, L, Rubod, C, Lucot, JP, and Vinatier, D. Fetal microchimerism: benevolence or malevolence for the mother? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **158**, 148-152. (2011).
53. Gammill, HS, and Nelson, JL. Naturally acquired microchimerism. *The International journal of developmental biology* **54**, 531-543. (2010).
54. Schmorl, G. *Pathologisch-anatomische untersuchungen über puerperal-eklampsie*, Vogel(1893).
55. Lapaire, O, Holzgreve, W, Oosterwijk, JC, Brinkhaus, R, and Bianchi, DW. Georg Schmorl on Trophoblasts in the Maternal Circulation. *Placenta* **28**, 1-5. (2007).

56. Douglas, GW, Thomas, L, Carr, M, Cullen, NM, and Morris, R. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* **78**, 960-973. (1959).
57. Walknowska, J, Conte, FA, and Grumbach, MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* **1**, 1119-1122. (1969).
58. Bianchi, DW, Flint, AF, Pizzimenti, MF, Knoll, JH, and Latt, SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3279-3283. (1990).
59. Khosrotehrani, K, and Bianchi, DW. Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *J Cell Sci* **118**, 1559-1563. (2005).
60. O'Donoghue, K, Choolani, M, Chan, J, de la Fuente, J, Kumar, S, Campagnoli, C, et al. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Molecular human reproduction* **9**, 497-502. (2003).
61. Bianchi, DW, Khosrotehrani, K, Way, SS, MacKenzie, TC, Bajema, I, and O'Donoghue, K. Forever Connected: The Lifelong Biological Consequences of Fetomaternal and Maternofetal Microchimerism. *Clinical Chemistry* **67**, 351-362. (2020).
62. Georgiades, P, Ferguson-Smith, AC, and Burton, GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* **23**, 3-19. (2002).
63. Remien, K, and Majmundar, SH. Physiology, Fetal Circulation. In *StatPearls*, Treasure Island (FL). (2022).
64. Carter, AM. Animal models of human placentation—a review. *Placenta* **28**, S41-S47. (2007).
65. Bianchi, DW, and Lo, YD. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang. *Annals of the New York Academy of Sciences* **945**, 119-131. (2001).
66. Devi, B, Jennison, R, and Langley, F. Significance of placental pathology in transplacental haemorrhage. *Journal of clinical Pathology* **21**, 322-331. (1968).

67. Batcup, G, Tovey, L, and Longster, G. Fetomaternal blood group incompatibility studies in placental intervillous thrombosis. *Placenta* **4**, 449-453. (1983).
68. Zilliacus, R, De La Chapelle, A, Schröder, J, Tiilikainen, A, Kohne, E, and Kleihauer, E. Transplacental passage of foetal blood cells. *Scandinavian journal of haematology* **15**, 333-338. (1975).
69. Engelhardt, B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood–brain barrier. *Journal of neural transmission* **113**, 477-485. (2006).
70. Jimenez, DF, and Tarantal, AF. Quantitative analysis of male fetal DNA in maternal serum of gravid rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Pediatric research* **53**, 18-23. (2003).
71. Khosrotehrani, K, Johnson, KL, Guégan, S, Stroh, H, and Bianchi, DW. Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy. *Journal of reproductive immunology* **66**, 1-12. (2005).
72. Ariga, H, Ohto, H, Busch, MP, Imamura, S, Watson, R, Reed, W, et al. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* **41**, 1524-1530. (2001).
73. Fujiki, Y, Johnson, KL, Peter, I, Tighiouart, H, and Bianchi, DW. Fetal cells in the pregnant mouse are diverse and express a variety of progenitor and differentiated cell markers. *Biology of reproduction* **81**, 26-32. (2009).
74. Kolialexi, A, Tsangaris, GT, Antsaklis, A, and Mavroua, A. Rapid clearance of fetal cells from maternal circulation after delivery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1022**, 113-118. (2004).
75. Bianchi, DW, Zickwolf, GK, Weil, GJ, Sylvester, S, and DeMaria, MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 705-708. (1996).
76. Bianchi, DW, Farina, A, Weber, W, Delli-Bovi, LC, DeRiso, M, Williams, JM, et al. Significant fetal-maternal hemorrhage after termination of pregnancy: implications for development of fetal cell microchimerism. *American journal of obstetrics and gynecology* **184**, 703-706. (2001).

