

**T.C.  
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI STANDARTLARINDA ÜRETİLMİŞ  
GÖBEK KORDONU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN  
İLERLEYEN ALT KÜLTÜRLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ÇEŞİTLİ  
PARAMETRELERLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

**HAZAL BERİVAN SÖNMEZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
DR. ÖĞR. ÜYESİ MURAT BÜYÜKDOĞAN  
EŞ DANIŞMAN  
PROF. DR. ERDAL KARAÖZ**

**İSTANBUL – 2020**

**T.C.**  
**İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI STANDARTLARINDA ÜRETİLMİŞ  
GÖBEK KORDONU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN  
İLERLEYEN ALT KÜLTÜRLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ÇEŞİTLİ  
PARAMETRELERLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

**HAZAL BERİVAN SÖNMEZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**DR. ÖĞR. ÜYESİ MURAT BÜYÜKDOĞAN**  
**EŞ DANIŞMAN**  
**PROF. DR. ERDAL KARAÖZ**

**İSTANBUL – 2020**

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığımı tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans / Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığımı tasdik ederim.

Dr. Öğr. Üyesi. Murat BÜYÜKDOĞAN

Danışman

Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Eş Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Dr. Öğr. Üyesi Murat BÜYÜKDOĞAN

Dr. Öğr. Üyesi Meryem ALAGÖZ

İstinye Üniversitesi

İstinye Üniversitesi

Biruni Üniversitesi

**T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI**

**ETİK BEYANI**

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI STANDARTLARINDA ÜRETİLMİŞ GÖBEK KORDONU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İLERLEYEN ALT KÜLTÜRLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ÇEŞİTLİ PARAMETRELERLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

HAZAL BERİVAN SÖNMEZ

## ÖZET

# İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI STANDARTLARINDA ÜRETİLMİŞ GÖBEK KORDONU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İLERLEYEN ALT KÜLTÜRLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ÇEŞİTLİ PARAMETRELERLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

**Hazal Berivan SÖNMEZ**  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat BÜYÜKDOĞAN**  
**Eş Danışman: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ**

2020

Bu çalışmadaki amaç; Klinik uygulamalar için İyi Üretim Uygulamaları Standartlarında (Good Manufacturing Practice-GMP) üretilmiş Göbek Kordonu kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin farklı alt kültürlerinde karakteristik özellikleri incelenerek klinik kullanımda en uygun alt kültürü bulmaktır. Çalışmada İyi Üretim Uygulamaları laboratuvarında biyogüvenlik kabininde geleneksel hücre kültürü teknikleri ile Mezenkimal Kök Hücrelerin farklı alt kültürleri (P2, P4 ve P6) çoğaltılmıştır. Bu alt kültürlerin, flow sitometri yöntemi ile yüzey belirteçleri, apoptoz durumları, hücre döngüsü durumları, yarı manuel kit ile RNA izolasyonu yapılarak, termal döngü cihazında sırasıyla cDNA sentezi ve eş zamanlı kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemleriyle pluripotensi genleri, Eliza yöntemi ile telomer boyları, Karyotipleme yapılarak kromozom durumları karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarında Göbek kordonunun Wharton jeli bölgesinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamalar için kullanılmasında karşılaştırılan pasajlar (P2, P4, P6) arasında en uygunun P4 olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler: İyi Üretim Uygulamaları, Mezenkimal Kök Hücre, Wharton Jeli, Uzun Kültür**

## **ABSTRACT**

### **COMPARATIVE INVESTIGATION WITH VARIOUS PARAMETERS IN THE PROGRESSIVE SUBCULTURE OF UMBILICAL CORD DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS PRODUCED ON GOOD MANUFACTURING PRACTICE STANDARDS**

**Hazal Berivan SÖNMEZ**  
**Medical Biology and Genetics Master Program**

**Advisor: Asst. Prof. Murat BÜYÜKDOĞAN**  
**Co-Advisor: Prof. Erdal KARAÖZ**

**2020**

The purpose of this study; It is to find the most suitable subculture in clinical use by examining the characteristic features of Mesenchymal Stem Cells originating from Umbilical Cord produced in Good Manufacturing Practice (GMP) for clinical applications. Different subcultures (P2, P4 and P6) of the Mesenchymal Stem Cells were reproduced in the biosafety cabinet in the Good Manufacturing Practices laboratory with traditional cell culture techniques. These subcultures are surface markers, apoptosis states, cell cycle states, RNA isolation with the flow cytometry method, RNA isolation with semi-manual kit, pluripotency genes in the thermal loop device, and telomeres by the Eliza method, Karyotyping and chromosome states were compared. In the results of the study, it was found that P4 was the most suitable among these passages (P2, P4, P6) compared in the use of mesenchymal stem cells obtained from the Wharton jelly region of the umbilical cord for clinical applications.

**Anahtar Kelimeler: Good Manufacturing Practice, Mesenchymal Stem Cell, Wharton Jelly, Long-Term Culture**

## TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi, deney aşamaları ve yazım sürecinde bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Murat BÜYÜKDOĞAN ve Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımız boyunca bilgi, öneri ve deney malzemelerindeki yardımları ile bize destek olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilgi, öneri ve deney malzemelerindeki yardımları ile bana destek olan Liv Hospital Rejeneratif Tıp ve Kök Hücre Merkezine ve arkadaşlarım Meltem ARAZ, Sevilay Burcu ŞAHİN, Gülnaz Yıldırım KÖKEN ve Olga Nehir ÖZTEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Beni zor günlerimde yalnız bırakmayan sevgili ev arkadaşlarım Merve MEMİŞ, Kader DEMİR ve Ayşe KARTAL'a yardımları için teşekkürlerimi sunarım.

Deneyleirim boyunca her şekilde yardım ve desteklerini esirgemeyip bana en çok yoldaşlık eden bölüm arkadaşım Egzona QIPA'ya teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni dünyaya getirip yetiştiren, maddi manevi desteklerini ve sevgilerini göstermeyi hiçbir zaman esirgemeyip her zaman yanımda olduklarını hissettiren değerli ailem; annem Medine SÖNMEZ, babam Şehmuz SÖNMEZ, kardeşim Ali Baran SÖNMEZ'e, sonsuz desteğiyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan nişanlım Botan TEYMUR'a teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	viii
<b>1. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>1</b>
1.1. KÖK HÜCRE .....	1
1.2. KÖK HÜCRELERİN SINIFLANDIRILMASI.....	3
1.2.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Sınıflandırılması .....	3
1.2.2. Köken Aldığı Kaynağa Göre Sınıflandırılması.....	5
1.2.2.1 Embriyonik Kök Hücreler .....	5
1.2.2.2. Pluripotent Kök Hücreler .....	6
1.2.2.3. Yetişkin Kök Hücreler.....	7
1.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	8
1.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri .....	8
1.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüzey Belirteçleri .....	8
1.3.2.1. CD44.....	5
1.3.2.2. CD105.....	5
1.3.2.3. CD73.....	6
1.3.2.4. CD90.....	6
1.3.3. Genler.....	9
1.3.3.1. OCT-4.....	6
1.3.3.2. SOX2.....	6
1.3.3.3. ZFP42.....	7
1.3.3.4. TERT.....	7
1.4. GÖBEK KORDONU.....	11
1.4.1. Wharton Jeli.....	11
1.5. TELOMER .....	13
1.6. APOPTOZ .....	15
1.7. HÜCRE DÖNGÜSÜ.....	21
1.8. KLİNİK DENEMELERDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER.....	24
1.9. İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI .....	25
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>27</b>
2.1. EKSPLANT KÜLTÜR .....	31
2.1.1. Alt Kültür (Pasaj) .....	31
2.2. AKIM SİTOMETRİ ANALİZİ .....	32
2.3. RNA İZOLASYONU.....	32
2.4. KOMPLEMENTER DNA (CDNA) SENTEZİ.....	33
2.5. TELOMERAZ AKTİVİTESİ.....	36
2.6. KARYOTİP.....	39
2.7. AKIM SİTOMETRİ İLE APOPTOZ TAYİNİ .....	42
2.8. AKIM SİTOMETRİ İLE HÜCRE DÖNGÜSÜ .....	43
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
3.1. İNSAN GÖBEK KORDONUNDAN KÖK HÜCRE İZOLASYONU .....	44
3.2. AKIM SİTOMETRİ İLE YÜZEY BELİRTEÇ SONUÇLARI.....	46



3.3. RT-PZR SONUÇLARI .....	50
3.4. TELOMERAZ AKTİVİTESİ SONUÇLARI .....	52
3.5. KARYOTİP SONUÇLARI .....	53
3.6. AKİM SİTOMETRİ İLE FLOW SONUÇLARI .....	54
3.7. AKİM SİTOMETRİ İLE HÜCRE DÖNGÜSÜ SONUÇLARI .....	55
<b>4.TARTIŞMA.....</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>60</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Kök hücrelerde simetrik ve asimetric bölünme.....	3
Şekil 1.2: Nöral Kök hücreler örnekler alınarak yapılmış kök hücrelerin gelişim süresince geçirdiği farklılaşma potansiyellerini göstermektedir.....	5
Şekil 1.3: OCT-4 geninin kromozomal lokasyonu .....	9
Şekil 1.4: Sox2 geninin kromozomal lokasyonu.....	10
Şekil 1.5: ZFP42 geninin kromozomal.....	10
Şekil 1.6: TERT geninin kromozomal lokasyonu.....	10
Şekil 1.7: Göbek kordonunun çeşitli bölgelerini gösteren enine kesit çizimi .....	12
Şekil 1.8: B6C3F1 farelerinin pankreas kesiti. Oklarda apoptoza girmiş ve hücreler görülmektedir. Sitoplazmada kondensasyon ve küçülme, çekirdekte piknozis ve fragmanlar görülmektedir.....	17
Şekil 1.9: Apoptozun üç mekanizmasının özeti.....	19
Şekil 1.10: Bcl-2 protein ailesinin homologları. Bcl-2 subfamily; BH1, BH2, BH3 ve BH4 domainlerini içermektedir .....	20
Şekil 1.11: BCL-2 geninin kromozomal lokasyonu.....	21
Şekil 1.12: BAX geninin kromozomal lokasyonu .....	21
Şekil 1.13: Hücre döngüsünün evreleri ve kontrol .....	22
Şekil 1.14: ClinicalTrials'a kayıtlı Mezenkimal Kök Hücre temelli tedavi uygulanan yaygın hastalıklar.....	24
Şekil 2.1: Akım Sitometri yöntemi ile apoptoz analizi deney şeması.....	42
Şekil 3.1: Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin Pasaj2 morfolojik görüntüsü.....	44
Şekil 3.2: Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin Pasaj 4 morfolojik görüntüsü.....	45
Şekil 3.3: Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin Pasaj 6 morfolojik görüntüsü. ....	45
Şekil 3.4: P2 Dot plot ve histogram sonucu.....	46
Şekil 3.5: P4 Dot plot ve histogram sonucu.....	47
Şekil 3.6: P6 Dot plot ve histogram sonucu.....	47
Şekil 3.7: Üç farklı pasajda pozitif yüzey belirteçlerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 3.8: Üç farklı pasajda pluripotensi genlerinin rölâtif gen ifadelerinin karşılaştırılması.....	51
Şekil 3.9: Üç farklı pasajda apoptoz genlerinin rölâtif gen ifadelerinin karşılaştırılması .....	52
Şekil 3.10: P2 Karyotip Sonuçları.....	53
Şekil 3.11: P4 Karyotip Sonuçları.....	53
Şekil 3.12: P6 Karyotip Sonuçları.....	54
Şekil 3.13: Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6'da Apoptoz Değerlerinin Karşılaştırılması...	55
Şekil 3.14: P2, P4 ve P6'nın akım sitometri histogram görüntüleri.....	55
Şekil 3.15: P2, P4 ve P6 hücre döngüsü evrelerinin karşılaştırılması.....	56

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2. 1:</b> Çalışma süresince kullanılan kimyasal bileşenler.....	27
<b>Tablo 2. 2:</b> Çalışma süresince kullanılan cihazlar .....	30
<b>Tablo 2. 3:</b> DNA eliminasyon miksi hazırlama .....	33
<b>Tablo 2. 4:</b> Reverse-transkriptaz miksi hazırlama .....	34
<b>Tablo 2. 5:</b> RT-PZR amplifikasyon ürünü elde etme programı.....	34
<b>Tablo 2. 6:</b> Bcl-2 ve BAX genleri forward ve reverse primer dizileri .....	35
<b>Tablo 2. 7:</b> TERT, OCT4, SOX2, ZFP42 ve GAPDH genleri PCR içerikleri .....	35
<b>Tablo 2. 8:</b> Bcl-2 ve BAX genleri PCR içerikleri.....	35
<b>Tablo 2. 9:</b> RT-PZR amplifikasyon ürünü elde etme programı.....	35
<b>Tablo 2. 10:</b> TRAP Reaksiyon içeriği.....	36
<b>Tablo 2. 11:</b> PZR amplifikasyon ürünü elde etme programı .....	37
<b>Tablo 2. 12:</b> Plakaya dizme düzeni .....	38
<b>Tablo 2. 13:</b> Giemsa bantlama yöntemi .....	41
<b>Tablo 3.1:</b> P2, P4 ve P6 Akım Sitometri Pozitif Yüzey Belirteç Paneli Sonuçları.....	48
<b>Tablo 3. 2:</b> P2, P4 ve P6 Akım Sitometri Negatif Yüzey Belirteç Paneli Sonuçları .	49
<b>Tablo 3. 3:</b> Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6'da üç tekrarlı çalışılan genlerin Ct değerleri	50
<b>Tablo 3. 4:</b> Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6'da Rölatif gen ifadelerinin yüzde değerleri..	51
<b>Tablo 3. 5:</b> Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6'da rölatif telomeraz aktivitesi (RTA) sonuçları .....	52
<b>Tablo 3. 6:</b> P2, P4 ve P6 Akım Sitometri Apoptoz Sonuçları .....	54
<b>Tablo 3. 7:</b> Kontrol, P2, P4 ve P6 hücre döngüsü evrelerinin yüzde değerleri .....	56

## KISALTMA LİSTESİ

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>AIF</b>	:Apoptoz indükleyici faktör
<b>APAF-1</b>	:Apoptotik proteaz aktive eden faktör
<b>BrDU</b>	:Bromodeoksiüridin
<b>Cdna</b>	:Komplementer DNA
<b>c-Myc</b>	:MYC Proto-Oncogene
<b>EGA</b>	:Embriyoda gen aktivasyonu
<b>EKH</b>	:Embriyonik kök hücreler
<b>GAG</b>	:Glikozaminoglikan
<b>GAPDH</b>	:Gliseraldehit 2-fosfat dehidrogenaz
<b>GK-MKH</b>	:Göbek Kordonu MKH
<b>GMP</b>	:Good Manufacturing Practices
<b>GVHH</b>	:Graft versus host hastalığı
<b>HA</b>	:Hylauronik asittir
<b>HLA</b>	:İnsan lökosit antijenleri
<b>İİU</b>	:İyi İmalat Uygulamaları
<b>İHK</b>	:İç hücre kitlesi
<b>İPKH</b>	:İndüklenmiş pluripotent kök hücreler
<b>Klf4</b>	:Kruppel-like factor 4
<b>MHC</b>	:Majör doku uygunluk kompleksi
<b>MKH</b>	:Mezenkimal kök hücre
<b>Oct-4</b>	:Octamer-Binding Transcription Factor 4
<b>RTA</b>	:Rölatif Telomeraz Aktivitesini
<b>RT-PZR</b>	:Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SBK</b>	:Siklin bağımlı kinaz
<b>SMAC</b>	:İkincil miktokondri kaspaz aktivatörü
<b>SOX-2</b>	:Sex-determining Region Y-box 2
<b>SP</b>	:Serebral Palsi
<b>TERC</b>	:Telomeraz RNA bileşeni
<b>TERT</b>	:Telomeraz Ters Tranferaz
<b>TRAP</b>	:Telomer Tekrarları Çoğaltma Protokolü
<b>TNF</b>	:Tümör Nekroz Faktörü
<b>Zfp42</b>	:Zinc Finger Protein 42
<b>WJ-MKH</b>	:Wharton Jeli MKH
<b>XIAP</b>	:X-İlişkili Apoptoz İnhibitör Proteini

## **GİRİŞ**

Rejeneratif tıp yaşı, hastalık veya travmayla meydana gelen hasarlanmış doku, organ ve hücreleri iyileştirme veya yenileme potansiyeliyle son yıllarda modern tıbbın göze çarpan konu başlıklarından biri olmuştur. Organ ve dokuların nakillerinde red gerçekleşmesi, donör azlığı ve bazı immün komplikasyonlar sebebiyle meydana gelen zorlukların üstesinden, günümüze kadar elde edilmiş prelinik ve klinik çalışmaların umut vaat edici sonuçları ile rejeneratif tıp stratejileriyle gelebilmesiyle geçilecek gibi gözükmektedir. Rejeneratif tıbbın tedavi yöntemleri mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz olduğu durumlar için yardımcı olmaktadır. Hücresel tedavi ve doku mühendisliğinin amacı güvenli, etkili ve tutarlı tedavi yöntemleri sunmak olup rejeneratif tıp alanında geniş yer almaktadır. İnsan vücudu, hemen hemen her tür dokuda bulunan kök hücreler yoluyla yenilenme ve onarım sistemine sahiptir. Bu nedenle kök hücreler translasyonel tıbbın geleceği için büyük umut vaat etmektedir. (Mason & Dunnill, 2007)

### **1. GENEL BİLGİLER**

#### **1.1. KÖK HÜCRE**

1963'te ilk kez Becker ve arkadaşları ışınlanmış farelere kemik iliği nakli gerçekleştirdiler ve farelerin dalaklarında, enjekte edilen kemik iliği hücrelerinin sayısına oranla orantılı olarak nodüllerin geliştiğini fark ettiler. Her nodülün tek bir ilik hücresinden oluştuğu sonucuna vardılar (Becker, McCulloch, & Tıll, 1963). Kök hücreler vücudun tüm doku ve organların temelini oluşturarak gelişim, doku tamir süreçleri ve hastalık gelişimi gibi çeşitli görevleri vardır. Kök hücreler, çok sayıda bölünme, kendi kendini yenileyebilme ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilme yetenekleri sayesinde hasarlı hücre, organ veya dokuya eski fonksiyonunu kazandırabilme özelliğiyle rejeneratif tıpta tedavi amaçlı kullanılabilir. Kök hücrelerin işlevlerini sürdürebilmeleri ve tedavi amaçlı uygulamalarda kullanılabilmesi için hücre için gerekli optimum koşullar sağlanmalı ve üretimleri bu koşullara uygun tesislerde gerçekleştirilmelidir.

Kök hücreler, embriyonik kök hücreler (EKH), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH) ve yetişkin kök hücreler olarak üç kategoriye ayrılırlar. Doğru

koşullar altında ve doğru sinyaller verildiğinde kök hücreler felç, osteoartrit, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi yaygın hastalıklarda terapötik amaçlı kullanılabilir (Mankikar, 2010).

#### Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Kök hücreyi diğer hücrelerden ayıran en önemli iki özelliği; kendini yenileme ve farklılaşmadır. Bu iki özelliği karşılaması ile hücre ancak kök hücre özelliği kazanmaktadır.

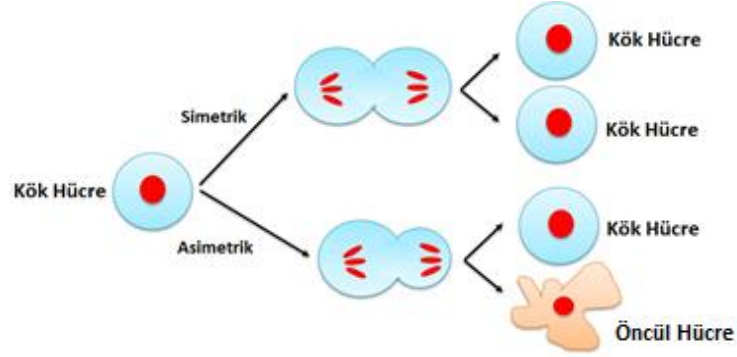
#### Kendini Yenileme

Kendini yenileme, farklılaşmamış kök durumunu koruyan biyolojik yolları ve mekanizmaları ifade eder. Ancak kök hücreler için 'sınırsız bölünme yeteneği olan hücreler' demek yanlış bir kavramdır. Kök hücreler belli sayıdaki mitoz sonunda yaşlanan ve ölüme giden hücrelerdir. Örneğin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler 40-60 kez bölündükten sonra yaşlandıkları ve diğer kök hücre özelliklerini yitirdikleri kanıtlanmıştır. Bir hücrenin kendini yenilemesi kök hücre havuzunu yenilemesi anlamına gelir. Dolayısıyla kök hücre havuzunun tükenmemesi için her bölünen kök hücrenin en az bir yedeğinin de ortaya çıkıyor olması ve bu havuza katılıyor olması gerekir. Bir kök hücre bölündüğünde en fazla iki farklı fenotipte hücre ortaya çıkar; hücrelerden birisi kök hücrenin yedeği niteliğinde kalırken diğeri bir sonraki aşama için farklılaşır (Can, 2013).

#### Bölünme

Kök hücrelerin, bir kök ve bir kök hücre olmayan/öncül hücre üretmek için asimetric olarak bölünebilme kabiliyeti kök hücre olmada belirleyici özelliklerinden biridir. Öte yandan yetişkin kök hücreler simetric olarak bölünebilmektedir.

Asimetric bölünmede, kök hücre ikiye bölünerek bir kök hücre ve bir de ileride farklılaşacak olan öncül hücre oluşturur. Bu bölünmeye bu nedenle simetric olmayan bölünme denir. Öncül hücreler ileride bölünerek farklılaşmış hücrelere dönüşebilirler. Simetric bölünmede, kök hücre asimetric bölünmedeki gibi iki hücreye bölünür fakat bu kez oluşan yavru hücrelerin ikisi de ya kök hücre ya da öncül hücredir.



**Şekil 1. 1.** Kök hücrelerde simetrik ve asimetrik bölünme (Chen, Shoudong, & Ying, 2015)

Bölünmenin hangi yönde gelişeceği şansa bağlı olmakla birlikte uygun ortalama alınır, bölünmeler sonucunda eşit sayıda kök hücre ve progenitör hücre oluştuğu görülür. Buna rağmen asimetrik bölünmelerin sonucunda dokuda kök hücre ve progenitör hücre sayıları eşit değildir; buna “popülasyon asimetrisi” denir. Ortalama olarak eşit sayıda kök hücre ve progenitör hücre oluşmuşken dokuda kök hücre ve progenitör hücre sayılarının farklı oluşunun nedeni, doku gereksinimlerine göre kök hücre ve progenitör hücre bölünme hızlarının değişebilmesidir. Genellikle dokularda progenitör hücrelerin sayısı kök hücrelerden çok daha fazladır. Memelilerin kendini yenileyebilen dokularının çoğu ikinci tip bölünme yapar ve popülasyon asimetrisi gösterir (Sağsöz & Ketani, 2008; Shahriyari & Komarova, 2013.).

## 1.2. KÖK HÜCRELERİN SINIFLANDIRILMASI

### 1.2.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Sınıflandırılması

#### 1.2.1.1. Totipotent

Döllenmiş yumurtaya Latince tam, bütün anlamına gelen ‘totus’ tan türeyen totipotent denir çünkü uterusda bulunan embriyo bu aşamada tüm organizmayı oluşturabilecek potansiyele sahiptir. İnsanlar dahil yetişkin memeliler, 200'den fazla hücre tipinden oluşur. Bunlar arasında sinir hücreleri, kas hücreleri, cilt hücreleri, kan hücreleri, kemik hücreleri ve kıkırdak hücreleri bulunur. Embriyonik gelişim için

elzem olan diğer hücreler ekstraembriyonik dokuları, plasenta ve göbek kordonunu içerir. Bütün bu hücreler zigottan üretilir.

#### *1.2.1.2. Pluripotent*

Pluripotent terimi, Latince birkaç veya daha fazla anlamına gelen ‘pluri’den türemiş olup Fertilizasyondan sonra 4.-5. günde meydana gelen blastokist evresindeki iç hücre katmanı üç embriyonik katman olan mezoderm, endoderm ve ektoderme farklılaşacaktır buradan köken alan kök hücrelere Pluripotent kök hücreler denir. Bu üç embriyonik katman, vücudun tüm hücrelerinin embriyonik kaynağıdır, vücudu oluşturan tüm farklı tipteki özel hücre türleri, bu embriyonik soylardan köken alır.

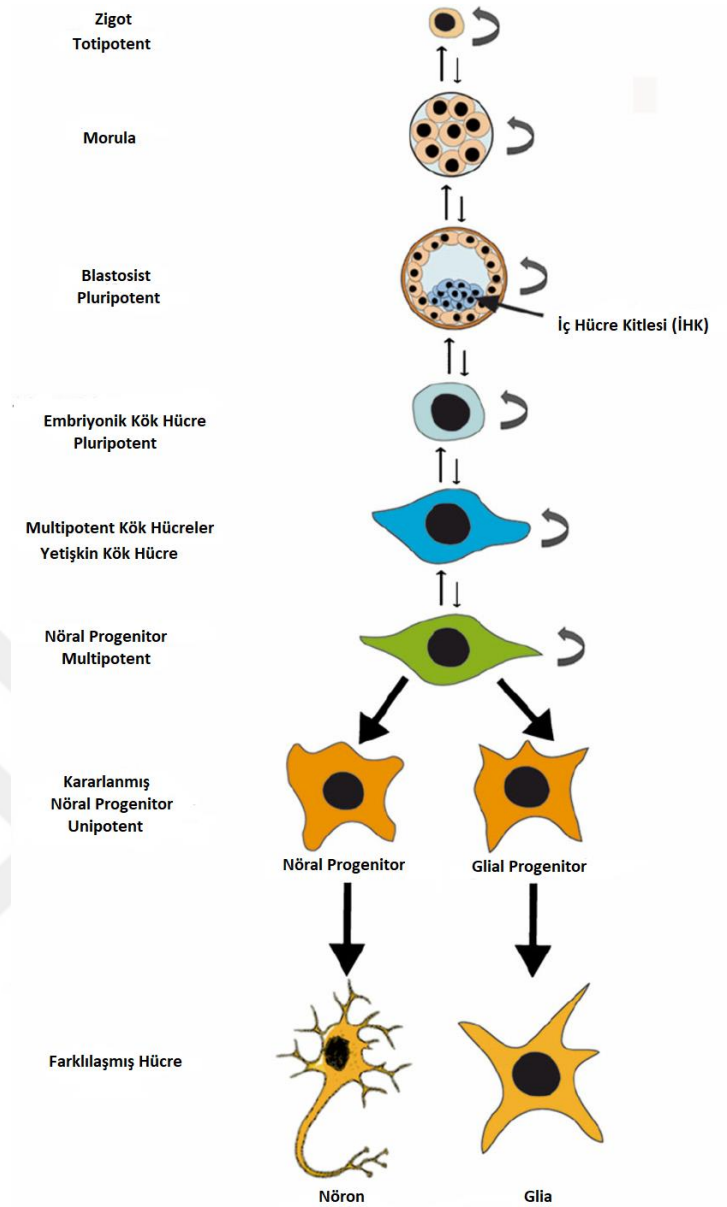
#### *1.2.1.3. Multipotent*

Multipotent kök hücreler, hematopoietik, mezenkimal ve nöral kök hücreler dahil olmak üzere yetişkin kök hücreleri olarak sınıflandırılan birçok hücre tipini içerir. Multipotent kök hücreler, birçok durumda birbirlerinden kolayca ayırt edilebilen, ancak diğer farklılaşmış hücre tiplerinden benzersiz bir şekilde tanımlanamayan çeşitli farklı morfolojiler sergiler. İn vitro ortamda sınırlı bir çoğalma kapasitesine sahiptir.

#### *1.2.1.4. Unipotent*

Unipotent terimi, Latince ‘tek’ anlamına gelen ‘unus’ kelimesinden türemiş olup sadece bir çeşit hücre grubuna farklılaşabilmektedirler, aynı zamanda bir kök hücre olabilmesi için gereken kendini yenileme özelliğine sahiptir. Doku tamirinde de rol oynarlar.





**Şekil 1.2.** Nöral Kök hücreler örnekler alınarak yapılmış kök hücrelerin gelişim süresince geçirdiği farklılaşma potansiyellerini göstermektedir (Sandner, ve diğerleri, 2012)

### 1.2.2. Köken Aldığı Kaynağa Göre Sınıflandırılması

#### 1.2.2.1 Embriyonik Kök Hücreler

Fertilizasyon sonucu oluşan zigot mitoz bölünmeler geçirerek ‘yarıklanma’ gerçekleştirir. Her bir bölünme ile oluşan hücreye blastomer adı verilir. Blastomerler totipotent olup tek başına bir organizmayı oluşturabilirler. Zigotun geçirdiği ilk 3 mitoz bölünme simetrik olup oluşan her bir blastomer boyut ve morfolojik olarak birbirinin aynısıdır. 8 hücreleri aşamada totipotent özelliği biterek embriyoda kompaksiyon,

polarizasyon ve asimetrik hücre bölünmesi olarak üç önemli morfolojik değişiklik meydana gelir. Fertilizasyonun 4. Gününde blastomerden morula evresine geçerek (8-16 hücre) asimetrik hücre bölünmesi meydana gelir. Polar ve apolar hücreler ortaya çıkar. Polar hücreler, trofoektodermi oluşturmak üzere dış kısımda ve apolar hücreler ise embriyoyu oluşturacak olan iç hücre kitlesi (İHK)'ne farklılaşmak üzere iç kısımda yer alır (Yılmaz & Tekmen, 2018). Embriyogenez sırasında, İHK'den epiblast ve hipoblast olmak üzere iki farklı hücre tipi gelişir. Hipoblast, yolk kesesine dönüşürken, Epiblast tüm dokuların köken alacağı ektoderm, endoderm ve mezoderme farklılaşır. Embriyonik kök hücreler embriyodaki İHK'dan elde edilir.

Embriyonik kök hücreler farklılaşmaya yol açan genlerin baskılanmasını sağlayan *Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü (Oct-4)* ve *SRY İlişkili HMG Box Geni (Sox2)* gibi temel transkripsiyon faktörlerini ifade ederek pluripotensi özelliğini korur. Ancak hem etik koşullar hem de vücutta teratoma oluşturma potansiyelleri nedeniyle klinik uygulamalarda yetişkin kök hücrelere göre daha dezavantajlılardır (Holden, 2007).

#### 1.2.2.2. Pluripotent Kök Hücreler

Son zamanlarda, embriyonik kök hücrelere benzer özelliklere sahip üçüncü tip bir kök hücre ortaya çıkmıştır. Bilim insanları, belirli genleri somatik hücrelerde kullanıp bu hücreleri yeniden programlayarak "pluripotent" evreye getirmişlerdir. iPKH'ler, yetişkin kök hücrelerinden dört transkripsiyon faktörünün *Octamer-Binding Transcription Factor 4 (Oct-4)*, *Sex-determining Region Y-box 2 (SOX-2)*, *Kruppel-like factor 4 (Klf4)* ve *MYC Proto-Oncogene (c-MYC)* aşırı ekspresyonu ile üretilir. Hücresel seviyedeki iPKH'ler, kendilerini yenileme, farklılaşma potansiyeli ve kendilerine benzer hücreler üretme kabiliyetine sahip olduklarından EKH'lere neredeyse benzer. Bu bulgulardan sonra, iki grup Takahashi ve arkadaşları ve Nakagawa ve arkadaşları, iPKH'leri yetişkin insan fibroblastlarından ürettir. Her ne kadar iPKH'ler hücre tedavisi için büyük potansiyele sahip olsalarda, genomik stabiliteyi hala sorgulanabilir.

### 1.2.2.3. Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin vücudunda kemik iliği veya beyin gibi farklılaşmış dokulardaki farklılaşmamış hücelere yetişkin veya mezenkimal kök hücreler denir. ‘Mezenkim’ terimi epiblastın farklılaşmasından başlayarak embriyonun gelişmesinde ve daha sonra fetüsün yaşamında önemli yer tutan, gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen isimdir. Bu dokuyu oluşturan hücreler fenotipik olarak çevresindeki gevşek yapılı ve bol sulu hücre dışı matriks ortamı içinde nispeten serbest hareket eden çok yüzlü, ince uzun uzantılı hücrelerdir (Can, 2013). Canlı bir organizmada yetişkin kök hücrelerin birincil rolleri, buldukları dokuyu korumak ve onarmaktır. Bu hücreler yetişkin multipotent kök hücreler olup daha sınırlı sayıda soya farklılaşabilme ve daha sınırlı sayıda bölünebilme potansiyelleri vardır. Yetişkin kök hücre kaynağı olarak kemik iliği, adipoz doku, kan, iskelet kası, diş pulpası, deri, merkezi sinir sistemi ve göbek kordonu verilebilir (Bajada, Mazakova, Richardson, & Ashammakhi, 2008). Bu hücreler birçok dokuda olabilmektedir ve köken aldığı dokuların hücrelerine farklılaşabilirken plastisite özellikleri sayesinde diğer dokuların karakteristik hücrelerine de farklılaşabilmektedirler. Yetişkin kök hücreler buldukları bölgede yeterli ve uygun miktarda faktör var ise; nöronlar gibi ektodermal, hepatositler gibi endodermal, kondrosit, osteosit ve adipositler gibi mezodermal soylara farklılaşabilmektedirler (Smith, Neaves, Teitelbaum, Prentice, & Tarne, 2007).

In vitro ortamda nöral öncül hücrelerle füzyon yaparlarken in vivo ortamda karaciğerde hepatositlerle, kalpte kardiyak kas hücreleriyle füzyon yaparlar bunlara ek olarak immun cevabı düzenleme özellikleri ile de hücresel tedavide en çok kullanılan hücrelerdir (Kalaszczynska & Ferdyn, 2015).

Klinik kullanımda mezenkimal kök hücre (MKH) uygulaması yapıldığında beklentiler şu şekildedir;

- i. Direkt parakrin etkilerle doku yenilenmesi/tamiri
- ii. immun düzenleme
- iii. hücre engrafmanında destek.

### 1.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

MKH'leri in vitro ortamda tanımlayabilmek için Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin International Society for Cellular Therapy (ISCT) üç minimum kriteri vardır;

- i. Kültür kabına yapışma,
- ii. Yüzeylerinde spesifik CD105, CD73 ve CD90 markerlarını ifade etmeli CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79alpha veya CD19 ve HLA-DR markerlarını ifade etmemelidir,
- iii. İn vitro koşullarda osteoblast, kondroblast ve adipositlere farklılaşabilmelidir (Dominici, ve diğerleri, 2006).

#### 1.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri

Kültür ortamındaki MKH'in morfolojileri, ışık veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde fuziform şekilli, iğ sekinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görülürler. Morfolojik özellikleri fibroblastlara benzemekle birlikte en önemli farkları çekirdek yerleşiminin fibroblastlarda asimetrik olmasına karşın bu hücrelerde simetrik olmasıdır.

#### 1.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüzey Belirteçleri

##### 1.3.2.1. CD44

CD44, yaygın olarak bulunan çok yapılı ve çok fonksiyonlu bir hücre yüzey glikoproteini olup hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisi kurmasının yanı sıra hücre göçü ve hücre yerleşmesinde rolü vardır. Temel ligandı hylauronik asittir (HA).

##### 1.3.2.2. CD105

Endoglin olarak da bilinen CD105, TGF-beta süper ailesi ligandları için reseptör olarak işlev gören bir tip I membran glikoproteinidir. Adından da anlaşılacağı gibi endoglin, vasküler endotel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Adipoz dokudan gelen MKH'lerin yeni izole edildiklerinde düşük seviyelerde CD105 eksprese ettiği, ancak alt kültürleri yapıldıkça artan bir şekilde CD105 + haline geldiği gösterilmiştir.

### 1.3.2.3. CD73

CD73, hücre dışı adenosin monofosfatını adenosine dönüştüren bir ecto-5'-nükleotidazdır. Lenfositler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilir.

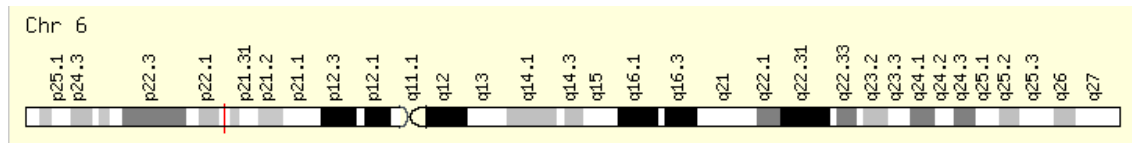
### 1.3.2.4. CD90

Thy1 olarak da bilinen CD90, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine katılan glikozilfosfatidilinozitol bağlı bir proteindir. Türler arasında değişmekle birlikte, endotel hücrelerinde, hematopoetik kök hücrelerde, lenfositlerde, fibroblastlarda ve nöronlarda CD90 ekspresyonu tanımlanmıştır (Musial-Wysocka, Kot, Sulkowski, Badyra, & Majka, 2019).

## 1.3.3. Genler

### 1.3.3.1. Oct-4

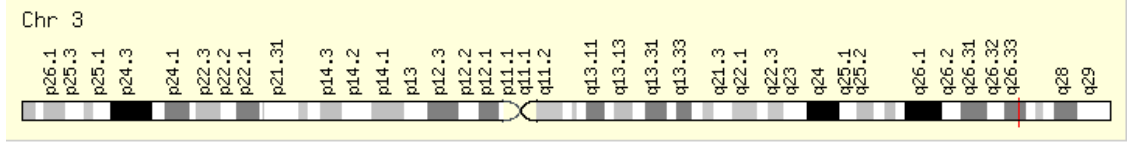
*Oct-4* temel olarak, insanda 6. Kromozomun uzun kolunda yer alır. DNA'da ATGCAAT dizisine bağlanarak diğer genlerin ekspresyonunun düzenlenmesiyle pluripotensinin ve kök hücrelerin kendi kendini yenileme süreçlerinde anahtar rol oynadığı erken embriyolarda bulunur. *Oct4* geninin ifadesi 4-8 hücreli 'embriyoda gen aktivasyonu' (EGA) evresine kadar düşük düzeyde tutulur. EGA ile birlikte *Oct4* ifadesi artar ve bu artış embriyonun tıkiızlaşma evresine kadar sürer. *Oct4* mezenkimal kök hücrelerde pluripotensi markerı olduğu bilinmektedir (Han, ve diğerleri, 2014).



Şekil 1.3: *OCT-4* geninin kromozomal lokasyonu (*POU5F1* Gene, tarih yok)

### 1.3.3.2. SOX-2

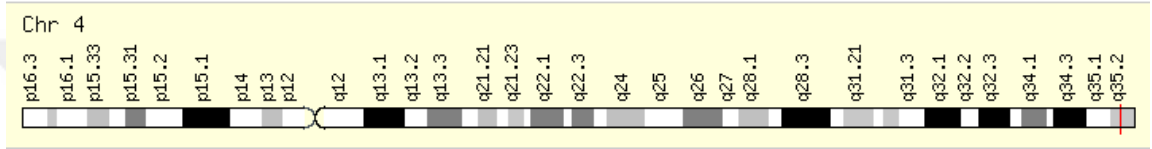
SoxB1 transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan cinsiyet belirleyici bölge *Sox2*, pluripotent kök hücrelerde önemli bir transkripsiyonel regülatördür. *Oct4* ve *Nanog* geni ile birlikte, embriyonik kök hücrelerde gen ekspresyonunu kontrol eder ve pluripotensi özelliklerini korurlar. 3. Kromozomun uzun kolunda yer alır. DNA'daki ATTGTT motifine bağlanır (Han, ve diğerleri, 2014).