77. Johnson, KL, Samura, O, Nelson, JL, McDonnell MD, WM, and Bianchi, DW. Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C: Evidence of long-term survival and expansion. *Hepatology* **36**, 1295-1297. (2002).
78. Khosrotehrani, K, and Bianchi, DW. Fetal cell microchimerism: helpful or harmful to the parous woman? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **15**, 195-199. (2003).
79. Chan, WF, and Nelson, JL. Microchimerism in the human brain: more questions than answers. *Chimerism* **4**, 32-33. (2013).
80. Nelson, J. Microchimerism and human autoimmune diseases. *Lupus* **11**, 651-654. (2002).
81. Boddy, AM, Fortunato, A, Wilson Sayres, M, and Aktipis, A. Fetal microchimerism and maternal health: a review and evolutionary analysis of cooperation and conflict beyond the womb. *Bioessays* **37**, 1106-1118. (2015).
82. Somers, EC. Pregnancy and autoimmune diseases. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **64**, 3-10. (2020).
83. Khashan, AS, Kenny, LC, Laursen, TM, Mahmood, U, Mortensen, PB, Henriksen, TB, et al. Pregnancy and the risk of autoimmune disease. *PLoS One* **6**, e19658. (2011).
84. Shree, R, Harrington, WE, Kanaan, SB, Forsyth, A, Cousin, E, Lopez, A, et al. Fetal microchimerism by mode of delivery: a prospective cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* **126**, 24-31. (2019).
85. Artlett, CM, Smith, JB, and Jimenez, SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* **338**, 1186-1191. (1998).
86. Cha, D, Khosrotehrani, K, Kim, Y, Stroh, H, Bianchi, DW, and Johnson, KL. Cervical cancer and microchimerism. *Obstetrics and gynecology* **102**, 774-781. (2003).
87. Nelson, JL, Hughes, KA, Smith, AG, Nisperos, BB, Branchaud, AM, and Hansen, JA. Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **329**, 466-471. (1993).

88. Florim, GM, Caldas, HC, de Melo, JC, Baptista, MA, Fernandes, IM, Savoldi-Barbosa, M, et al. Fetal microchimerism in kidney biopsies of lupus nephritis patients may be associated with a beneficial effect. *Arthritis research & therapy* **17**, 101. (2015).
89. Gadi, VK, Malone, KE, Guthrie, KA, Porter, PL, and Nelson, JL. Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer. *PLoS One* **3**, e1706. (2008).
90. Cirello, V, Perrino, M, Colombo, C, Muzza, M, Filopanti, M, Vicentini, L, et al. Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: studies in peripheral blood and tissues. *International journal of cancer* **126**, 2874-2878. (2010).
91. Kallenbach, LR, Johnson, KL, and Bianchi, DW. Fetal cell microchimerism and cancer: a nexus of reproduction, immunology, and tumor biology. *Cancer research* **71**, 8-12. (2011).
92. Lee, ES, Bou-Gharios, G, Seppanen, E, Khosrotehrani, K, and Fisk, NM. Fetal stem cell microchimerism: natural-born healers or killers? *Molecular human reproduction* **16**, 869-878. (2010).
93. O'Donoghue, K, Chan, J, de la Fuente, J, Kennea, N, Sandison, A, Anderson, JR, et al. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *The lancet* **364**, 179-182. (2004).
94. Bayes-Genis, A, Bellosillo, B, de La Calle, O, Salido, M, Roura, S, Ristol, FS, et al. Identification of male cardiomyocytes of extracardiac origin in the hearts of women with male progeny: male fetal cell microchimerism of the heart. *The Journal of heart and lung transplantation* **24**, 2179-2183. (2005).
95. Krabchi, K, Gadji, M, Yan, J, and Drouin, R. Dual-color PRINS for in situ detection of fetal cells in maternal blood. In *PRINS and In Situ PCR Protocols* pp. 141-149, Springer(2006).
96. Thiele, K, Holzmann, C, Solano, ME, Zahner, G, and Arck, PC. Comparative sensitivity analyses of quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry in detecting cellular microchimerism in murine tissues. *Journal of Immunological Methods* **406**, 74-82. (2014).