**Şekil 1.4.** *Sox2* geninin kromozomal lokasyonu (*SOX2* Gene, tarih yok)

#### 1.3.3.3. Zinc Finger Protein 42 (*Zfp42*)

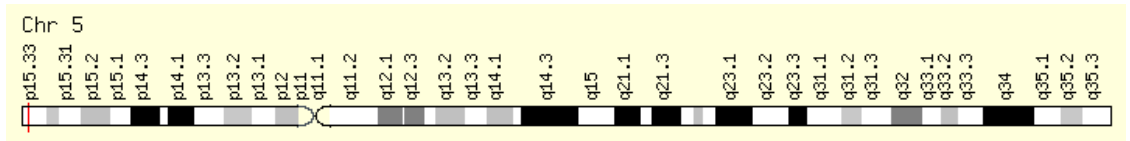
*ZFP42* geni tarafından kodlanan 310 aminoasit uzunluğundaki Rex1 proteini bilinen bir pluripotensi belirteçidir. 4. Kromozomun uzun kolunda yer alır. Farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde bulunur. Pluripotensi belirteci olmasının yanı sıra *Oct4*'ün hedef geni olup EKH'lerin kendini yenilemesiyle pluripotensinin sürdürülebilirliği içinde gereklidir (Can, 2013).



**Şekil 1.5.** *ZFP42* geninin kromozomal (*ZFP42* Gene, tarih yok)

#### 1.3.3.4. Telomeraz Ters Tranferaz (*TERT*)

*TERT* geni 5. Kromozomun kısa kolunda bulunur. Bu genin kodladığı proteininin ürünü olan telomeraz, enzim aktivitesi ile kromozomların ucuna DNA eklemesi yapar. Telomeraz RNA'sı tek zincirli DNA'yı 3' ucundan uzatır. Telomeraz enziminin katalitik alt birimi, ters bir transkripsiyon işlemi yürütmektedir. İnsanda telomeraz enziminin etkinliği gamet öncüsü hücrelerde, embriyonik kök hücrelerde ve malign hücrelerde çok yüksektir.



**Şekil 1.6.** *TERT* geninin kromozomal lokasyonu (*TERT* Gene, tarih yok)

#### 1.4. GÖBEK KORDONU

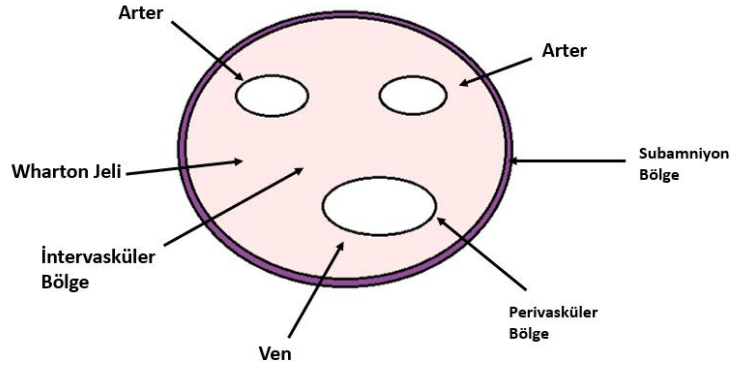
İnsanlarda boyu 40-60 cm, çevresi 1-2 cm ve yaklaşık 40 gram ağırlığında olan göbek kordonu plasentalı memelilerde, gestasyonun 5.haftasında blastokistin endometriyuma bağlanmasıyla ve mezoderm dokusunun ileri gelişmesiyle ortaya çıkar ve fetüsü plasentaya bağlayan yapıdır. Diğer dokuların aksine göbek kordonunda organların etrafını saran fibröz bağ doku olan tunica adventitia yoktur sadece vasküler desteği sağlayan ve kasılma fonksiyonlarını yapan tunica intima ve tunica media vardır. Göbek kordonu içerisindeki “Wharton Jeli” adı verilen müköz, proteoglikanlarca ve kollajence zengin matriks, jelimsi yapısıyla etrafları sarılı olan iki arter ve bir ven damarları ile fetüsün beslenmesini ve oksijen alışverişini sağlar. Wharton jeli içerisinde bulunan damarların bükülmesini, baskılanmasını ve kendi etrafında dönmesini önleyerek anne ile fetus arasındaki dolaşımın devamlılığını sağlar. Kordonun çevresi amniyon zarından köken alan epitel ile kaplıdır (Ding, Chang, Shyu, & Lin, 2015). Mezoderm kaynaklı bir doku olması nedeniyle göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücreler osteoblast, adipoblast ve kondroblasta farklılaşabilme özellikleri bulunmaktadır (Can, 2013).

Klinik uygulamalarda kemik iliğinden elde edilen MKH’lerin izolasyonu kompleks ve acı verici olduğu için doğum sonrasında tıbbi atık olarak atılan göbek kordonu kullanımı invaziv bir işlem içermediğinden göbek kordonu kullanmak daha faydalıdır.

##### 1.4.1. Wharton Jeli

Wharton jeli genel olarak iki arter ve bir venden oluşan kordon damarlarını saran kendisi de tek katlı amniyotik epitel ile çevrili, çok miktarda miyofibroblast içeren müköz bağ dokusudur. Histolojik olarak 3 bölgeye ayrılmaktadır:

- i) Subamniyon bölge; fibroblast benzeri hücreleri içermektedir.
- ii) Intervasküler bölge; kollajen I’ce zengin ve Wharton Jeli MKH’lerin (WJ-MKH) yoğun olarak bulunduğu bölgedir.
- iii) Perivasküler bölge; damarların etrafını saran bölgedir (Paladino, Rodrigues, Silva, & Goldberg, 2019).



**Şekil 1.7.** Göbek kordonunun çeşitli bölgelerini gösteren enine kesit çizimi

### Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Düzenleyici Etkisi

İmmün sistemin esas görevi, organizmayı yabancı moleküllere ve mikroorganizmalara karşı savunmada onları tanımak ve çeşitli etki mekanizmalarıyla cevap vermektir. İmmün tanımda yabancı antijenlerle vücudun kendi antijenlerinden ayırt etme görevi Majör doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülleri ya da diğer adıyla insan lökosit antijenleri (HLA) adı verilen ve T hücre aracılı immün yanıtının yönünü belirleyen antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunan moleküllere düşmektedir. MHC molekülleri MHC I (HLA- A, B, C) ve MHC II (HLA-DP, DR, DQ) molekülleri olmak üzere iki gruba ayrılır. Bunlar yapıca birbirine çok benzer. MHC I moleküllerinin görevi virüsler, intrasitoplazmik antijenleri CD8+ sitotoksik T hücrelerine sunmaktır. MHC II molekülleri ise endositozla alınan bakterileri CD4+ yardımcı T hücrelerine sunar (Yalçın, 2013).

MKH'ler MHC sınıf I moleküllerinden HLA-A, HLA-B ve HLA-C'yi düşük seviyede ifade ederler, MHC sınıf II molleküllerini ifade etmezler. Gebelikte fetüs ile anne arasında maternal immün cevap oluşmaması için ifade edilen HLA-G6'yı da ifade ederek WJ-MKH'ler bu özellikleri ile onlara diğer kök hücrelerde bulunmayan bir immunsupresyon özelliği kazandırır (Marino, ve diğerleri, 2019).



## Wharton Jeli Mezenkimal Kök Hücrelerinin Fenotipik Karakterizasyonu

MKH'ler neredeyse tüm organların bağ dokularında 'yedek' hücreler olarak bulunduğu için doğası gereği yapışma özellikleri sayesinde kolaylıkla elde edilebilmekte ve spesifik yüzey belirteçleri sayesinde karakterizasyonları yapılabilmektedir. 2006'da ISCT'nin yayınladığı raporda mezenkimal kök hücreler için gereken minimum kriterlerini WJ-MKH'lerin sağladığını biliyoruz. Miyofibroblast özelliğine sahip olmaları nedeniyle hücre iskeleti belirteçleri olan alfa-düz aktin (SMA), vimentin ve F-aktini ifade ederler. Yüksek miktarda %70'i HA'ten oluşan glizomanioglikan (GAG) içerir ve bu sayede göbek kordonu fetüste en yüksek HA içeren doku olma özelliği kazanır ve HA reseptörü olan CD44'ü yüksek oranda ifade ederler.

Erken pasajlarda *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *Rex1*, *LIN28* gibi bilinen embriyonik kök hücrelerdeki pluripotensi belirteçlerini de ifade ederler ancak teratom oluşturma özellikleri yoktur. Bu ilkel özellikleri ile göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücreler yetişkin kök hücreler ile embriyonik kök hücreler arasında yer alır. In vitroda kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı MKH'lere kıyasla WJ-MKH'in en büyük avantajı daha yüksek kendini yenileme kapasitesi ile çok sayıda hücreye daha kısa sürede erişilebilmesi olsa da ilerleyen alt kültürlerde azalmış telomeraz aktivitesiyle hücre döngüsü tutukluğuna girerek kök hücre fonksiyonelliklerini kaybetmektedirler (Paladino, Rodrigues, Silva, & Goldberg, 2019).

### 1.5. TELOMER

Ökaryotik lineer kromozomların 3' uçlarında 'telomer' adı verilen telomerik DNA dizileri bulunur. Telomerler kromozom uçlarını ekzonukleaz aktiviteden, uç-uca füzyondan ve replikasyon sonlanması problemi nedeniyle kodlama yapan dizilerin kaybolmasından korur. Birçok ökaryotun telomer bölgesindeki DNA dizisi benzerdir. İnsanlarda telomer tekrar dizisi Guanince (G) zengin TTAGGG dizisidir (Counter, ve diğerleri, 1992). Replikasyon çatalı, kromozomun ucuna doğru yaklaşırken öncü (leading) zincirin sentezi DNA kalıbının ucu yönünde sürer ve bir yavru DNA çifti zinciri tamamlanır. Oysa artçı (lagging) zincirinin kalıbı kesintili olarak kopyalandığı için karşılığı tam olmayan bir kopyalama meydana gelir.

Artçı zincirin 3' ucu, kalıbın 5' ucundan 12-16 nükleotid daha uzundur. 3' ucunun uzun olması tekrar eden telomer dizileridir. Bu diziler yüzlerce-binlerce kez tekrarlanır ve bu şekilde birkaç bin kilobaz uzunluğuna erişip tek iplikli DNA olarak sonlanır. Telomer bölgesi her DNA replikasyonu sonucunda bir miktar (<150 kilobaz) kısılır. Bunun nedeni artçı zincirin kalıbı için DNA polimerazlar DNA zincirini 3' ucundan uzattığında bir RNA primeri kullanması gerektiğinden kaynaklanır. Öncelikle, primaz enzimi bir RNA primerinin sentezlenmesini sağlar. İşlem sonunda RNA primeri ortadan kaldırıldığında karşılığı olmayan tek bir zincir parçası ortaya çıkar. Bu süreç her hücre bölünmesinde süregelir ve her bölünme sonunda telomer bölgeleri kısılır. Hücrenin çoğalma sayısı ile doğrudan ilişkili olan bu durum, telomerlerin belli bir kısalığa ulaştığı zaman hücre çoğalmasının durmasına neden olur. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro yapılan uzun alt kültürlerinde telomer boyunda kısalma buna bağlı olarak hücre yaşlanma meydana gelmektedir. Bu durum 'telomeraz ters transkriptaz (TERT)' adı verilen ribonükleoprotein yapısındaki enzim sayesinde giderilmektedir (Can, 2013).

Telomeraz, *TERT* geni tarafından kodlanan bir revers transkriptaz proteini olup telomeraz RNA bileşeni (TERC) ve telomer ters transkriptaz (TERT) bileşenlerinden meydana gelir. Telomeraz, telomerik tekrarlara tamamlayıcısı olan kendi kalıp RNA'sını taşımasıyla bir DNA kalıbı olmadan telomerleri korumaktadır. Telomerazın eksikliği DNA polimerazın zinciri 5' ucundan uzatamaması nedeniyle bölünen insan hücrelerinde ilerleyen telomer kaybına neden olur telomer boyu kritik aşamaya kadar kısaldığı zaman fonksiyonlarını yitirmekte ve böylece DNA hasar cevabı yolağı aktive olarak hücreler 'replikatif senesens' adı verilen kalıcı büyüme tutukluğuna girerler. Senesens DNA replikasyonu sonucu genetik mutasyonları ve sınırsız çoğalmayı engelleyerek kansere karşı bariyer oluşturur. Yüksek telomeraz aktiviteleri nedeniyle sınırsız çoğalma telomer fonksiyonlarını sürdürebilmelerini sağlayan germ hücreleri, embriyonik kök hücreler ve malign hücrelere özgü meydana gelen bir olaydır. İnsan kemik iliği kaynaklı MKH'lerde telomerazı kodlayan *TERT* geninin ektopik olarak ifadesi arttırıldığında telomer kısalmasına bağlı olarak meydana gelen hücre yaşlanmanın ortadan kalktığı litimitsiz çoğalma kapasitesi meydana geldiği gözlenmiştir (Simonsen, ve diğerleri, 2002).

Genel anlamda somatik hücreler telomeraz aktivitesi göstermezler ancak bazı deri ve hematopoietik yetişkin kök hücrelerde düşük seviyede telomeraz aktivitesi görülmüştür (Rudolph, 2008). Telomerazın aktivitesi somatik hücrelerde dengede durmak zorundadır. Klinik uygulamalar için çok sayıda elde edilmek istenen bu nedenle alt kültürleri yapılan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin bu alt kültürler boyunca telomeraz aktivitesi ölçülmelidir çünkü tümerogenez ile artmış telomeraz aktivitesi arasında korelasyon olduğu görülmektedir (Kassem, 2004).

#### 1.6. APOPTOZ

Makroskobik olanından mikroskobik olanına kadar her canlının bir yaşam ve ölüm döngüsü vardır. 1972 yılında ilk kez Kerr ve Wyllie tarafından kullanılan 'apoptoz' terimi hücrenin intiharı da denilen programlı hücre ölümünü ifade etmektedir (Kerr, Currie, & Wyllie, 1972). Canlıların en küçük birimi olan hücrede patolojik ya da fizyolojik olmak üzere iki şekilde ölüm gerçekleşir. Apoptoz bunlardan fizyolojik olanı iken nekroz patolojik olanıdır. Nekroz hücrenin kendi mekanizmasıyla oluşan bir olay değil mekanik travma veya ani ağır iskemik durumlar gibi olaylarla meydana gelmektedir (Öniz, 2004). Apoptoz ise hücreler arası yaşam ve ölüm dengesini kurmaktadır bu nedenle daha kompleks ve karmaşık bir süreçtir. Apoptoz normal gelişim ve yaşlanma sırasında dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Yetişkin bir insan vücudunda her gün 10 milyar hücre apoptoz ile ortadan kaldırılmaktadır. Ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında, hücrelerin hastalık veya zararlı maddelerden zarar görmesi gibi bir savunma mekanizması olarak da görev almaktadır (Norbury & Hickson, 2001).

#### Apoptozun Etkili Olduğu Durumlar

1. Embriyonik dönemde fetusun cinsel gelişimi sırasında duktus sisteminin gerilemesi, memeli üyelerinin oluşumunda el ve ayak parmak taslaklarının arasındaki ara dokunun ortadan kalkması.
2. Postnatal hayatta kemik iliğinde kan üretiminin homeostazisi için  $5 \times 10^{11}$  hücrenin uzaklaştırılması, menstruasyon döngüsünde endometrium tabakasının dökülmesi, timusta olgunlaşan T lenfositlerinden etkisiz olanları vücutta immun reaksiyon oluşturabileceği için etkisiz hale getirilmesi, epidermal tabakanın ana hücresi olan keratinositler apoptoz yoluyla ölümlerini gerçekleştirir.
3. Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyarıcı ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarana yanıt olarak mutlaka

ölmeyecektir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar bazı hücrelerde (örn. Timositler) apoptotik ölüme yol açabilir, ancak diğer hücreler bundan etkilenmeyebilir (Coşkun & Özgür, 2011). Işık ve elektron mikroskopisinde apoptoz sırasında çeşitli değişiklikler saptanmıştır. Bunlar apoptozun ayrıcalık özellikleridir;

➤ Apoptozun erken safhalarında hücre iskeleti filamentlerini oluşturan fibrillerde kopma,

➤ Hücre sitoplazmasında su kaybederek yoğunlaşma,

➤ Çekirdekte piknozis, kromatin kondensasyonunun (yoğunlaşma) bir sonucudur ve apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin boyamayla yapılan histolojik incelemelerde apoptotik hücre sitoplazması koyu pembe ve çekirdek koyu mor gözüktür.

➤ Endonukleazların etkisiyle DNA'da parçalarına ayrılma,

➤ Hücre içerisindeki organellerde parçalanma ve parçalanmış çekirdek materyali ve organellerin kesecikler içine alınarak apoptotik cisimcikler oluşturması,

➤ Hücre plazma membranında bleb oluşumu ve komşu hücrelerden ayrılma meydana gelir.

Apoptozda;

1. Apoptozun meydana geldiği hücreler içeriklerini hücre dışına bırakmazlar.

2. İkincil bir nekrozu önlemek adına etraflarındaki makrofajlar tarafından hızla fagosite edilir.

3. Apoptotik hücreleri fagosite eden hücreler ortama anti enflamatuvar sitokinleri salgılamazlar bu nedenlerle apoptozda enflamatuvar bir cevap oluşmaz.

Apoptozu girmiş hücreler bir dizi biyokimyasal değişiklikte geçirirler. Bunlar;

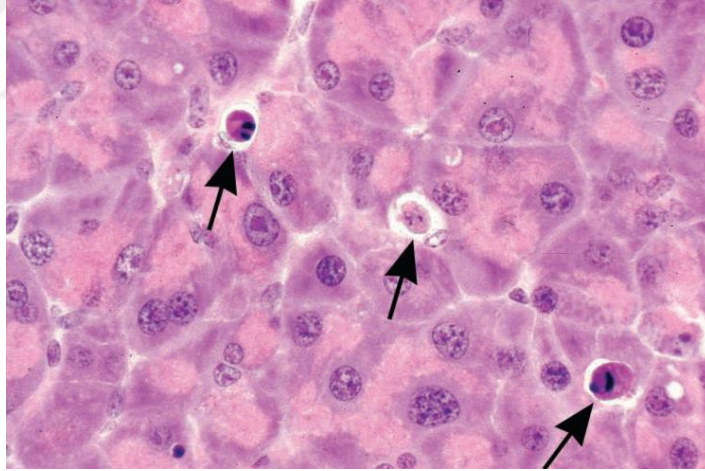
➤ Kaspaz ailesi adını 'Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE'dan almaktadır. Sistein proteazlar olup aspartik asitten sonra bulunan peptid bağımlı kırarlar. Kaspazlar çoğu hücrede inaktif proenzim formunda ifade edilmektedir ve bir kez aktive olduklarında diğer prokaspazları aktive ederek proteaz kaskadını başlatırlar. Bazı kaspazlar bir uyarı olmadan birikerek kendi kendilerini aktif hale getirirler. Bir kaspazın diğer kaspazı aktive ettiği bu proteolitik kaskada hücreler artık ölüme kararlanır ve apoptotik diğer sinyal yolları da aktive olarak hücrenin hızla ölümü gerçekleşir.

Apoptozda görev alan kaspazlar:

Başlangıç kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9 ve 10'dur.

Efektör kaspazlar: Kaspaz 3, 6 ve 7'dir.

- Doku transglutaminazların (glutamin ve lizin aminoasitleri arasında çapraz bağların oluşumunu katalize eden enzim) aktivasyonu ve ekspresyonu aracılığıyla gerçekleşen proteinlerin çapraz bağlanması apoptozun bir diğer karakteristik özelliğidir.  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  bağımlı endonukleazlarla DNA parçalanır bu da 180-200 baz çiftlik DNA parçaları oluşumuna neden olur.
- Bir diğer meydana gelen biyokimyasal değişiklik apoptotik hücrelerin yakınındaki fagositik hücreler tarafından tanınabilirlik için yüzeyinde geçirdiği bir dizi değişikliktir. Bunu yapabilmek için çift katlı lipit tabakasının içe dönük kısmında bulunan fosfotidilserin flip-flop hareketiyle (hücre membranında bulunan lipitlerin membranın bir yüzünden diğerine hareket etmesi) membranın dışına döner. Artık apoptotik hücrenin dış yüzeyinde bulunan fosfotidilserin fagositoz yapan hücreler için bir belirteç görevi görür. Böylece hızla fagosite edilen apoptotik hücre ortamda herhangi bir enflamatuvar olay meydana getirmez. Annexin V rekombinant fosfotidilserin bağlayan protein olup fosfotidilserin rezidülerine bağlanarak apoptozu saptama belirteci olarak kullanılır (Elmore, 2007).



**Şekil 1.8.** B6C3F1 farelerinin pankreas kesiti. Oklarda apoptoza girmiş ve hücreler görülmektedir. Sitoplazmada kondensasyon ve küçülme, çekirdekte piknozis ve fragmanlar görülmektedir (Elmore, 2007)

## Apoptoz Tipleri ve Sınıflandırması

### ➤ Dış Yolak

Bu yolak çift katlı membranda bulunan reseptöre ligandının bağlanmasıyla aktive olur. Bu reseptörlerden en bilineni Tümör Nekroz Faktörü (TNF) reseptör geni süperailisidir. TNF reseptör ailesinin üyelerinde membranın dış yüzeyinde sistince zengin domainler vardır ve hücre içerisine bakan sitoplazmik tarafında 80 aminoasitlik ‘ölüm domaini(adaptör)’ adı verilen domain bulunmaktadır. Bu ölüm domaini dışarıdan gelen ölüm sinyalinin hücre içerisine iletmekte oldukça kritik bir role sahiptir. Apoptozun reseptör ligand modelinde; reseptöre ligandın bağlanmasıyla sitoplazmada bulunan domaine adaptör proteinlerinin bağlanması gerçekleşir. Ölüm domaini ile adaptör proteinlerin dimerizasyonu ile kaspaz sistemi aktive edilir ve hücre ölümü gerçekleştirilir (Elmore, 2007).

### ➤ Perforin/Granzim Yolağı

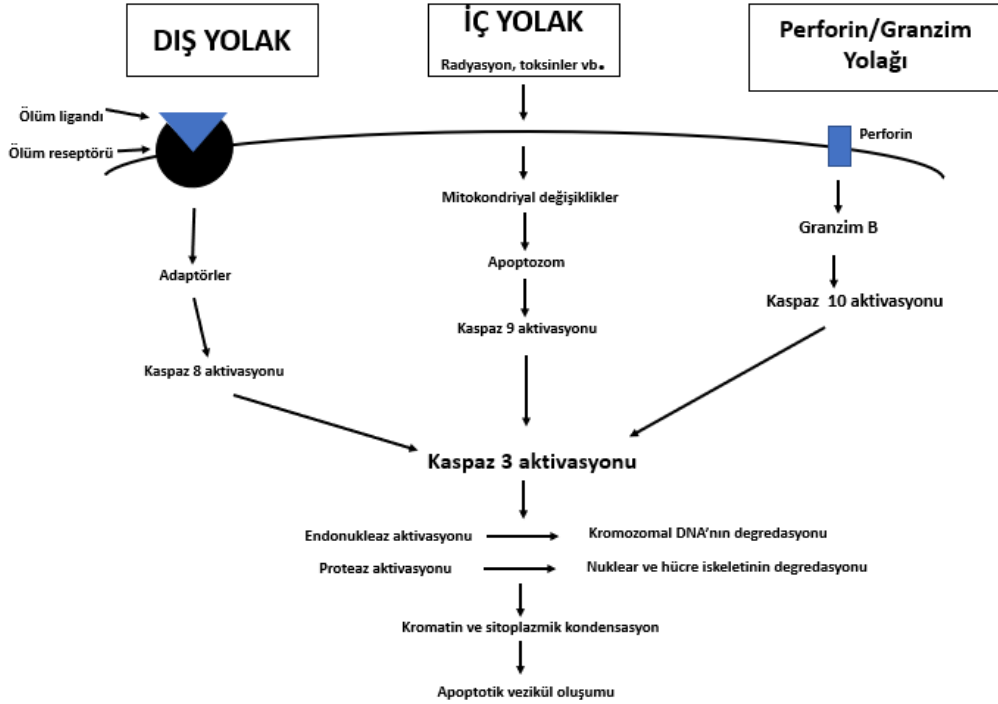
Bu yolda sitotoksik T hücreleri ve doğal katil hücreleri apoptoza yol açmaktadır. Perforin, PRF-1 geni tarafından kodlanıyor olup hedef hücrenin membranını por oluşumundan sorumlu bir glikoproteindir. Hücre membranına fosfolipidler aracılığıyla tutunarak membranda  $Ca^{2+}$  iyonları aracılığıyla polimerize olur ve por oluşumunu sağlar. Granzim B bir serin proteaz olup kaspazlar gibi aspartat rezidüleri içinde peptid bağlarını hidrolize eder. Lenfositlerden salınan Granzim B perforin aracılığıyla hücre içine girer prokaspaz 3 ve 10 aktive ederek mitokondri aracılığıyla hücre ölümüne neden olur. (Osińska, Popko, & Demkow, 2014).

### ➤ İç Yolak

Hücre, hipoksi, serbest radikaller, DNA veya hücre yapısına hasar veren stres faktörleri gibi nedenlerle kendi içerisinde apoptozu başlatabilir. Sitokrom c, mitokondrinin iç membranının dış yüzeyine bakan kısımda elektron taşımada görevlidir. Stres faktörleri mitokondrinin membran yapısında değişikliğe neden olur bunun sonucunda mitokondride por yapısı oluşumu gözlenir. Oluşan bu pordan sitozole geçen Sitokrom c, Apoptotik proteaz aktive eden faktör (APAF-1)’e bağlanarak ‘apoptozom’ adı verilen yapıyı oluşturur. Apoptozom yapısı pro-kaspaz 9’u kaspaz-9’a çevirir. Kaspaz-9 efektör kaspaz olan kaspaz-3’ü aktive ederek DNA’da parçalanmaya ve fragmanlara ayrılmasına neden olur. Bu yolağa kaspaz bağımlı mitokondriyal apoptoz yolağı denir.

Hücrede zimojen (sessiz) halde bulunan kaspazlar uyaranlar sonucu aktive olmalarının düzenlenmesi, apoptozu inhibe eden proteinler tarafından düzenlenir.

Bakulovirüslerde keşfedilen bu proteinlerin insanda en iyi tanımlanmış olanı 57 kDA ağırlığında bir protein olan X-İlişkili Apoptoz İnhibitör Proteini (XIAP)'dir. XIAP, apoptozu kaspazlara etki ederek inhibe eder. Mitokondride por oluşumuyla salınan bir diğer protein İkincil mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü (Smac)/DIABLO proteinidir. Bu protein apoptozu inhibe edici proteinleri baskılayarak kaspaz yolağıyla apoptozun önünü açar (Elmore, 2007).



Şekil 1.9. Apoptozun üç mekanizmasının özeti

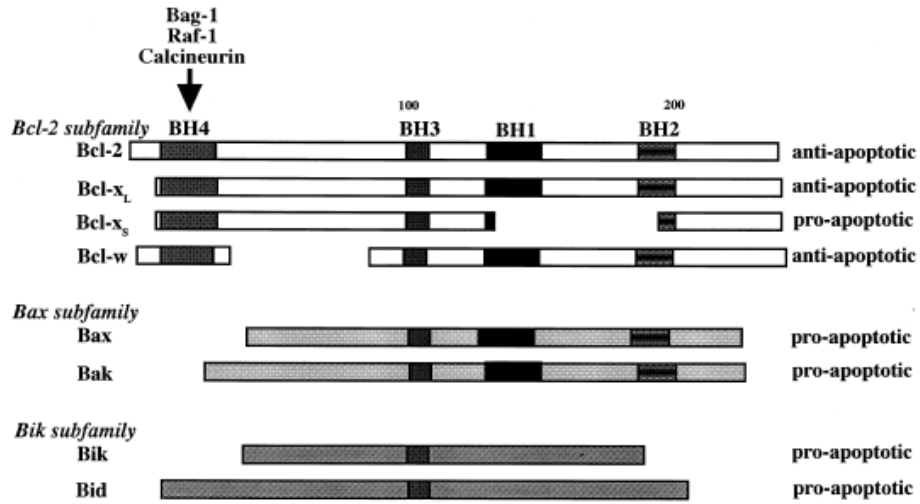
Apoptozda Etkili Olan Genler: *BCL-2* ve *BAX*

Apoptozda *B hücreli lenfoma 2 (BCL-2)* protein ailesi birçok üye içermekte ve bu üyeler iki gruba ayrılmaktadır. İlk grup anti-apoptotik üyelerden oluşmakta, yapısal ve fonksiyonel olarak *BCL-2* ile yüksek homoloji göstermektedir. İkinci grup proapoptotik aktiviteye sahip olup *BCL-2*'ye daha düşük homoloji göstermektedir. Antiapoptotik üyeler ilkin integral membran proteinleri olup mitokondri dış membranında yer alır ve sitokrom c'nin mitokondriden çıkmasını engelleyerek Apaf-1'e bağlanmasını önler.

Proapoptotik üyeler sağlıklı hücrede sitozolde veya hücre iskeletinde lokalize olur. Hücrede ölüm sinyalini takiben antipoptotik proteinlere bağlanarak onları inhibe ederek etkilerini gösterirler.

Bcl-2 protein ailesinin *Bcl-2*'ye dizi benzerliği bakımından izole edilen birçok üyesi vardır. Bu üyelere Bcl-2 homolog (BH) domainleri vardır bu domainlere ve fonksiyonlarına göre üç alt gruba ayrılırlar bunlar;

1. Dört BH içeren (BH1, BH2, BH3, BH4) ve anti-apoptotik aktivite gösteren *Bcl-XL* ve *Bcl-W*,
2. Üç BH içeren (BH1, BH2, BH3) ve pro-apoptotik aktivite gösteren *Bax* ve *Bak*,
3. Sadece BH3 içeren ve pro-apoptotik aktivite gösteren *Bik* ve *Bid*'dir (Tsujimoto, 1998).

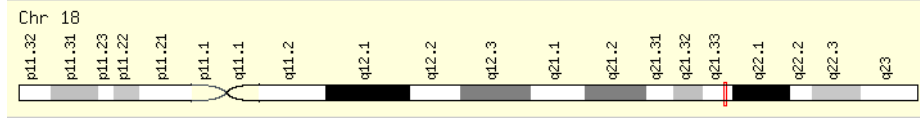


**Şekil 1.10.** *Bcl-2* protein ailesinin homologları. *Bcl-2* subfamily; BH1, BH2, BH3 ve BH4 domainlerini içermektedir (Tsujimoto, 1998)

### *B-cell CLL/Lymphoma 2 (BCL-2)*

*B-cell CLL/Lymphoma 2 (BCL-2)* geni 18. Kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. İlk B hücreli foliküler lenfomada keşfedilen *Bcl-2*'nin daha sonra apoptozda da etkili olduğu bulunmuştur. Membranda bulunan *Bcl-2*, mitokondride membran potansiyelinde kayıp ve membran geçirgenliğinde fonksiyon bozukluğunun meydana gelmesiyle mitokondriden salınan sitokrom c ve Apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ün etkisinin mitokondrideki bu bozuklukları engelleyerek önlemektedir (Elmore, 2007).

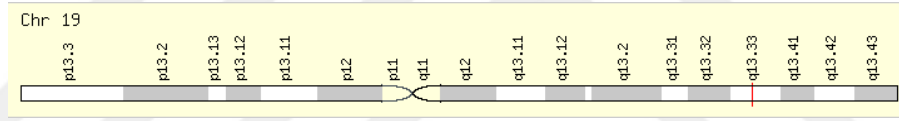




**Şekil 1.11.** *BCL-2* geninin kromozomal lokasyonu (*BCL2* Gene, tarih yok)

### *BCL2* Associated X Protein (*BAX*)

19. kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. *BCL-2* ile BH domainlerinden üçünü (BH1, BH2, BH3) barındırarak yüksek homoloji göstermektedir. *BCL-2* ile heterodimerizasyon gerçekleştirerek proapoptotik fonksiyon gösterir. Sitoplazmada bulunan apoptozu uyarıcı proteinlerden *Bax* ve *Bak*, mitokondrinin sitozole bakan kısmında oligomer formu olarak membranda por oluşumuna ve mitokondrideki Diablo gibi apoptozu inhibe eden proteinleri baskılayan proteinlerin salınımını artırarak apoptozu arttırıcı etkisi vardır (Elmore, 2007).



**Şekil 1. 12.** *BAX* geninin kromozomal lokasyonu (*BAX* Gene, tarih yok)

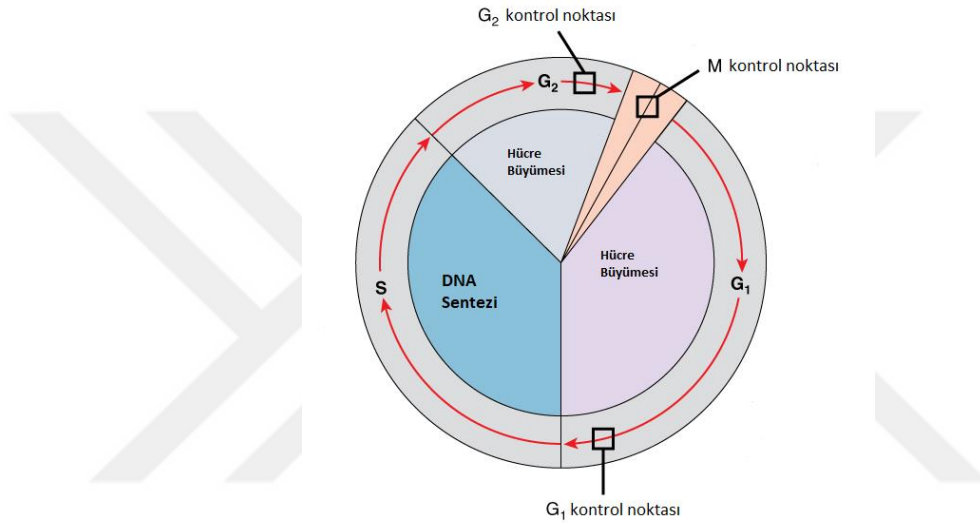
### 1.7. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Yeni bir hücre meydana getirmenin tek yolu var olan hücrenin kendini duplike (kopyalama) etmesiyle olmaktadır. Bir hücre, içeriğini çoğalttığı ve sonra ikiye böldüğü düzenli bir olaylar dizisi gerçekleştirerek çoğalır. Ökaryotlarda sürekli bölünen hücrelerde döngü G1 – S – G2 (interfaz) ve Mitoz şeklinde tekrarlanmasıyla meydana gelir. Her evre arasında ‘geçiş fazı’ anlamına gelen G evreleri vardır (Vermeulen , Van Bockstaele, & Berneman, 2003). İlk üç faz olan G1 - S - G2 evreleri döngünün %90’ını kapsamakta ve 16-24 saat sürmektedir. Mitoz bölünme evresi ise 1-2 saat sürmektedir.

G1 evresinde çevreden gelen sinyaller alınır eğer sinyaller uygun ise büyüme indüklenir. Bu evrede DNA replikasyonu için hazırlık yapılır, hücre metabolik olarak aktiftir ve hücre boyutunda artış görülür. Sentez (S) evresinde, çekirdekdeki DNA ve mitoz fazında DNA’nın ayrılmasını sağlayacak olan sentrozom kendi kopyasını sentezleyerek iki katına çıkar. İkinci geçiş fazı olan G2 evresinde hücre hacimce biraz daha büyür ve mitoz için protein sentezi ve organel düzenlenmesi görülür. Bu üç

evreye birden 'interfaz' evresi denir. Bu evrelerin dışında ekstraselüler alandan çoğalma uyarısı gelmediği için dinlenme fazı adı verilen G<sub>0</sub> evresinde hücreler metabolik olarak aktiftir ancak çoğalmamaktadır. Bu evrede çoğalmadan günler, aylar hatta yıllarca kalabilir.

Mitoz evresi profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere beş aşamadan oluşur. Mitozda, kromozomlarda yoğunlaşma, hücre zarında parçalanma, sentrozomlarda zıt kutuplara çekilme, mitotik iğ oluşumu, kromozomların zıt kutuplara çekilmesi ve son olarak sitokinez meydana gelerek iki hücre meydana gelir.



**Şekil 1.13.** Hücre döngüsünün evreleri ve kontrol (OpenStax College, 2018)

Hücrenin, hangi hücre döngüsü evresinde olduğunu anlamamız için çeşitli yollar vardır. Bunlardan en kolayı ışık mikroskobu altında çoğalan hücreler yuvarlak şekilli görülmektedir ancak bu bize hangi evrede olduğunu göstermez. Döngünün evresi hakkında ipucu bulabileceğimiz bir diğer yöntemde DNA'ya bağlanan floresans boyalar (mitozdaki kromozom yoğunlaşmasını gösterir) veya antikolar kullanılarak mikrotubuller gibi (mitotik iğ oluşumunu gösterir) spesifik hücre bileşenlerini gösterir. Sentez fazını görüntüleyebilmek için timin analogu olan bromodeoksiüridin (BrDU) kullanılır. Çoğalma gerçekleşiyor ise BrDU ile muamele edilmiş hücreler anti-BrDU antikoru ile boyandığında mikroskop altında renkli görülecektir. Bir başka yöntemde DNA içeriğini ölçerek yapılır. Başka bir yöntemde, sentez fazında DNA içeriği iki katına çıktığından ayırt edici bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yaklaşımda DNA'ya bağlanan floresans boyalar kullanılır ve flow sitometri kullanılarak hızlı ve otomatik sonuç elde edilmiş olur.

Sentez fazı öncesinde yer alan G1 kontrol noktası, mitoz fazı öncesinde yer alan G2 kontrol noktası ve metafazın sonunda bulunan kardeş kromatidlerin doğru bir şekilde iğ iplikçiklerine bağlandığını belirleyen mitoz kontrol noktası hücre döngüsünün ‘kontrol noktaları’ olup iki şekilde kontrol edilmektedir.

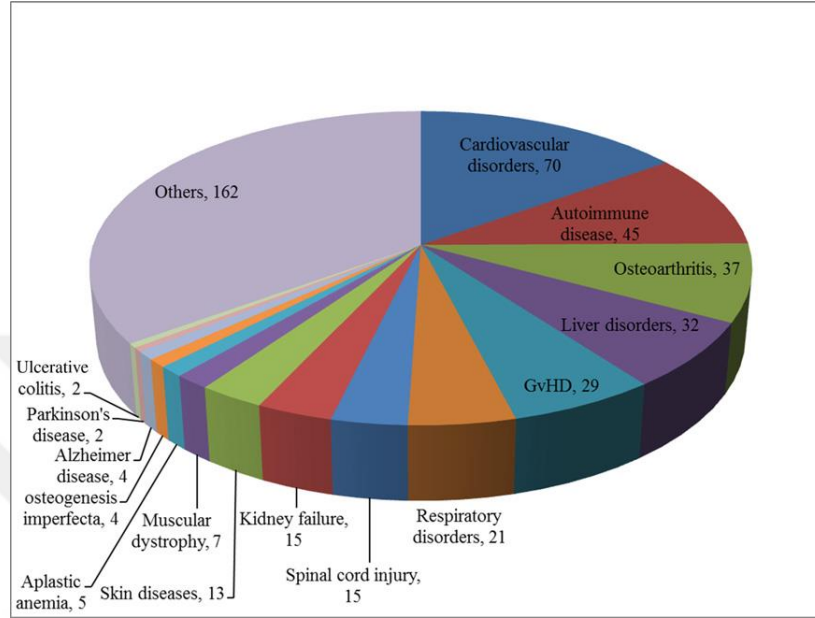
Birincisinde; hücre döngüsünün kontrolünün merkezinde ‘siklin bağımlı kinaz (SBK)’lar olarak bilinen protein kinaz ailesi yer almaktadır. SBK’lar adından da anlaşılacağı üzere aktiviteleri için bir diğer protein olan ‘siklinlere’ ihtiyaç duyarlar. Siklin/SBK kompleksi bir araya geldiğinde kinaz aktiviteleriyle proteinleri fosforilleyerek hücre döngüsünü kontrol ederler.

Hücre döngüsünün en uzun evresi olan G1 evresinin başında D tipi siklinler (D1, D2, D3) cdk4 ve cdk 6 ile bağlanır, G1 evresinin sonuna doğru S evresine geçişte E tipi siklinler cdk2 ile bağlantı kurar. G2 evresinden M evresine geçiş siklin A’lar cdk 1 ile bağlantı kurarak döngüyü ilerletirler. Siklinler, SBK’lar ile kompleks oluşturdukları zaman aktive olmaları için fosforilasyon geçirirler. Fosforilasyon sonucu aktive olan kompleks kinaz aktivitesi ile diğer proteinleri fosforilleyerek hücre döngüsünü ilerletir. Bu kompleks hücre döngüsünün pozitif düzenleyicileridir.