97. Cismaru, CA, Pop, L, and Berindan-Neagoe, I. Incognito: Are Microchimeric Fetal Stem Cells that Cross Placental Barrier Real Emissaries of Peace? *Stem cell reviews and reports* **14**, 632-641. (2018).
98. Lambert, NC, Erickson, TD, Yan, Z, Pang, JM, Guthrie, KA, Furst, DE, et al. Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time polymerase chain reaction: studies of healthy women and women with scleroderma. *Arthritis & Rheumatism* **50**, 906-914. (2004).
99. Kara, RJ, Bolli, P, Karakikes, I, Matsunaga, I, Tripodi, J, Tanweer, O, et al. Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation. *Circulation research* **110**, 82-93. (2012).
100. Bacakova, L, Zarubova, J, Travnickova, M, Musilkova, J, Pajorova, J, Slepicka, P, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnology advances* **36**, 1111-1126. (2018).
101. Shekkeris, AS, Jaiswal, PK, and Khan, WS. Clinical applications of mesenchymal stem cells in the treatment of fracture non-union and bone defects. *Current stem cell research & therapy* **7**, 127-133. (2012).
102. Zhang, Y, Khan, D, Delling, J, and Tobiasch, E. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *TheScientificWorldJournal* **2012**, 793823. (2012).
103. Majhail, NS, Farnia, SH, Carpenter, PA, Champlin, RE, Crawford, S, Marks, DI, et al. Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **21**, 1863-1869. (2015).
104. Alessandrini, M, Preynat-Seauve, O, De Bruin, K, and Pepper, MS. Stem cell therapy for neurological disorders. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* **109**, 70-77. (2019).
105. Müller, P, Lemcke, H, and David, R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases - Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol Biochem* **48**, 2607-2655. (2018).

106. Chen, S, Du, K, and Zou, C. Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Res Ther* **11**, 275. (2020).
107. Mikhail, MA, M'Hamdi, H, Welsh, J, Levicar, N, Marley, SB, Nicholls, JP, et al. High frequency of fetal cells within a primitive stem cell population in maternal blood. *Hum Reprod* **23**, 928-933. (2008).
108. Kuriakose, D, and Xiao, Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* **21**(2020).
109. Hankey, GJ. Stroke. *Lancet* **389**, 641-654. (2017).
110. Takeuchi, N, and Izumi, S. Rehabilitation with poststroke motor recovery: a review with a focus on neural plasticity. *Stroke Res Treat* **2013**, 128641. (2013).
111. Mauldin, PD, Simpson, KN, Palesch, YY, Spilker, JS, Hill, MD, Khatri, P, et al. Design of the economic evaluation for the Interventional Management of Stroke (III) trial. *Int J Stroke* **3**, 138-144. (2008).
112. Strilciuc, S, Grad, DA, Radu, C, Chira, D, Stan, A, Ungureanu, M, et al. The economic burden of stroke: a systematic review of cost of illness studies. *Journal of medicine and life* **14**, 606-619. (2021).
113. Gravanis, I, and Tsirka, SE. Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 159-170. (2008).
114. Musuka, TD, Wilton, SB, Traboulsi, M, and Hill, MD. Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **187**, 887-893. (2015).
115. Broughton, BR, Reutens, DC, and Sobey, CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, e331-339. (2009).
116. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397. (1999).
117. Woodruff, TM, Thundyil, J, Tang, SC, Sobey, CG, Taylor, SM, and Arumugam, TV. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular neurodegeneration* **6**, 11. (2011).