İkinci kontrol yöntemi döngünün negatif düzenleyicileridir. Rb, p53 ve p21 ‘genomun gardiyanları’ olup en önemli negatif düzenleyicilerdir. Birincil olarak G1 evresinde aktiflerdir. DNA’da hasar meydana geldiyse bu genler döngüyü durdurur, hücre tutukluğa uğrar ve DNA hasar mekanizmasında görevli enzim ve proteinler ile DNA tamirini sağlamaya çalışır. Eğer DNA tamir edilemez ise hasarlı kromozomların S evresine geçip iki katına çıkmasını önlemek için apoptozu indükler.

## 1.8. KLİNİK DENEMELERDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Preklinik çalışmalarla birlikte MKH'ler birçok hastalıkta güçlü bir etkisi olduğu bilinmektedir (Wang, Qu, & Zhao, 2012). Clinical trialsa kayıtlı farklı fazlarda (faz I, faz II vb.) yaklaşık 463 çalışma bulunmaktadır (ClinicalTrials.gov, tarih yok).



**Şekil 1.14.** ClinicalTrials'a kayıtlı Mezenkimal Kök Hücre temelli tedavi uygulanan yaygın hastalıklar. (Ullah, Subbarao, & Rho, 2015)

Kültürde çoğaltılmış MKH'ler ile yapılan ilk klinik deneme 1995 yılında 15 hastada olog kullanım ile gerçekleştirilmiştir. Graft versus host hastalığı (GVHH), allojenik hematopoietik kök hücre transplantından sonra donörün T-hücrelerinin alıcıya karşı immun reaksiyon gelmişmesi sonucu oluşan düşük sağ kalım oranı olan bir hastalıktır. Geçtiğimiz on yılda MKH'lerin immun sistemi düzenleme fonksiyonları sayesinde GVHH'da göze çarpan bir tedavi yöntemi olarak düşünülmektedir. Le Blanc K. ve arkadaşları ilk kez GVHH için MKH uygulamışlar ve çarpıcı sonuçlar elde etmişlerdir. 2006'da Ringden O ve ark. yaptığı çalışmada 8 GVHH hastasına MKH uygulanmış ve sekiz hastanın altısında akut GVHH'nin ortadan kalktığı 16 kontrol hastasına göre yaşama oranlarının yükseldiği görülmüştür. Tedavi seçeneklerinin ilerlemesine rağmen, iskemik kalp hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği, morbidite ve mortalitenin başlıca nedenleri olmaya devam etmektedir. Kalp hasarı meydana getirilmiş deneysel hayvanlarda MKH'lerin sistemik veya lokal uygulamasında miyokard enfarktüsünün tamirinde düzelme görülmüştür. Yapılan bir

pilot çalışmada, akut miyokard enfarktüsünün başlamasından sonraki 12 saat içinde primer perkütan koroner müdahale geçiren altmış dokuz hastada, otolog kemik iliği MKH uygulanmış hastalarda MKH'lerin sol ventrikül fonksiyonunu önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Karaciğer sirozu birçok konik karaciğer hastalığının nihai evresidir. Yapılan bir Faz I çalışmasında MKH'ler kısıtlı sayıda karaciğer sirozu olan hastalara tedavi amaçlı denenmiş olup perifer damardan otolog MKH uygulanmıştır. Takip sırasında hastalarda herhangi bir yan etki görülmemiştir ve takip sonunda dört hastanın yaşam kalitesinde artış görülmüştür. Serebral Palsi (SP), gelişen fetal veya infant beyninde meydana gelen hareket ve duruş gelişiminde aktivite sınırlandırmasına neden olan ilerleyici bir hastalıktır. 2015'te Zhang ve ark. larının yayınladığı bir vaka raporunda, 6 aylıkken nörogelişimsel gecikme nedeniyle SP tanısı konmuş hastaya iki yaşına kadar Göbek Kordon Kanı MKH'leri uygulanmış ve SP kriterlerinden birçoğunun hasta 5 yaşında iken ortadan kalktığı görülmüştür (Wang, Qu, & Zhao, 2012).

#### 1.9. İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI

Kök hücre tedavisinin temel amacı, kök hücre karakteristiğini koruyabilirken kök hücre etkinliğini maksimuma çıkarmak ve bunu yaparken de verilen hücresel ilacın güvenilirliğini sağlamaktır. 'Hücre Tabanlı Tıbbi Ürünler' terimi, insanlar için dokular, hücreler veya genlere dayalı ürünler olarak tanımlanmaktadır. Bu ürünlere, otolog, allojenik ve ksenojenik hücrelerden üretilmiş olanlar ve bunlara ek olarak aktif bir maddeden veya ham bir materyalden elde edilmiş hücresel olmayan parçalar da (yapı iskeleleri, matrisler gibi) dahildir. Hücre Tabanlı Tıbbi Ürünler farmakolojik, immünolojik veya metabolik bir etki yoluyla hastalıkların tedavi edilmesi veya teşhis edilmesi için tasarlanmıştır. Hücresel tedavi tıbbi ürünleriyle ilişkili uygulanacak her prosedür Good Manufacturing Practices (GMP) yani türkçe anlamı ile İyi Üretim Uygulamaları laboratuvarları olan tesisleri gerektirmektedir. Bu tesislerde, ham ürünün tesise girişi, üretim alanında işlenmesi, son ürünün hazırlanması, kalite kontrol testlerinin tamamlanması ve paketlenerek tesisten çıkışı yapılmaktadır (Dietz, Padley, & Gastineau, 2007). Tesisler Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumunun yayınladığı 'Beşeri Tıbbi Ürünler İmalathaneleri İyi İmalat Uygulamaları (İİU) Kılavuzu'na göre kurulmalıdır.

İyi Üretim Uygulamaları için gerekli olan maddeler;

- Uygun kalifiye ve eğitimli personel,
- Uygun tesis ve alan,
- Uygun ekipman ve hizmetler,
- Doğru materyal, kaplar ve etiketler,
- Farmasötik Kalite Sistemi uyarınca onaylanmış prosedürler ve talimatlar sağlanmalıdır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Liv Hospital Rejeneratif Tıp ve Kök Hücre Merkezi ve İstinye Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'nde ortaklaşa gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 2. 1.** Çalışma süresince kullanılan kimyasal bileşenler

<b>KULLANILAN KİMYASALLAR</b>	<b>KATALOG NUMARALARI</b>
<b>HÜCRE KÜLTÜRÜ</b>	
NutriStem XF bazal besiyeri	Biological Industries - 05-200-1A
NutriStem XF Supplement	Biological Industries - 05-201-1U
Fosfat Tamponlu Salin (Ca, Mg içermeyen) dPBS 1x	Gibco - 14190342
Tripsin	Biological Industries - 03-054-1B
Human Serum AB Plasma	Seracare - 1810-0001
Penisilin Streptomisin	Biological Industries - 03-031-1B
<b>FLOW SİTOMETRİ</b>	
Human MSC Analysis Kit içeriği;	BD – 562245
PE hMSC Negative Cocktail	51-9007661
PE hMSC Isotype Control Negative Control	51-9007662
hMSC Isotype Control Positive Cocktail	51-9007664
FITC Mouse Anti-Human CD90	51-9007657
PE Mouse Anti-Human CD44	51-9007656
APC Mouse Anti-Human CD73	51-9007649
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5 Mouse Anti-Human CD105	51-9007648
<b>RNA İZOLASYONU</b>	
RNeasy Plus Mini Kit içeriği;	QIAGEN - 74134
Gdna elimination spin columns	QIAGEN - 74134
Rneasy spin columns	QIAGEN - 74134
Koleksiyon tüpleri (1,5 ml)	QIAGEN - 19201
Koleksiyon tüpleri (2 ml)	QIAGEN - 19201
Buffer RLT Plus	QIAGEN - 1053393

Buffer RW1	QIAGEN - 1053394
Buffer RPE	QIAGEN - 1018013
RNaz içermeyen su	QIAGEN - 129112
B-Mercaptoethanol	Gibco – 21985-023
<b>cDNA SENTEZİ</b>	
RT <sup>2</sup> First Strand Kit içeriği;	QIAGEN - 330404
Buffer GE	QIAGEN - 330404
5x Buffer BC3	QIAGEN - 330404
Control P2	QIAGEN - 330404
RE3 Reverse Transkriptaz Mix	QIAGEN - 330404
RNaz içermeyen su	QIAGEN - 330404
<b>PRİMERLER</b>	
<i>TERT</i>	QIAGEN - PPH00995E-200
<i>OCT4</i>	QIAGEN - PPH02394E-200
<i>SOX2</i>	QIAGEN - PPH02471A-200
<i>ZFP42</i>	QIAGEN - PPH02395A-200
<i>GAPDH</i>	QIAGEN - PPH00150F-200
RT <sup>2</sup> Qpcr SYBR Green Mastermix	QIAGEN - 330501
<b>TELOMERAZ</b>	
Telo TAGGG PCR ELISA Plus Kiti;	Roche - 12013789001
Lysis Solution	Roche - 12013789001
Reaction Mix	Roche - 12013789001
Internal Standart (IS)	Roche - 12013789001
Positive Control, low	Roche - 12013789001
Positive Control, High	Roche - 12013789001
Nuclease-free water	Roche - 12013789001
Denaturation Solution	Roche - 12013789001
Hybridization Buffer T	Roche - 12013789001
Hybridization Buffer IS	Roche - 12013789001
Washing Buffer	Roche - 12013789001
Anti-DIG-HRP Solution	Roche - 12013789001
Conjugate Dilution Buffer	Roche - 12013789001
TMB Substrate Solution	Roche - 12013789001



Stop Solution	Roche - 12013789001
Microplate	Roche - 12013789001
<b>KARYOTİP</b>	
A-10 Basal Medium	WISENT - 150-901-EL
A Besiyeri Supplement	WISENT - 150-910-XL
Chang Medium B	IrvineScientific - C100
Colcemid Solution	Biological Industries – 12-004-1D
Phytohemagglutinin	Biological Industries - 12-009-1H
Tripsin	Biological Industries - 03-054-1B
Serum	Capricorn – FBS11B
Penicillin-Streptomycin	Biosera - LM-A4118/100
Metanol	Merck - 1.06008.2500
Asetik Asit	Merck - 1.00056.2500
Potasyum Klorür	Duchefa Biochemie - 7447-40-7
Giemsa	Merck - 1.09204.2500
Pankreatin	Sigma - P3292
%0.9 Sodyum Klorür İzotonik Çözelti	Biofleks
İmersiyon yağı	Merck - 1.04699.0100
Sodium hydrogen phosphate dihydrate (A Solüsyonu)	Merck - 1.06580.1000
Potassium dihydrogen phosphate (B Solüsyonu)	Merck - 1.04873.1000
<b>APOPTOZ FLOW SİTOMETRİ</b>	
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit;	BD – 556547
FITC Annexin V	BD - 51-65874X
Propidium Iodide Solution	BD - 51-66211E
Annexin V Binding Buffer 10x	BD - 51-66121E
<b>HÜCRE DÖNGÜSÜ TUTUKLUĞU</b>	
Lympho-Paque	GENAXXON - C4754.0500
BD Cycletest <sup>tm</sup> Plus DNA Reagent Kit;	BD-340242
Buffer Solution	BD-340242
Solution C	BD-340242
Solution B	BD-340242
Solution A	BD-340242

**Tablo 2.2.** Çalışma süresince kullanılan cihazlar

<b>CİHAZLAR</b>	<b>MARKA / MODEL</b>
Santrifuj	Thermo Scientific / Thermo SL16R
Santrifuj	Thermo Scientific / MICROCL 17
Laf kabini	Thermo Scientific / HeraSafe KS
İnkubatör	Thermo Scientific / HeralCell HC 240i
Mikroskop	Olympus / IX73
Mikroskop	Zeiss / AXIO Imager.M2
Hücre Sayım Cihazı	Beckman Coulter / Vi-CellXR
Flow Sitometri	BD / FacsCanto
Flow Sitometri	BD / FacsCalibur
RNA Ölçümü	ThermoFisher / Qubit Q33239
Termal döngü cihazı	Labcycler / SenseQuest
Real Time Cihazı	QIAGEN / Rotor Gene Q
Vortex	Stuart / SA8
Etüv	Thermo Scientific / Heratherm IMH60
Termal döngü cihazı	SenseQuest / LabCycler
Spektrofotometre	Thermo Scientific / Multiscan Go
Su banyosu	Elektro-mag / M96 KP

#### Örneklerin Toplanması

Liv Hospital Kadın Doğum ve Hastalıkları bölümünde, sağlıklı anne adayının ‘‘Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu’’nu okuması ve onaylaması halinde uzman kişiler tarafından alınan göbek kordonu, uygun koşullarda izolasyonu gerçekleştirilerek çalışmaya alınmıştır.

## 2.1. EKSPLOANT KÜLTÜR

1. Eksplant kültür için steril laminar flow kabininde kordon, taşıma solüsyonundan pens yardımı ile alınarak cam petride kan damarlarından ayrıldı.
2. 1 cm<sup>3</sup> boyutlarında küçük parçalara ayrıldı.
3. Doku parçaları boyuna kesi açılarak Wharton jeli olarak bilinen bağ doku kısmı kültür kabına bakacak şekilde 100 mm'lik petri kapları içerisine yerleştirildi.
4. Üzerine yavaşça dokuları kaldırmadan %0,5 100 U/ml Penisilin ve 100 µg/ml Streptomisin, %2 Human AB Serum, %0,6 NutriStem MSC XF Supplement ile hazırlanan NutriStem MSC XF besiyeri eklendi.
5. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'lik inkübatöre kaldırıldı.
6. 72. saatte kontaminasyon ve hücre kontrolleri yapıldı.
7. Her 4 günde bir besiyeri değişimi yapıldı.
8. 11. Günde hücreler yaklaşık %80 konfluent durumuna ulaştığında Göbek kordonu eksplantları atıldı ve pasajlama işlemi gerçekleştirildi. İzole edilmiş ve çoğaltılmış hücrelerin morfolojisi inversiyon mikroskopunda gözlemlendi.

### 2.1.1. Alt Kültür (Pasaj)

1. %80 konfluent olan hücrelerde pasajlama işlemi için ilk olarak besi yeri petriden tamamen uzaklaştırıldı.
2. Petrilerin yüzeyi kaplayacak kadar PBS ile yıkandı PBS çekilerek atıldı.
3. Üzerine önceden ısıtılmış olan tripsin/EDTA yüzeyi kaplayacak kadar eklendi.
4. 3 dakika inkübatör içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücrelerin yüzeyden ayrılması mikroskop altında gözlemlendi.
5. Tüm hücreler human AB serum ile çekilerek 50ml falkon tüpü içine toplandı.
6. 400g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant pipet ile çekilerek atıldı.
7. Pellet 10 ml besiyeri ile sulandırıldı ve sayım yapıldı.
8. Hücre sayısı/canlılık analizi ViCell XR cihazının tripan mavisi tekniğiyle yapıldı ve uygun kültür kaplarına ekimi yapıldı. Bu işlem 6. Pasaja kadar devam etti.

## 2.2. AKIM SİTOMETRİ ANALİZİ

Farklı pasajlardan (P2, P4 ve P6) tripsin ile kaldırılmış hücreler, 2000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi her pasaj için  $1 \times 10^6$  hücre elde edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.

1. Pellet üzerine 300 µl PBS eklendi.
2. Pozitif, negatif ve kontrol olmak üzere üç sitometri tüpü hazırlandı.
3. Her sitometri tüpüne 100 µl olacak şekilde hücreler paylaştırıldı.
4. Antikorlar;

Pozitif tüp: 5 µl CD90 + 5 µl CD44 + 5 µl CD73 + 5 µl CD105

Negatif tüp: 20 µl Negatif Cocktail (CD34, CD45, CD11b, CD19, HLA-DR)

Kontrol tüp: 20 µl Isotype Control Positive + 20 µl Isotype Control Negative eklendi.

5. Tüpler vortekslendi.
6. Tüpler karanlıkta oda sıcaklığında 30 dk inkube edildi. HI01
7. İnkubasyon sonrasında tüplere 2 ml Cell Wash eklendi.
8. Tüpler 300g'de 5 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldı, pellet 300 µl Cell Wash ile sulandırıldı FacsDIVA programında analizi yapıldı.

## 2.3. RNA İZOLASYONU

1. Farklı pasajlardan (P2, P4 ve P6) tripsin ile kaldırılmış hücreler, 400 g'de 5 dk santrifüj edilerek  $2 \times 10^6$  hücre elde edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.

2. Hücre pelletine 500 µl Buffer RLT eklendi 30 saniye vortexle homojenize edildi.

3. Homojenize lizatlar 2 ml tüpe yerleştirilen gDNA ayrıştırıcı dönüş kolonundan geçirildi.

3.30 saniye 10.000 rpm'de santrifüjlendi gDNA ayrıştırıcı dönüş kolonu atıldı tüpe 350 µl %70'lik etanol eklendi pipetaj yapıldı.

4. 700 µl örnek yeni bir 2 ml tüpe yerleştirilen RNeasy dönüş kolonuna aktarıldı. 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlendi. Altta bulunan 2 ml tüp atıldı.
5. Kolon yeni bir 2ml tüpe alındı üzerine 700 µl RW1 eklendi. 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlendi. Altta bulunan 2 ml tüp atıldı.
6. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alındı üzerine 500 µl RPE eklendi. 10.000 rpm'de 15 sn santrifüjlendi.
7. Kolon yeni bir tüpe alınmadan sadece üzerine tekrar 500 µl RPE eklendi. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüjlendi.
8. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alındı 1 dk son hızda santrifüjlenerek kuruması sağlandı.
9. Kolon 1,5 ml ependorf tüpüne koyuldu. Üzerine 45 µl RNaz içermeyen su eklendi kapağı kapatıldı 10.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi ve RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit®2.0 Fluorometer [Invitrogen/Molecular Probes] kullanıldı. Qubit cihazının ölçüm alanına kitle gelen standartlar (standart 1 ve standart 2) okutularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Farklı pasajlardaki total RNA miktarı yapılan ölçümler sonucunda cDNA sentezi için 0.8 µg olarak kullanıldı.

#### 2.4. KOMPLEMENTER DNA (CDNA) SENTEZİ

Kit içerisinde bulunan malzemeler çözüldü kısaca vortexlendi. Her bir RNA örneği için DNA eliminasyon miksi aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

**Tablo 2.3.** DNA eliminasyon miksi hazırlama

Malzemeler	Hacim
RNA	7 µl (8µg)
Buffer GE	2 µl
RNaz içermeyen su	1 µl
Total Hacim	10 µl

Hazırlanan miks hafifçe pipetajlandı. Örnekler termal döngü cihazında 5 dakika 42 °C'de inkube edildi. Ardından hemen en az 1 dk buzda bekletildi. Revers-transkriptaz miksi aşağıdaki tabloya göre hazırlandı.

**Tablo 2.4.** Reverse-transkriptaz miksi hazırlama

Malzemeler	Hacim
5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Reverse Transkriptaz Mix	2 µl
RNaz içermeyen su	3 µl
Total hacim	10 l

10 µl genomik DNA eliminasyon miksi içeren tüplere 10 µl revers-transkriptaz miksi eklendi, pipetajlandı ve aşağıdaki tabloya göre termal döngü cihazına konuldu.

**Tablo 2.5.** RT-PZR amplifikasyon ürünü elde etme programı

Sıcaklık	Zaman
42 °C	15 dakika
95 °C	5 dakika

Her bir reaksiyona 91 µl RNaz içermeyen su eklendi. Reaksiyon buza konularak PZR protokolüne devam edildi. RT-PZR'de, gen ekspresyonu ürünü kantitatif olarak ölçülmekte ve ürünlerin analizi reaksiyon gerçekleşirken yapılmaktadır. *TERT*, *OCT4*, *SOX2*, *ZFP42*, *BCL-2* ve *BAX* genlerinin ekspresyonu 3 tekrarlı olarak ve  $Rt^2$  Syber Green Master Mix (Qiagen) kullanılarak Rotor Gene Q (Qiagen) cihazı ile gerçekleştirildi. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu kullanıldı.

WJ-MKH'lerin pluripotensi belirteçleri olan genler için 1 µM'lık *TERT*, *OCT4*, *SOX2*, *ZFP42* ve internal standart olarak glikolizde glukozu parçalayıp hücrel enerji üretmesine yardımcı olan *Gliseraldehit 2-fosfat dehidrogenaz* (*GAPDH*) primerleri optimize edilmiş halde ticari olarak alındı.

Apoptoz genleri için olan *BCL-2* ve *BAX* primerleri ticari olarak alındı. Liyofilize halde gelen *BCL-2* ve *BAX* primerleri sentez raporunda verilen miktarlara göre nukleaz içermeyen su ile 100 µM'lık stokları hazırlandı. Daha sonra 100 µM'lık stoktan 1:9 oranında seyreltilerek 10 µM'lık çalışma stok grubu hazırlandı.

**Tablo 2.6.** *Bcl-2* ve *BAX* genleri forward ve reverse primer dizileri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Bcl-2</i>	GGATAACGGAGGCTGGGATGCC	CCAAACTGAGCAGAGTCTT
<i>BAX</i>	ACTGGTGCTCAAGGCCCTGTG	GAGTCTCACCCAACCAC

*TERT*, *OCT4*, *SOX2*, *ZFP42* ve *GAPDH* genleri için aşağıdaki tabloda bulunan PCR içerikleri hazırlandı:

**Tablo 2.7.** *TERT*, *OCT4*, *SOX2*, *ZFP42* ve *GAPDH* genleri PCR içerikleri

Malzemeler	Hacim
RT <sup>2</sup> SYBR Green Mastermix	12,5 µl
c DNA sentez reaksiyonu	1 µl
Primer (1 µM)	1 µl
RNaz İçermeyen Su	10,5 µl
TOPLAM	25 µl

*BCL-2* ve *BAX* genleri için aşağıdaki PCR içerikleri hazırlandı:

**Tablo 2.8.** *BCL-2* ve *BAX* genleri PCR içerikleri

Malzemeler	Hacim
RT <sup>2</sup> SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA sentez reaksiyonu	1 µl
Forward Primer (1 µM)	2,5 µl
Reverse Primer (1 µM)	2,5 µl
RNaz İçermeyen Su	6,5 µl
TOPLAM	25 µl

**Tablo 2.9.** RT-PZR amplifikasyon ürünü elde etme programı

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Hold	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	20 saniye	40
Annealing	55	30 saniye	

## 2.5. TELOMERAZ AKTİVİTESİ

Yapılan bu test için kullanılan 'Telo TAGGG PCR ELISA Plus' kiti RT-PZR ve Eliza olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. PZR'de sentetik primer ile 3'-ucuna biotin işaretli telomerik tekrarlarla hem internal standart hem de örnekler çoğaltılır. Eliza aşamasında oluşan PZR ürünleri telomerik tekrarlara ve internal standarta spesifik problemler ile hibridize edilir. Elde edilen ürünler biotine yüksek afinitesi olan streptavidin kaplı plate ile immobilize edilir. Immobilize edilmiş ürünler problemlerin antikorları ile konjuge edilir ve ölçüm yapılır.

### Örneklerin Hazırlanma Aşamaları

1. Test edilecek hücreler (P2, P4 ve P6) sayıldı, en az  $2 \times 10^5$  hücre/mL olmalıdır.
2. 3000xg'de 5dk +4°C'de örnekler santrifüj edildi.
3. Supernatant atıldı, PBS eklenerek tekrar 3000xg'de 5dk +4°C'de örnekler santrifüj edildi.
4. Önceden buzda soğutulmuş Lysis Reagent'dan 200µL örneklere eklendi ve eppendorfa aktarılarak buz içine koyuldu.
5. Örnekler buzda 30dk inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonunda örnekler 16000g'de 20dk +4°C'de santrifüj ettirildi.
7. Santrifüj sonrası 175 µl supernatant yeni tüpe aktarıldı.  
Negatif Kontrol hazırlamak için; Yeni tüpe aktarılan örneklerden 5'er µL alınarak PCR tüpüne aktarıldı termal döngü cihazında 95°C'de 10dk sıcaklık uygulaması yapıldı.

Telomerik Tekrarları Çoğaltma Protokolü (TRAP)

**Tablo 2.10.** TRAP Reaksiyon içeriği

	<b>Normal Örnek</b>	<b>Negatif Kontrol</b>	<b>Pozitif Kontrol</b>	<b>Blank</b>
<b>Reaksiyon Mix</b>	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
<b>Internal Standart</b>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl



<b>Örnek</b>	3 µl	3 µl	1 µl (Low ya da High Control)	1 µl (Lysis Reagent)
<b>Nukleaz İçermeyen Su</b>	17 µl	17 µl	19 µl	19 µl

Hazırlanan PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki protokol uygulandı.

**Tablo 2.11.** PZR amplifikasyon programı

	<b>Zaman</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Döngü</b>
<b>Primerleri Uzatma</b>	10-30dk	25°C	1
<b>Telomeraz İnaktivasyonu</b>	5dk	94°C	1
<b>Amplifikasyon:</b>			
<b>Denatürasyon</b>	30sn	94°C	1-30
<b>Annealing</b>	30sn	50°C	
<b>Polimerizasyon</b>	30sn	72°C	
	10dk	72°C	1
<b>Hold</b>		4°C	

ELIZA Aşaması

\*Blank için bir tüp hazırlandı.

Tüpe;

10µl Denaturasyon Reagentı + 2,5 µl PZR ürünü + 100 µl Hibridizasyon Buffer T konuldu (A).

\*Pozitif kontrol için iki tüp hazırlandı.

1.Tüpe;

10µl Denaturasyon Reagentı + 2,5 µl PZR ürünü + 100 µl Hibridizasyon Buffer T konuldu (B).

2.Tüpe;

10µl Denaturasyon Reagentı + 2,5 µl PZR ürünü + 100 µl Hibridizasyon Buffer IS konuldu (C).

Yukarıda hazırlanan üç tüp sadece bir kez hazırlandı ve çalışılacak örnekler için kontrol olarak kullanıldı.

\*Negatif kontrol için bir tüp hazırlandı.

Tüpe;

10µl Denaturasyon Reagentı + 2,5 µl PZR ürünü + 100 µl Hibridizasyon Buffer T konuldu (D, D1,D2)

\*Normal örnek için iki tüp hazırlandı.

1.Tüpe;

10µl Denaturasyon Reagentı + 2,5 µl PZR ürünü + 100 µl Hibridizasyon Buffer T konuldu (E, E1,E2).

2.Tüpe;

10µl Denaturasyon Reagentı + 2,5 µl PZR ürünü + 100 µl Hibridizasyon Buffer IS konuldu (F,F1,F2).

Her alt kültür örneği için (P2, P4 ve P6) D, E ve F hazırlandı. Aşağıdaki şekilde mikro plakaya her birisinden 100 µl dağıtıldı.

**Tablo 2.12.** Plakaya dizme düzeni

	A (Blank)	B(Pozitif Kontrol T)	C (Pozitif Kontrol IS)
<b>P2</b>	D	E	F
<b>P4</b>	D1	E1	F1
<b>P6</b>	D2	E2	F2

1. Plaka 37 °C'de 2 saat 300 rpm'de inkube edildi.
2. Inkubasyon sonrası solüsyonlar pipet ile çekilerek atıldı.
3. Her kuyucuğa 250 µl Washing Buffer eklendi. 30 sn bekletildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
4. Her kuyucuğa 100 µl Anti-DIG-HRP eklendi.
5. Oda sıcaklığında 30 dk 300 rpm'de inkube edildi daha sonrasında solüsyon uzaklaştırıldı.

6. Her kuyucuğa 250 µl Washing Buffer eklendi. 30 sn bekletildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
7. Her kuyucuğa 100 µl TMB eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk 300 rpm'de inkube edildi.
8. Her kuyucuğa 100 µl Stop Reagent eklendi ve renk değişim gözlemlendi.
9. 10 dk sonra 450nm ve 690nm referans dalga boyunda absorbans değeri her örnek için okundu.

#### Hesaplama

##### Blank için;

Absorbance<sub>450</sub>-Absorbance<sub>690</sub>=S<sub>0</sub>, S<sub>0</sub><0,1 olmalıdır.

Pozitif Kontrol T için;

Absorbance<sub>450</sub>-Absorbance<sub>690</sub>=S-T

Pozitif Kontrol IS için;

Absorbance<sub>450</sub>-Absorbance<sub>690</sub>=S-IS

(S-T) – (S<sub>0</sub>) / (S-IS)= Çıkan değer;

Low control için; 0,3-0,8 aralığında olmalıdır.

High control için; 0,9-4 aralığında olmalıdır.

##### Örnekler için;

Negatif kontrol için;

Absorbance<sub>450</sub>-Absorbance<sub>690</sub>=S-01

Örnek T için;

Absorbance<sub>450</sub>-Absorbance<sub>690</sub>=S-T1

Örnek IS için;

Absorbance<sub>450</sub>-Absorbance<sub>690</sub>=S-IS1

$[(S-T) - (S_0) / (S-IS)] \times 100 =$  Çıkan değer Rölatif Telomeraz Aktivitesini (RTA) vermektedir.

## 2.6. KARYOTİP

Karyotip analizi, kromozomlarda meydana gelen olası değişiklikleri gözlemlenmek için yapılan genetik bir uygulamadır. Kromozom analizi yapılacak örnekler uygun kültür ortamlarında çoğaltılır. Hücreler yeterli konfluensiye ulaştığı zaman colcemid solüsyonu eklenerek kromozomları görebilmek için hücre gelişimi metafaz aşamasında durdurularak kromozomlar karyotip analizine hazırlanmış olur.

1. Pellet halindeki hücreler (P2, P4 ve P6) A-10 Basal Medium ile sulandırıldı T25 flaska (corning) ekimi yapıldı.
2. Hücreler %80 konfluent olduğu zaman her flaska 100 µl Colcemid eklenerek inkubatore kaldırıldı ve 3 saat inkube edildi.
3. İnkubasyon süresi sonunda medium atıldı flaska 1 ml tripsin eklendi inkubatore kaldırıldı.
4. İnkubasyon sırasında; Bir şişeye 3:1 metanol:asetik asit (90 ml metanol, 30 ml asetik asit) hazırlanarak -20'ye konuldu.
5. Hücrelerin kalktığı mikroskopta gözlendikten sonra hücreler 15 ml falcona toplandı.
6. Falconlar 1580 g'de 8 dk santrifujlenir.
7. Santrifüj sonrası supernatant dipte 2 ml kalana kadar çekildi ve hücre pelletinin üzerine 5 ml'e kadar KCl konuldu hafif bir vortex yapıldı ve 15 dakika etüvde inkube edildi.
8. İnkubasyon sonrası örneklere 1 ml metanol:asetik asit konuldu 1580 g'de 8 dk santrifujlendi.
9. Supernatant 1 ml kalana kadar çekildi örnekler vortexlenirken üzerlerine yaklaşık 3 ml damla damla metanol:asetik asit eklendi vortex devam ederken tekrar bir 1 ml hızlı bir şekilde metanol:asetik asit eklendi ve 1580 g'de 8 dk santrifujlendi.
10. Bir önceki işlem tekrarlandı. Yayma işlemine geçildi.

#### YAYMA

1. Santrifuj sırasında lamlara örnek isimleri yazıldı.
2. Supernatant 1 ml kalana kadar çekildi.
3. 100 µl örnek pipete çekildi, lam nemlendirildi ve 5-10 cm yukarıdan 45°'lik açıyla örnekler lama bırakıldı.
4. Lamlar kurumaya bırakıldı.
5. 72 °C'lik etüvde 24 saat inkube edildi.

#### GIEMSA BANTLAMA

1. 0,20 gram pankreatin tartıldı ve %0,9'luk izotonik NaCl 200 ml konularak karıştırıldı. 1,5 saat 37 °C'lik su banyosunda inkube edildi.
2. Diğer aşamalar aşağıdaki tabloya göre yapıldı.

**Tablo 2.13.** Giemsa bantlama yöntemi

1. AŞAMA		Örnekler sepete yerleştirildi ve pankreatinin bulunduğu kaba koyulup 3 dk inkube edildi.
2. AŞAMA	I.KAP	Kaba A ve B solüsyonundan 200 ml konuldu. Örneklerin bulunduğu sepet daldırılıp çıkarıldı.
	II. KAP	Kapta Giemsa solüsyonu hazırlandı: (190 ml A ve B solüsyonu) + (10 ml Giemsa) Örneklerin bulunduğu sepet 4 dk kapta inkube edildi.
	III. KAP	Kaba 200 ml distile su eklendi ve daldırılıp çıkarılarak yıkama gerçekleştirildi.

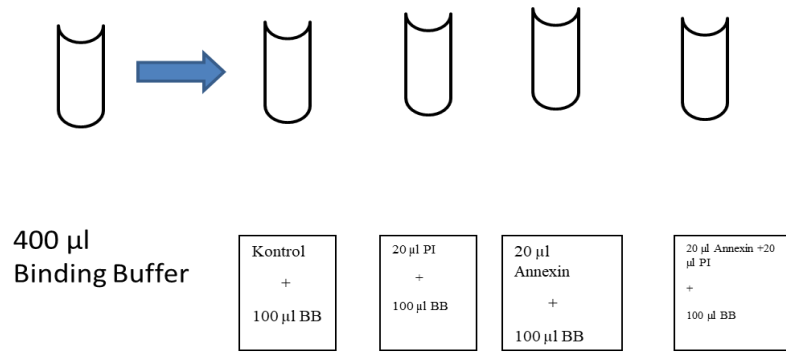
#### Kromozomların İncelenmesi

Kromozom fotoğrafları Imager.M2 (ZEIZZ) ışık mikroskobu ile 100X büyütmede OtoAKAS8 programı ile metafazlar bulunup fotoğrafları çekilmiş ve relatif kromozom uzunlukları mikrometrik ( $\mu\text{m}$ ) olarak AKAS programı ile ölçülmüştür. Kromozom morfolojisinin belirlenmesinde ise 'İnsan Sitogenetik Terminolojisi için Uluslararası Bir Sistem' esas alınmıştır. Karyotip hazırlanırken her bir tür için 10 metafaz evresi kullanılmıştır. Uzunluklarına göre her kromozom çiftinin % değeri hesaplanmış ve otozomal kromozom çiftleri göreceli uzunluklarına göre büyükten küçüğe doğru sıralanmıştır. Eşey kromozomları sıralamanın en sonunda yer almıştır. Karyotipler Adobe Photoshop CS3 programı kullanılarak hazırlanmıştır.

## 2.7. AKIM SİTOMETRİ İLE APOPTOZ TAYİNİ

FITC Annexin V kiti popülasyonda aktif olarak apoptoza giren hücrelerin yüzdesini belirlemektedir. Metodun temeli apoptozun erken safhasında hücrelerin membranında asimetri kaybı meydana gelmesine dayanmaktadır. Normal hücrelerde, membran fosfolipidi olan fosfotidilserin hücrenin iç yüzeyine bakmaktadır ancak apoptotik hücrelerde iç yüzden dış yüze dönen fosfotidilserin dış ortama maruz kalmaktadır. Annexin V, 35-36 kDa Ca-bağımlı fosfolidip bağlama özelliği olan bir protein olup fosfotidilserine yüksek afinitesi vardır böylece apoptozu belirlemede etkilidir. Propidyum İyodür (PI) flow sitometride canlı hücreleri canlı olmayandan ayırma da kullanılan standart bir canlılık probudur. Canlı hücrelerin bütünlüğü bozulmamış membranları PI geçirmemektedir oysaki ölü veya hasarlı hücreler membranları olmadığı veya bozulduğu için PI hücre içerisine girmektedir. FITC Annexin V için pozitif PI için negatif olan hücreler apoptozun erken safhasında, her ikisi için pozitif olan hücreler geç apoptoz safhasında ya da ölü, FITC Annexin V için negatif PI için pozitif olan hücreler nekroze olmuş ve her ikisi için negatif olan hücreler canlı hücrelerdir.

1. Farklı pasajlardan (P2, P4 ve P6) tripsin ile kaldırılmış hücreler sitometri tüplerine ml'de  $1 \times 10^6$  olacak şekilde dağıtıldı hücreler 2000 rpm'de 3 dk santrifujlendi.
2. Annexin Binding Buffer aşağıdaki şekilde tüplere dağıtıldı



**Şekil 2.1.** Flow Sitometri yöntemi ile apoptoz analizi deney şeması

3. Tüpler vortekslendi ve 20-30 dk karanlıkta inkubasyona bırakıldı.
4. FacsCalibur Flow sitometri cihazında CellQuest Pro programıyla analizi yapıldı.

## 2.8. AKIM SİTOMETRİ İLE HÜCRE DÖNGÜSÜ

Bu methodda farklı boyalarla boyanmış normal (insan mononukleer hücreleri) ve karşılaştırılacak diğer hücrelerinin akım sitometrik analizi, varsa anormal DNA içeriğini tanımlamak ve bu DNA indeksinin (DI) hücre döngüsü faz dağılımlarını belirlemek için kullanılır. Hücre döngüsünün G1, S ve M evrelerinde hücre dağılımı farklı olduğundan DNA içeriği ile hücrenin hangi evrede olduğunu anlamamızı da sağlamaktadır. Kit ile iyonik olmayan deterjanlarla hücre membranı parçalanır, hücre iskeleti ve çekirdek proteinleri tripsin ile ortadan kaldırılır, hücre RNA enzimlerle sindirilir ve poliaminlerle nuklear kromatin stabilize edilir. Propidyum iyodür (PI) ile boyanan DNA içeriği ölçümü flow sitometri cihazında (FacsCalibur), CellQuest Pro programı ile yapılmıştır.

Buffer Solusyonu: Sodyum sitrat, Sukroz ve Dimetilsulfoksit (DMSO) içermektedir. Solusyon A: Hücre iskeleti ve hücre membranını parçalamak için tripsin içermektedir. Solusyon B: Tripsini inhibe eder ve içerdiği Ribonukleaz A ile RNA'yı sindirir. Solusyon C: Propidyum İyodür (PI) ile DNA'ya bağlanır.

1. Tripsin ile kaldırılmış hücrelerin (P2, P4 ve P6) üzerine 100 µl buffer eklendi pipetaj yapıldı.

Tüm tüplere;

2. Solusyon A'dan: 250 µl eklendi. 10 dk karanlıkta inkubasyon.

3. Tüm tüplere;

Solusyon B'den: 200 µl eklendi. 10 dk karanlıkta inkubasyon.

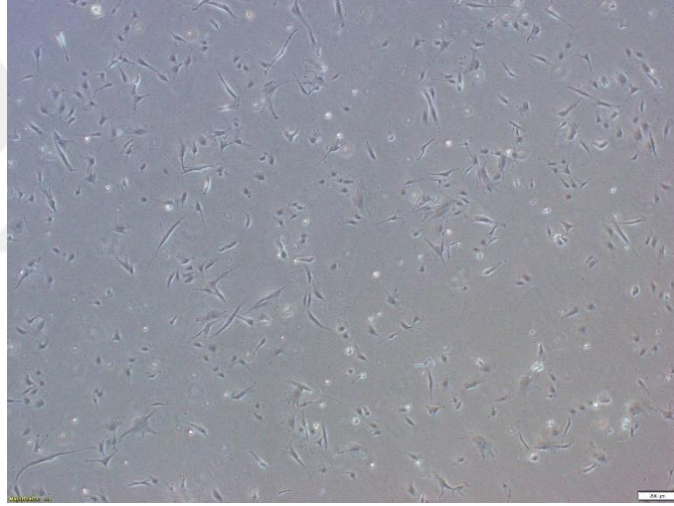
4. Tüm tüplere;

Solusyon C'den: 200 µl eklendi. 10 dk karanlıkta inkubasyon.