118. Gelderblom, M, Leypoldt, F, Steinbach, K, Behrens, D, Choe, CU, Siler, DA, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* **40**, 1849-1857. (2009).
119. Suh, SW, Shin, BS, Ma, H, Van Hoecke, M, Brennan, AM, Yenari, MA, et al. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Annals of neurology* **64**, 654-663. (2008).
120. Martin, RL, Lloyd, HG, and Cowan, AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* **17**, 251-257. (1994).
121. MartInez-Coria, H, Arrieta-Cruz, I, Cruz, ME, and López-Valdés, HE. Physiopathology of ischemic stroke and its modulation using memantine: evidence from preclinical stroke. *Neural regeneration research* **16**, 433-439. (2021).
122. Katsura, K, Kristián, T, and Siesjö, BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochemical Society transactions* **22**, 991-996. (1994).
123. Li, Y, Cheng, X, Liu, X, Wang, L, Ha, J, Gao, Z, et al. Treatment of Cerebral Ischemia Through NMDA Receptors: Metabotropic Signaling and Future Directions. *Frontiers in pharmacology* **13**, 831181. (2022).
124. Guo, C, and Ma, YY. Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. *Frontiers in neural circuits* **15**, 711564. (2021).
125. Furukawa, K, Fu, W, Li, Y, Witke, W, Kwiatkowski, DJ, and Mattson, MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* **17**, 8178-8186. (1997).
126. Caldeira, MV, Salazar, IL, Curcio, M, Canzoniero, LM, and Duarte, CB. Role of the ubiquitin–proteasome system in brain ischemia: Friend or foe? *Progress in neurobiology* **112**, 50-69. (2014).
127. Nash, KM, Schiefer, IT, and Shah, ZA. Development of a reactive oxygen species-sensitive nitric oxide synthase inhibitor for the treatment of ischemic stroke. *Free Radic Biol Med* **115**, 395-404. (2018).

128. Love, S. Oxidative Stress in Brain Ischemia. *Brain Pathology* **9**, 119-131. (1999).
129. Gaucher, C, Boudier, A, Bonetti, J, Clarot, I, Leroy, P, and Parent, M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **7**(2018).
130. Sanderson, TH, Reynolds, CA, Kumar, R, Przyklenk, K, and Hüttemann, M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol* **47**, 9-23. (2013).
131. Mattson, MP, LaFerla, FM, Chan, SL, Leissring, MA, Shepel, PN, and Geiger, JD. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences* **23**, 222-229. (2000).
132. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**, 89-102. (2012).
133. Wan, H, Wang, Q, Chen, X, Zeng, Q, Shao, Y, Fang, H, et al. WDR45 contributes to neurodegeneration through regulation of ER homeostasis and neuronal death. *Autophagy* **16**, 531-547. (2020).
134. Nikolettou, V, Markaki, M, Palikaras, K, and Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 3448-3459. (2013).
135. Peng, J, Ghosh, D, Pang, J, Zhang, L, Yin, S, and Jiang, Y. Intertwined Relation between the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria in Ischemic Stroke. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, 3335887. (2022).
136. Rothwell, NJ, and Hopkins, SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* **18**, 130-136. (1995).
137. Gong, C, Qin, Z, Betz, AL, Liu, XH, and Yang, GY. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* **801**, 1-8. (1998).
138. Przykaza, Ł. Understanding the Connection Between Common Stroke Comorbidities, Their Associated Inflammation, and the Course of the Cerebral Ischemia/Reperfusion Cascade. *Frontiers in immunology* **12**, 782569. (2021).