### 3. BULGULAR

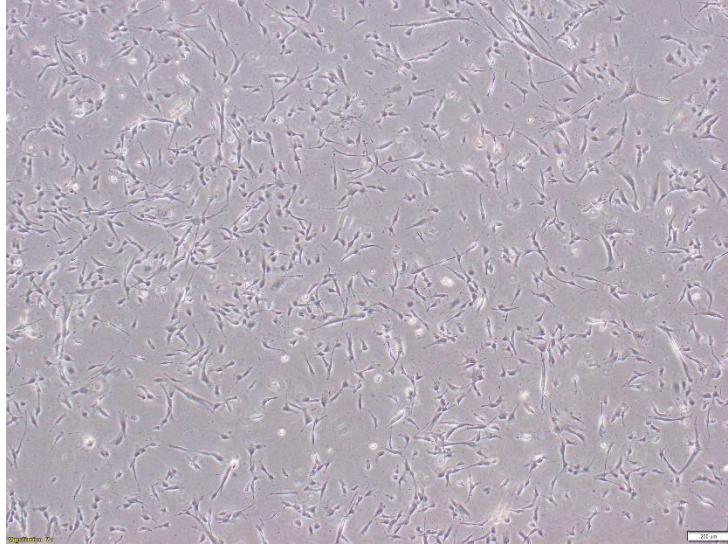
#### 3.1. İNSAN GÖBEK KORDONUNDAN KÖK HÜCRE İZOLASYONU

Liv Hospital Kadın Doğum Hastalıkları biriminde gerekli bilgilendirmenin yapıldığı ve yazılı onamın alındığı sağlıklı anneden uzman hekim tarafından alınan göbek kordonu Liv Hospital Rejeneratif Tıp ve Kök Hücre Laboratuvarına steril koşullarda getirildi aynı gün izolasyon işlemine alındı. Eksplant kültür yöntemi ile göbek kordonunun Wharton jeli bölümünden 9.günde hücreler çıkmaya başladılar. 16. Günde %80 konfluent olan hücreler buldukları kaptan enzim yoluyla kaldırılarak alt kültürlere geçildi. Alt kültür işlemi pasaj 6'ya kadar devam etti. Hücrelerin çoğalma aşamaları inversiyon mikroskop altında düzenli olarak takip edildi. Her üç pasajda da morfolojik görüntülerini korudukları gözlemlendi.

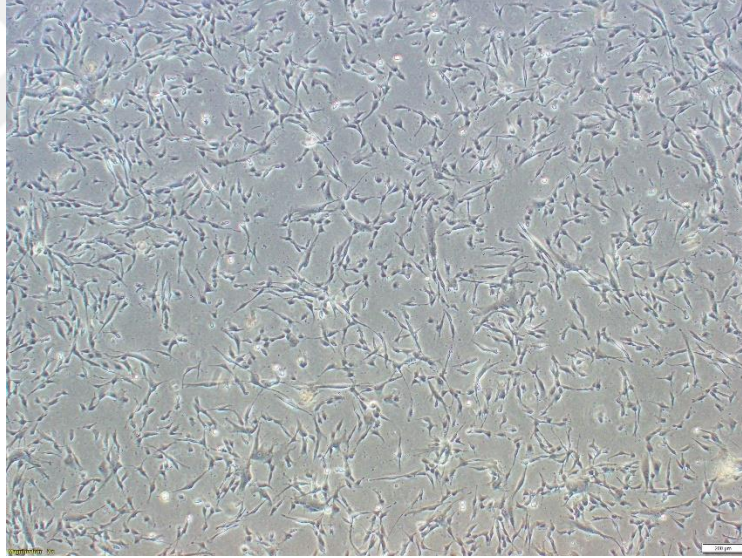


**Şekil 3.1.** Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin Pasaj 2 morfolojik görüntüsü. Boyut çubukları: 200  $\mu$ m





**Şekil 3.2.** Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin Pasaj 4 morfolojik görüntüsü. Boyut çubukları: 200  $\mu\text{m}$

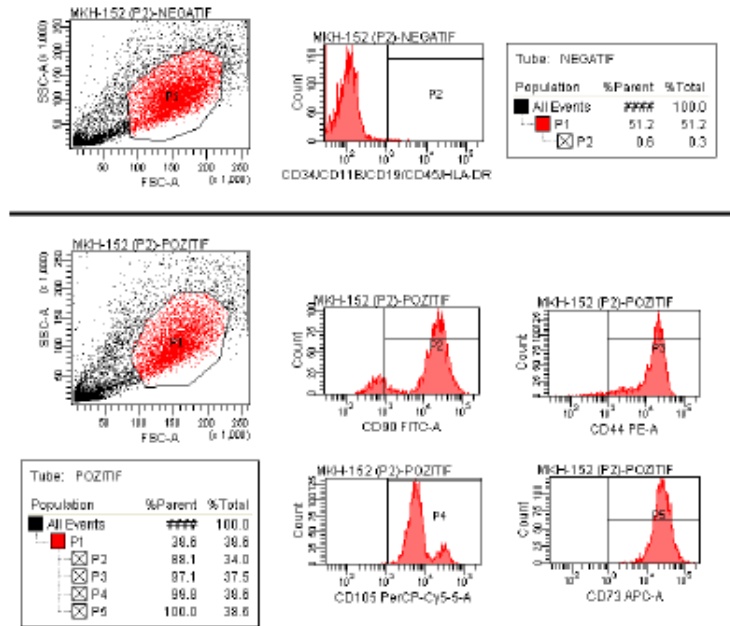


**Şekil 3.3.** Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin Pasaj 6 morfolojik görüntüsü. Boyut çubukları: 200  $\mu\text{m}$

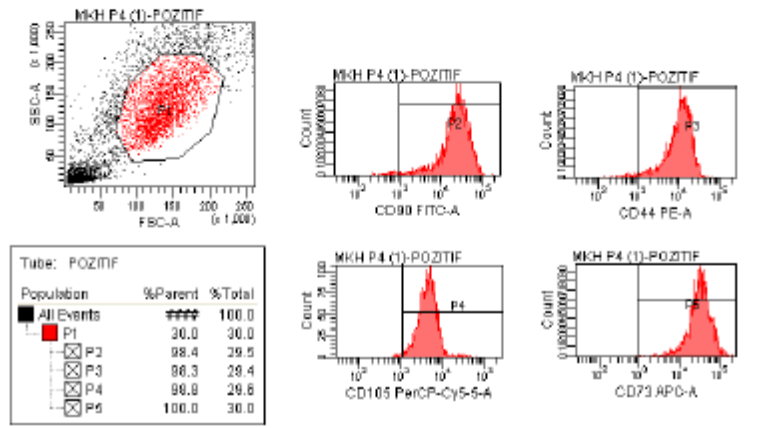
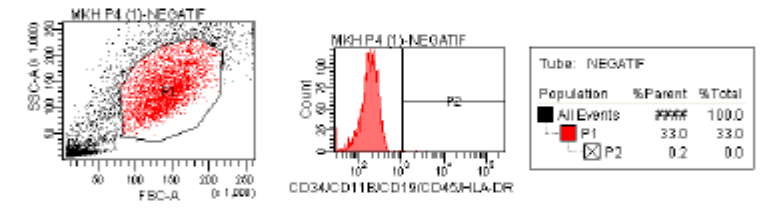
### 3.2. AKIM SİTOMETRİ İLE YÜZEY BELİRTEÇ SONUÇLARI

Akım sitometri tekniği hücre popülasyonunun fiziksel ve kimyasal karakteristik özelliklerini saptama, hücre sayımı, miks bir popülasyonda spesifik hücreleri seçebilme, biyobelirteçleri saptama ve kan kanserlerinde teşhis gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Akım sitometri cihazının çalışma prensibi kısaca süspansiyon haline getirilmiş hücre veya partikül topluluğu lazer ışınlarının içinden geçerken hücrelerden sapan lazer ışınları (Side-scattered light) ve hücreler tarafından yayılan floresan ışınlar bir araya getirilir, optik filtreler ve aynalarla farklı dalga boylarına ayrılarak analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır.

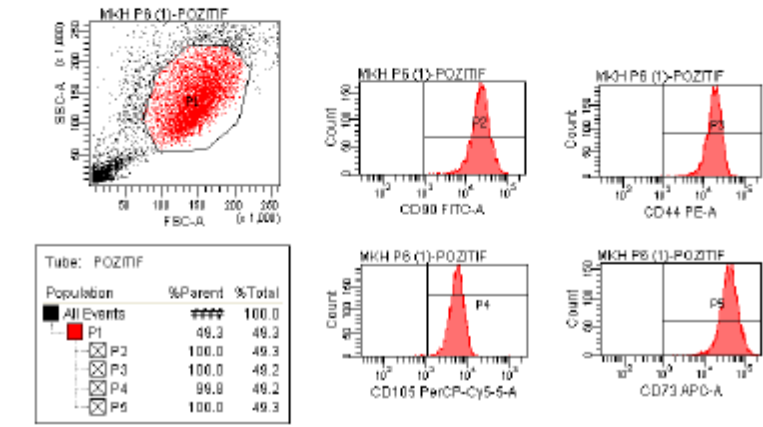
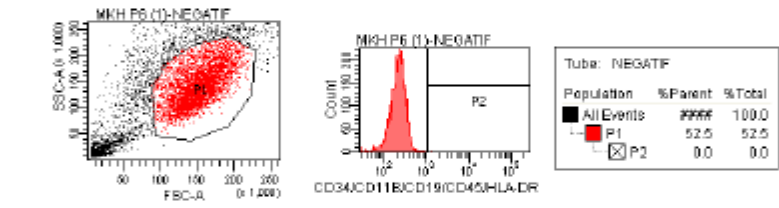
Human MSC Analysis (BD) kiti kullanılarak her bir pasaj için üç ayrı örneğin akım sitometri analizi yapılmıştır. Aşağıda verilen Şekil 3.4., 3.5. ve 3.6.'da her pasajın dot plot ve histogram görüntüleri bulunmaktadır. Ayrıca Tablo 3.1'de her bir pasaj için yapılan ölçümün sonuçları mevcuttur.



Şekil 3.4. P2 Dot plot ve histogram sonucu



Şekil 3.5. P4 Dot plot ve histogram sonucu



Şekil 3.6. P6 Dot plot ve histogram sonucu

Tablo 3.1. ve 3.2.'de görüldüğü gibi ISCT'nin mezenkimal kök hücreler için yüzey belirteçleri koşulu olan pozitif belirteçler için (CD90, CD44, CD105 ve CD73) %95'ten yüksek negatif belirteçler için (CD34/CD11b/CD19/CD45/HLA-DR) %2'den düşük veriler elde edilmesi koşulu bu çalışmada ileri pasajlar için sağlanmıştır. CD44, CD105 ve CD73 için pasaj numarası pozitif belirteçlere etki etmezken CD90 pasaj numarasından etkilenmiştir. Negatif belirteçler için de pasaj numarasıyla ilgili bir etkilenme söz konusu değildir. Üç okuma sonucunda elde edilen ortalama ekspresyon değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

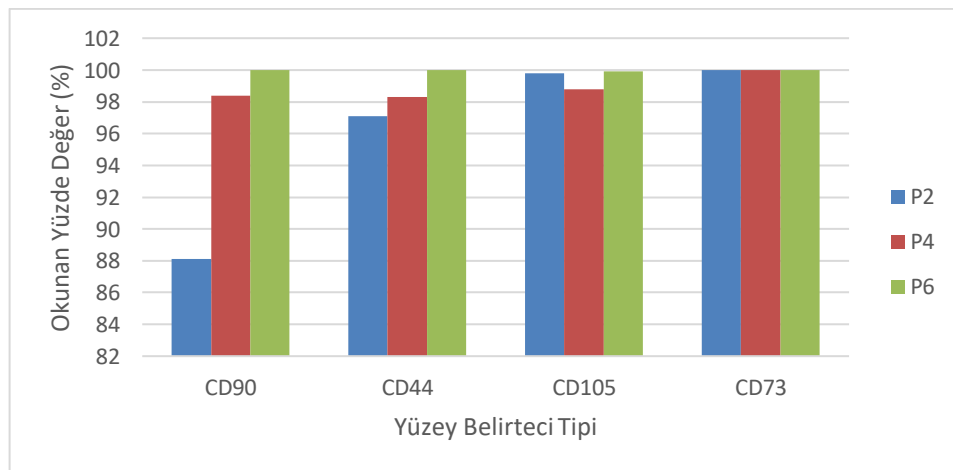
**Tablo 3.1.** P2, P4 ve P6 Akım Sitometri Pozitif Yüzey Belirteç Paneli Sonuçları

<b>ÖLÇÜM 1</b>				
	<b>CD90</b>	<b>CD44</b>	<b>CD105</b>	<b>CD73</b>
<b>P2</b>	88,1	97,1	99,8	100
<b>P4</b>	98,4	98,3	98,8	100
<b>P6</b>	100	100	99,9	100
<b>ÖLÇÜM 2</b>				
	<b>CD90</b>	<b>CD44</b>	<b>CD105</b>	<b>CD73</b>
<b>P2</b>	88,3	97,3	99,5	99,9
<b>P4</b>	99	98	98,6	100
<b>P6</b>	99,8	99	99,7	99,9
<b>ÖLÇÜM 3</b>				
	<b>CD90</b>	<b>CD44</b>	<b>CD105</b>	<b>CD73</b>
<b>P2</b>	88	96,9	99,7	99,8
<b>P4</b>	98,5	98,5	98,9	100
<b>P6</b>	100	99,8	99,5	100

**Tablo 3.2.** P2, P4 ve P6 Akım Sitometri Negatif Yüzey Belirteç Paneli Sonuçları

	<b>ÖLÇÜM 1</b>
	<b>CD34/CD11b/CD19/CD45/HLA-DR</b>
<b>P2</b>	0,6
<b>P4</b>	0,2
<b>P6</b>	0,1
	<b>ÖLÇÜM 2</b>
	<b>CD34/CD11b/CD19/CD45/HLA-DR</b>
<b>P2</b>	0,6
<b>P4</b>	0,2
<b>P6</b>	0,2
	<b>ÖLÇÜM 3</b>
	<b>CD34/CD11b/CD19/CD45/HLA-DR</b>
<b>P2</b>	0,5
<b>P4</b>	0,2
<b>P6</b>	0,2

Bu veriler kullanılarak Şekil 3.7.'de gösterilen grafik verileri elde edilmiştir. Bu veriler dikkate alınarak ilerleyen pasajlarda MKH belirteci olan CD90 ve CD44'de ekspresyon artarken CD105 ve CD73'de önemli bir değişim gözlemlenmemiştir.



**Şekil 3.7.** Üç farklı pasajda pozitif yüzey belirteçlerinin karşılaştırılması

### 3.3. RT-PZR SONUÇLARI

İleri pasajlarda stemness genleri (*OCT-4*, *SOX2*, *ZFP42* ve *TERT*), antiapoptotik (*BCL-2*) ve proapoptotik (*BAX*) genlerinin mRNA ifadelerinde değişiklik olup olmadığını görmek için floresan boya olarak SyberGreen'in kullanıldığı üç tekrarlı RT-PZR yapıldı. RT-PZR'da floresan sinyal miktarı gözlemlenebilmesi için gereken eşik değerini geçtiği nokta olan Ct değerleri Tablo 3.3.'de özetlenmiştir.

**Tablo 3.3.** Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6'da üç tekrarlı çalışılan genlerin Ct değerleri

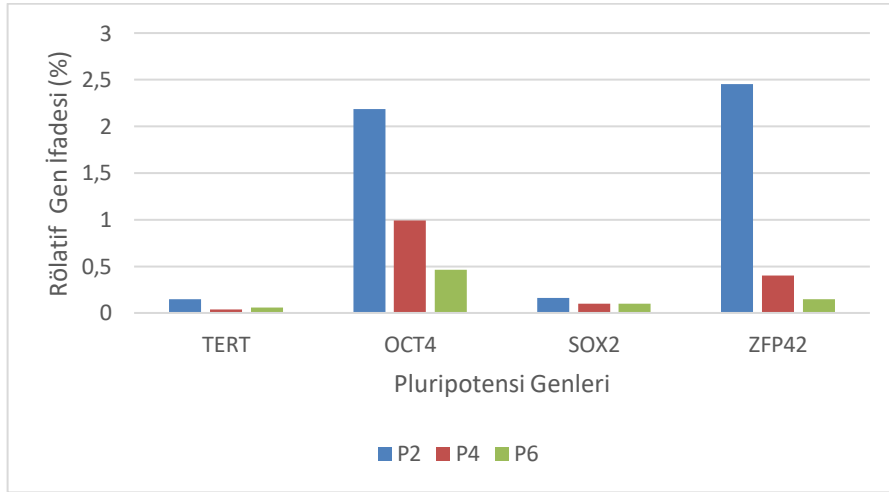
	<b>P2</b>	<b>P4</b>	<b>P6</b>
<i>TERT</i>	33,39	32,24	31,22
<i>TERT</i>	33,13	32,04	31,77
<i>TERT</i>	31,93	31,87	32,68
<i>OCT-4</i>	29,36	26,6	29,15
<i>OCT-4</i>	27,57	27,54	28,33
<i>OCT-4</i>	29,84	27,5	29,27
<i>SOX2</i>	32,26	31,58	31,75
<i>SOX2</i>	32,74	31,68	31,85
<i>SOX2</i>	33,15	28,28	29,8
<i>ZFP42</i>	29,24	28,67	31,46
<i>ZFP42</i>	28,49	28,78	29,98
<i>ZFP42</i>	28,54	28,14	30,31
<i>BCL-2</i>	25,68	26,18	24,35
<i>BCL-2</i>	26,39	26,01	26,07
<i>BCL-2</i>	26,48	26,03	25,14
<i>BAX</i>	27,24	26,28	25,25
<i>BAX</i>	26,61	26,12	24,98
<i>BAX</i>	27,12	26,12	25,52
<i>GAPDH</i>	23,59	21,38	21,62
<i>GAPDH</i>	23,04	20,41	20,92
<i>GAPDH</i>	23,59	19,88	20,92
<b>BLANK</b>	0	0	0

Hedef genlerin Ct değerlerinin ortalaması ile İnternal standardın Ct değerlerinin ortalamasının arasındaki fark ile Delta-ct değerleri bulunmuştur. Delta-Delta Ct ile örnekler arasındaki rölaf kat değişimi bulundu. Bu veriler, aşağıda bulunan tablo 3.4.'de özetlenmiştir.

**Tablo 3.4.** Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6'da Rölafif gen ifadelerinin yüzde değerleri

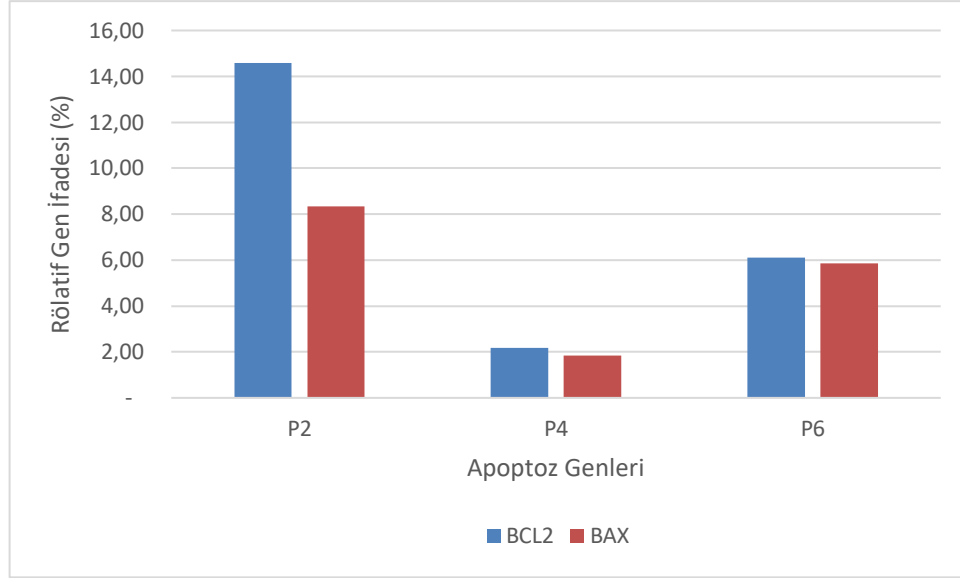
	<b>P2</b>	<b>P4</b>	<b>P6</b>
<b><i>TERT</i></b>	0,15	0,03	0,06
<b><i>OCT-4</i></b>	2,18	0,99	0,46
<b><i>SOX2</i></b>	0,16	0,10	0,10
<b><i>ZFP42</i></b>	2,45	0,40	0,14
<b><i>BCL-2</i></b>	14,59	2,18	6,11
<b><i>BAX</i></b>	8,34	1,87	5,84

Stemness genleri için P2, P4, P6'da elde edilen sonuçlar Şekil 3.8.'de verilen grafikte açıklanmıştır. Bu veriye göre test edilen genler (*TERT*, *OCT-4*, *SOX2*, *ZFP42*) ilerleyen pasajlarda daha düşük ifade göstermiştir. Ancak *TERT* için pasaj4, pasaj 6'ya göre daha düşük ifade göstermiştir.