139. Qiu, YM, Zhang, CL, Chen, AQ, Wang, HL, Zhou, YF, Li, YN, et al. Immune Cells in the BBB Disruption After Acute Ischemic Stroke: Targets for Immune Therapy? *Frontiers in immunology* **12**, 678744. (2021).
140. Hossmann, KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of neurology* **36**, 557-565. (1994).
141. Lu, J, Mei, Q, Hou, X, Manaenko, A, Zhou, L, Liebeskind, DS, et al. Imaging Acute Stroke: From One-Size-Fit-All to Biomarkers. *Frontiers in neurology* **12**, 697779. (2021).
142. Qureshi, AI, Ali, Z, Suri, MF, Shuaib, A, Baker, G, Todd, K, et al. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. *Critical care medicine* **31**, 1482-1489. (2003).
143. Fabricius, M, Fuhr, S, Bhatia, R, Boutelle, M, Hashemi, P, Strong, AJ, et al. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain* **129**, 778-790. (2005).
144. Koopmans, M, Hovinga, ICK, Baelde, HJ, Harvey, MS, de Heer, E, Bruijn, JA, et al. Chimerism occurs in thyroid, lung, skin and lymph nodes of women with sons. *Journal of reproductive immunology* **78**, 68-75. (2008).
145. Chan, WF, Gurnot, C, Montine, TJ, Sonnen, JA, Guthrie, KA, and Nelson, JL. Male microchimerism in the human female brain. *PLoS One* **7**, e45592. (2012).
146. Jonsson, AM, Uzunel, M, Götherström, C, Papadogiannakis, N, and Westgren, M. Maternal microchimerism in human fetal tissues. *American journal of obstetrics and gynecology* **198**, 325. e321-325. e326. (2008).
147. Nelson, JL. Maternal–fetal immunology and autoimmune disease. Is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* **39**, 191-194. (1996).
148. Ritzel, RM, Patel, AR, Spsychala, M, Verma, R, Crapser, J, Koellhoffer, EC, et al. Multiparity improves outcomes after cerebral ischemia in female mice despite features of increased metabovascular risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E5673-e5682. (2017).
149. Caglayan, AB, Beker, MC, Sertel Evren, E, Caglayan, B, Kilic, Ü, Ates, N, et al. The Unconventional Growth Factors Cerebral Dopamine Neurotrophic

- Factor and Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor Promote Post-ischemic Neurological Recovery, Perilesional Brain Remodeling, and Lesion-Remote Axonal Plasticity. *Translational stroke research* (2022).
150. Khosrotehrani, K, Johnson, KL, Cha, DH, Salomon, RN, and Bianchi, DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *Jama* **292**, 75-80. (2004).
  151. Kajbafzadeh, AM, Sabetkish, S, and Sabetkish, N. The role of fetal-maternal microchimerism as a natural-born healer in integrity improvement of maternal damaged kidney. *Int Braz J Urol* **44**, 608-616. (2018).
  152. Wasson, C, Kelly, A, Ninan, D, and Tran, Q. Placental blood flow. In *Absolute Obstetric Anesthesia Review* pp. 21-22, Springer(2019).
  153. Krabchi, K, Gros-Louis, F, Yan, J, Bronsard, M, Massé, J, Forest, J-C, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clinical Genetics* **60**, 145-150. (2001).
  154. Krabchi, K, Gadji, M, Samassekou, O, Grégoire, M-C, Forest, J-C, and Drouin, R. Quantification of fetal nucleated cells in maternal blood of pregnant women with a male trisomy 21 fetus using molecular cytogenetic techniques. *Prenatal Diagnosis* **26**, 28-34. (2006).
  155. Krabchi, K, Gadji, M, Forest, J-C, and Drouin, R. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood in different cases of aneuploidies. *Clinical Genetics* **69**, 145-154. (2006).
  156. Nassar, D, Droitcourt, C, Mathieu-d'Argent, E, Kim, MJ, Khosrotehrani, K, and Aractingi, S. Fetal progenitor cells naturally transferred through pregnancy participate in inflammation and angiogenesis during wound healing. *Faseb j* **26**, 149-157. (2012).
  157. Caglayan, AB, Beker, MC, Caglayan, B, Yalcin, E, Caglayan, A, Yulug, B, et al. Acute and Post-acute Neuromodulation Induces Stroke Recovery by Promoting Survival Signaling, Neurogenesis, and Pyramidal Tract Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **13**(2019).

158. Neimark, MA, Konstas, AA, Laine, AF, and Pile-Spellman, J. Integration of jugular venous return and circle of Willis in a theoretical human model of selective brain cooling. *J Appl Physiol* (1985) **103**, 1837-1847. (2007).
159. Herzenberg, LA, Bianchi, DW, Schröder, J, Cann, HM, and Iverson, GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 1453-1455. (1979).
160. Liegeois, A, Gaillard, M, Ouvre, E, and Lewin, D. Microchimerism in pregnant mice. In *Transplantation proceedings* Vol. 13 pp. 1250-1252(1981).
161. Johnson, KL, Nelson, JL, Furst, DE, McSweeney, PA, Roberts, DJ, Zhen, DK, et al. Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* **44**, 1848-1854. (2001).
162. Wang, Y, Iwatani, H, Ito, T, Horimoto, N, Yamato, M, Matsui, I, et al. Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**, 961-967. (2004).
163. Alvarez-Silva, M, Belo-Diabangouaya, P, Salaün, J, and Dieterlen-Lièvre, F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. (2003).
164. Gekas, C, Dieterlen-Lièvre, F, Orkin, SH, and Mikkola, HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental cell* **8**, 365-375. (2005).
165. Reeves, MJ, Arora, S, Broderick, JP, Frankel, M, Heinrich, JP, Hickenbottom, S, et al. Acute stroke care in the US: results from 4 pilot prototypes of the Paul Coverdell National Acute Stroke Registry. *Stroke* **36**, 1232-1240. (2005).
166. Sacco, RL, Chong, JY, Prabhakaran, S, and Elkind, MS. Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet* **369**, 331-341. (2007).
167. Gladstone, DJ, Black, SE, and Hakim, AM. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* **33**, 2123-2136. (2002).
168. Misra, V, Ritchie, MM, Stone, LL, Low, WC, and Janardhan, V. Stem cell therapy in ischemic stroke: role of IV and intra-arterial therapy. *Neurology* **79**, S207-212. (2012).

169. Kuts, R, Frank, D, Gruenbaum, BF, Grinshpun, J, Melamed, I, Knyazer, B, et al. A Novel Method for Assessing Cerebral Edema, Infarcted Zone and Blood-Brain Barrier Breakdown in a Single Post-stroke Rodent Brain. *Front Neurosci* **13**, 1105. (2019).
170. Miko, M, and Varga, I. Chapter 6 - Histologic Examination of Peripheral Nerves. In *Nerves and Nerve Injuries* (Tubbs, R. S., Rizk, E., Shoja, M. M., Loukas, M., Barbaro, N., and Spinner, R. J., eds) pp. 79-89, Academic Press, San Diego. (2015).
171. Gusel'nikova, VV, and Korzhevskiy, DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta naturae* **7**, 42-47. (2015).
172. Lee, Y-S, Kim, M-H, Yi, H-S, Kim, SY, Kim, H-H, Kim, JH, et al. CX3CR1 differentiates F4/80low monocytes into pro-inflammatory F4/80high macrophages in the liver. *Sci Rep-Uk* **8**, 15076. (2018).
173. Jayaraj, RL, Azimullah, S, Beiram, R, Jalal, FY, and Rosenberg, GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation* **16**, 142. (2019).
174. Zinn, KR, Chaudhuri, TR, Szafran, AA, O'Quinn, D, Weaver, C, Dugger, K, et al. Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR journal* **49**, 103-115. (2008).
175. Zhang, B, Yin, W, Liu, H, Cao, X, and Wang, H. Bioluminescence tomography with structural information estimated via statistical mouse atlas registration. *Biomedical optics express* **9**, 3544-3558. (2018).
176. Bao, H, Xia, Y, Yu, C, Ning, X, Liu, X, Fu, H, et al. CT/Bioluminescence Dual-Modal Imaging Tracking of Mesenchymal Stem Cells in Pulmonary Fibrosis. *Small* **15**, 1904314. (2019).
177. Ates, N, Caglayan, A, Balcikanli, Z, Sertel, E, Beker, MC, Dilsiz, P, et al. Phosphorylation of PI3K/Akt at Thr308, but not phosphorylation of MAPK kinase, mediates lithium-induced neuroprotection against cerebral ischemia in mice. *Experimental Neurology* **351**, 113996. (2022).
178. Rousselet, E, Kriz, J, and Seidah, NG. Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2012).



179. Au - Rousselet, E, Au - Kriz, J, and Au - Seidah, NG. Mouse Model of Intraluminal MCAO: Cerebral Infarct Evaluation by Cresyl Violet Staining. *JoVE*, e4038. (2012).
180. Doeppner, TR, Traut, V, Heidenreich, A, Kaltwasser, B, Bosche, B, Bähr, M, et al. Conditioned Medium Derived from Neural Progenitor Cells Induces Long-term Post-ischemic Neuroprotection, Sustained Neurological Recovery, Neurogenesis, and Angiogenesis. *Mol Neurobiol* **54**, 1531-1540. (2017).
181. Guo, Y, Peng, Y, Zeng, H, and Chen, G. Progress in Mesenchymal Stem Cell Therapy for Ischemic Stroke. *Stem Cells International* **2021**, 9923566. (2021).
182. Kumar, A, Rawat, D, and Prasad, K. Stem Cell Therapy in Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Annals of Indian Academy of Neurology* **24**, 164-172. (2021).
183. Sunami, R, Komuro, M, Yuminamochi, T, Hoshi, K, and Hirata, S. Fetal cell microchimerism develops through the migration of fetus-derived cells to the maternal organs early after implantation. *Journal of reproductive immunology* **84**, 117-123. (2010).
184. Constantin, G, Marconi, S, Rossi, B, Angiari, S, Calderan, L, Anghileri, E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem cells* **27**, 2624-2635. (2009).
185. Cho, S-R, Kim, YR, Kang, H-S, Yim, SH, Park, C-i, Min, YH, et al. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell transplantation* **18**, 1359-1368. (2009).
186. Honmou, O, Onodera, R, Sasaki, M, Waxman, SG, and Kocsis, JD. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends in molecular medicine* **18**, 292-297. (2012).
187. Doeppner, T, and Hermann, D. Editorial: Stem cells and progenitor cells in ischemic stroke—fashion or future? *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**(2015).
188. Ryu, S, Lee, S-H, Kim, SU, and Yoon, B-W. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain. *Neural regeneration research* **11**, 298. (2016).

189. Ouyang, Q, Li, F, Xie, Y, Han, J, Zhang, Z, Feng, Z, et al. Meta-analysis of the safety and efficacy of stem cell therapies for ischemic stroke in preclinical and clinical studies. *Stem cells and development* **28**, 497-514. (2019).
190. Guillot, PV, Gotherstrom, C, Chan, J, Kurata, H, and Fisk, NM. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem cells* **25**, 646-654. (2007).



## 10.ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Dencyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
17/09/2020	55		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“Maternal Kandan İzole Edilen Fetal Mikrokimerik Hücrelerin Beyin Hasarına Etkilerinin Farede Araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	
Üye	Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	