**Şekil 3.8.** Üç farklı pasajda pluripotensi genlerinin rölafif gen ifadelerinin karşılaştırması

Bir diğer parametre olan apoptoz genleri *BCL-2* ve *BAX* P4'te diğer pasajlara göre daha dengeli seviyelerde bulunmuştur. Bu durum Şekil 3.9.'daki grafikte açıklanmıştır.



**Şekil 3.9.** Üç farklı pasajda apoptoz genlerinin rölatif gen ifadelerinin karşılaştırması

#### 3.4. TELOMERAZ AKTİVİTESİ SONUÇLARI

P2, P4 ve P6 için yürütülen telomeraz aktivitesi testi sonuçları Tablo 3.5.'de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6'da rölatif telomeraz aktivitesi (RTA) sonuçları

<b>KONTROL VERİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ</b>	
<b>NEGATİF KONTROL</b>	0,09
<b>POZİTİF KONTROL</b>	0,5
<b>ÖRNEKLERİN RTA VERİLERİ</b>	
<b>P2</b>	9289 ± 51,90
<b>P4</b>	5253 ± 109,2
<b>P6</b>	126,1 ± 3,517

Negatif kontrol örneği, kitin önerisi üzerine 0,1'den küçük olmalıdır. Tablo 3.5.'de görüldüğü üzere kontrol verisi bu değer altında saptanmıştır. Pozitif kontrol ise kitle verilen low kontrolün kullanılması nedeniyle 0,3-0,8 aralığında beklenmiş ve 0,5 verisi elde edilmiştir. Bu sonuçlar testin doğru çalışıldığını ispat etmektedir.

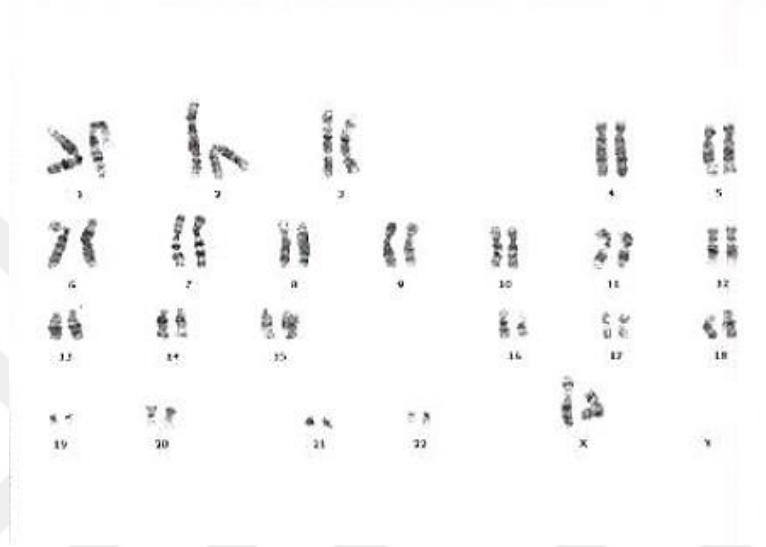
P2, P4 ve P6 örnekleri için elde edilen RTA değerleri, artan pasaj numarasına oranla düşüş göstermiştir. Bu beklenen sonuç, pasaj numarası artışı ile kök hücre



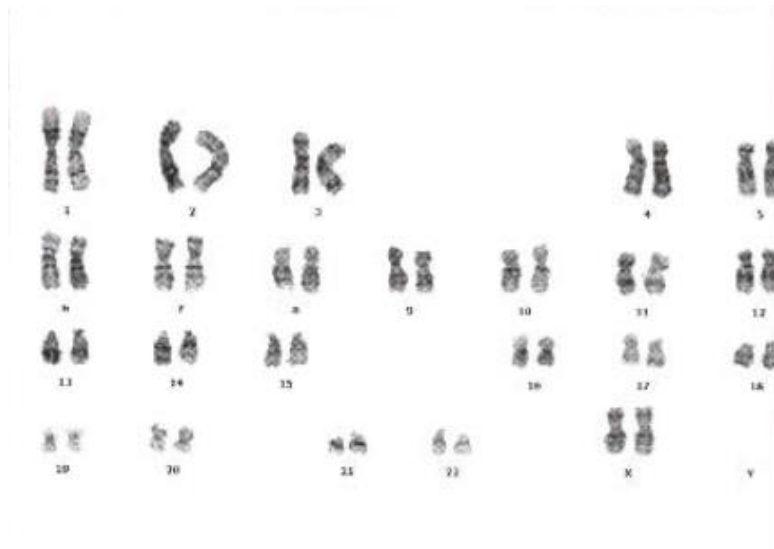
özelliklerinin de artış gösterdiğini, kanserleşme vb bir dönüşüm söz konusu olmadığını gösterir.

### 3.5. KARYOTİP SONUÇLARI

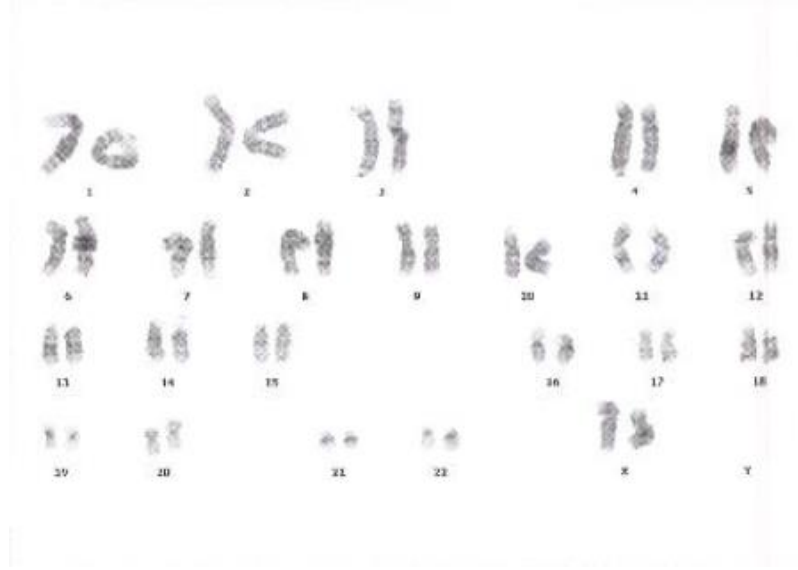
Yapılan kromozom analizinde üç farklı pasajda da herhangi bir kromozom analizine rastlanmamıştır.



Şekil 3.10. P2 Karyotip Sonuçları



Şekil 3.11. P4 Karyotip Sonuçları



**Şekil 3.12.** P6 Karyotip Sonuçları

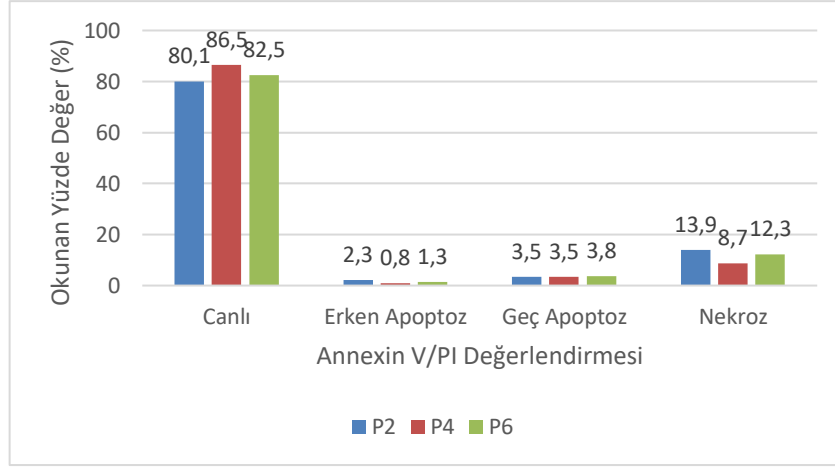
### 3.6. AKIM SİTOMETRİ İLE APOPTOZ SONUÇLARI

Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6 için akım sitometri yöntemi ile üç tekrarlı ölçüm yapılmış ve 10000 hücre sayılmasıyla sonuçların yüzde ortalaması Tablo 3.6.'da verilmiştir.

**Tablo 3.6.** P2, P4 ve P6 Akım Sitometri Apoptoz Sonuçları

	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz
<b>P2</b>	80,1	2,3	3,5	13,9
<b>P4</b>	86,5	0,8	3,5	8,7
<b>P6</b>	82,5	1,3	3,8	12,3

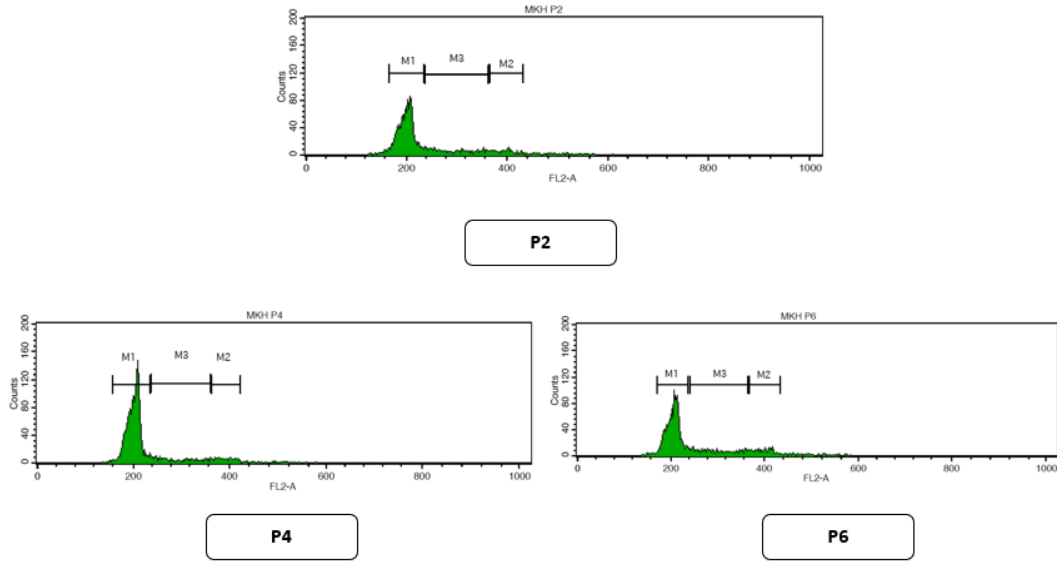
Bu veriler kullanılarak hazırlanan Şekil 3.13.'de bulunan grafikte görüldüğü üzere en yüksek canlı hücre yüzdesi P4'te, en düşük erken apoptoz evresinde olan hücre yüzdesi P4'te, en düşük geç apoptoz evresinde olan hücre yüzdesi P2 ve P4'te eşit ve en düşük nekroze olmuş hücre yüzdesi P4'te edildi.



**Şekil 3.13.** Pasaj 2, Pasaj 4 ve Pasaj 6’da Apoptoz Değerlerinin Karşılaştırılması

### 3.7. AKIM SİTOMETRİ İLE HÜCRE DÖNGÜSÜ SONUÇLARI

Şekil 3.14’te her pasaj için üç tekrarlı yapılmış ölçüm sonuçlarından birer örnek eklenmiştir.

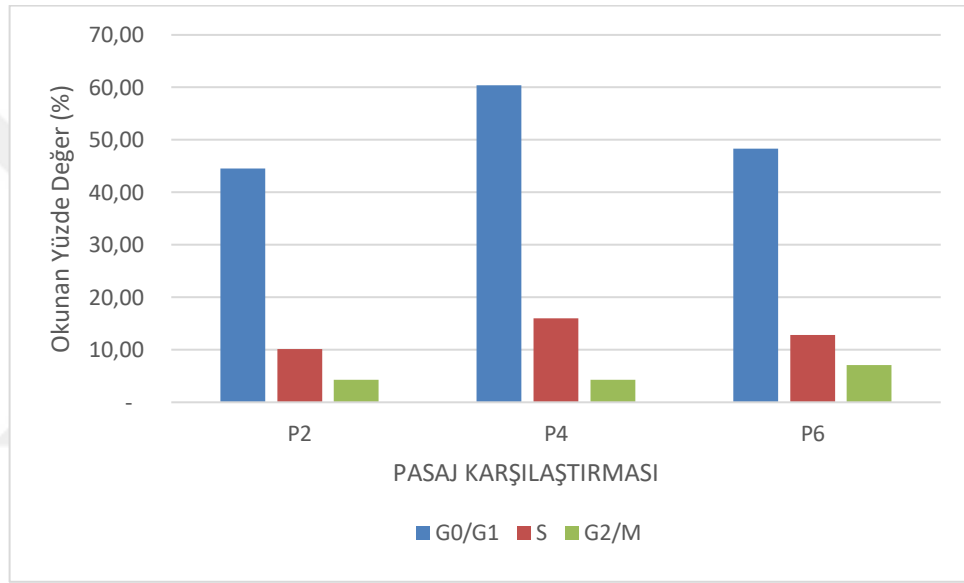


**Şekil 3.14.** P2, P4 ve P6’nın akım sitometri histogram görüntüleri

Her pasaj için ölçüm sonuçlarının ortalaması Tablo 3.7.’de yer almaktadır. Tablodaki sonuçlara göre hazırlanan Şekil 3.15’te yer alan grafikte de görüldüğü üzere G0/G1 evresi en yüksek P4’te, Sentez fazı evresi en yüksek P6’da ve G2/M evresi en yüksek P6’da görülmektedir.

**Tablo 3.7.** P2, P4 ve P6 hücre döngüsü evrelerinin yüzde değerleri

	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>G2/M</b>
<b>P2</b>	44,57	10,14	4,31
<b>P4</b>	60,37	16,00	4,28
<b>P6</b>	48,34	12,78	7,12



**Şekil 3.15.** P2, P4 ve P6 hücre döngüsü evrelerinin karşılaştırılması

#### 4. TARTIŞMA

1970'lerin başında hematopoietik olmayan, morfolojisi fibroblast benzeri, plastik kabına yapışabilme özellikleriyle kemik iliğinde keşfedilen kök hücreye son yıllarda klinik uygulamalarda ilgi büyük oranda artmaktadır (Friedenstein, Chailakhyan, Latsinik, Panasyuk, & Keiliss-Borok, 1974). Kök hücrelerin en önemli özelliği olan farklı soylara farklılaşabilme özellikleri onları hücrel tedavide ön plana çıkarmaktadır (Pittenger, ve diğerleri, 1999).

GK-MKH'lerinin invaziv bir işlem gerektirmemesi, diğer MKH kaynaklarında bulunmayan HLA-G6'yı ifade etmesi (Marino, ve diğerleri, 2019), diğer MKH kaynaklarına göre daha yüksek proliferasyon özelliği ve yetişkin kök hücre sınıfında yer alıyor olsa da embriyonik kök hücrelere benzer gen ifadesi profili sayesinde daha avantajlı bir kaynaktır (Arutyunyan, Elchaninov, Makarov, & Fatkhudinov, 2016). Klinikte MKH uygulaması için istenen protokoller genelde tedavi başına 20-100x10<sup>6</sup> hücre gerektirmektedir bu nedenle bu kadar yüksek miktarda hücre elde edebilmek için transplantasyondan birkaç hafta önce hücreleri kültürde çoğaltmak gerekmektedir (Drela, Stanaszek, Nowakowski, Kuczynska, & Lukomska, 2019) ve genellikle Pasaj 3 veya Pasaj 5 kullanılması önerilmektedir (Zhao, ve diğerleri, 2015) .

Ancak in vitroda MKH'lerin somatik hücrelerde olduğu gibi yaşam ömürleri kısıtlıdır. Çeşitli çalışmalarda gösterdiği gibi MKH'lerin uzun kültürleri yapıldığında hücrelerde morfolojik değişiklikler, telomer kısalması, apoptozda artış, immunfenotiplemede azalma görülmüştür (Gu, ve diğerleri, 2016).

Bu çalışmada İyi Üretim Uygulamaları laboratuvarında insan göbek kordonunun Wharton jeli bölgesinden mezenkimal kök hücreler eksplant kültür yöntemi ile izole edilmiş ve farklı pasajlarda (P2, P4, P6) morfolojik analizi, immunfenotiplemesi, pluripotensi ve apoptoz genleri, telomeraz aktivitesi, karyotipi, apoptoz durumu ve hücre döngüsü karşılaştırılarak klinik uygulama için kullanılacak en uygun pasaj belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bruyn ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada eksplant kültür metodu ile izolasyonu gerçekleştirilen GK-MKH'ların izolasyonunda erken pasajlarda morfolojisi endotel benzeri hücreler görülmüştür. Yine aynı çalışmada yapılan immunfenotipleme analizinde CD90 ve CD73'ün ifadesi erken pasajlarda görülmemiş ancak ilerleyen pasajlarda endotel benzeri hücrelerin ortadan kalkarak yerine sadece fibroblast benzeri kök hücrelerin kaldığını ve CD90 ve CD73'ün

ifadesinde artış meydana geldiğini görmüşlerdir (De Bruyn, ve diğerleri, 2011). Yapılan bu çalışmada P2’de düşük ifade edilen CD90’nın sebebinin eksplant kültür sırasında meydana gelen epitel kontaminasyonu olabileceğini düşündürmektedir. P4’te bu kontaminasyonun ortadan kalktığı ve saf MKH popülasyonu kaldığını akım sitometri sonuçlarında görmekteyiz.

Greco ve ark. WJ-MKH’lerinin EKH’lerde yüksek olarak ifade edilen pluripotensi belirteçlerini EKH’lere göre düşük ancak diğer yetişkin MKH’lere göre yüksek ifade etmesiyle embriyonik kök hücreler ile yetişkin kök hücreler arasında yer aldığını söylemektedir (Greco, Liu, & Rameshwar, 2007). Telomerlerin kısalmasını engelleyerek hücre yaşlanmanın önüne geçen telomeraz enzimini kodlayan *TERT* geninin yüksek ifadesi mezenkimal kök hücrelerde proliferasyon kapasitesini arttırmaktadır ancak sınırsız bölünme yeteneği kazanması ile tümoreneze meydana gelme riski de bulunmaktadır (Seluanov, ve diğerleri, 2008), (de Lange, 1994). *OCT-4* ve *SOX2* kök hücrelerde pluripotensinin transkripsiyon faktörleri olup embriyonik kök hücrelerde yüksek seviyelerde ifade edilerek kendini yenileme fenotipini gösterir. *OCT-4*, *SOX2* ile birlikte embriyoda hücrelerin farklılaşmayla ilişkili genleri inhibe ederek embriyoyu pluripotent evrede tutarlar (Han, ve diğerleri, 2014). *ZFP42* blastosistin İHK’de hücrelerde ifade ediliyor olup bu hücreleri pluripotent evrede tutar (Son, CHOI, HAN, & Cho, 2013). Çalışmamızda erken pasaj olan P2’de *TERT*, *OCT-4*, *SOX2* ve *ZFP42* genleri için diğer pasajlara kıyasla en yüksek değerleri göstermiş ve pasaj sayısı arttıkça bu belirteçlerin de düştüğünü görülmüştür. Daha ileri pasajlarda kök hücrelerin pluripotensi özelliklerini yitirecekler böylece kök hücre karakteristiğinden çıkacaklardır bu nedenle klinik uygulamalarda erken pasaj kullanmak daha faydalıdır ancak hastaya uygulama için gereken hücre sayısını genelde Pasaj 2’nin karşılayamayacağı için Pasaj 4 daha uygun bir adaydır.

Kök hücrelerde bölünme sayısı sınırlı olduğundan pasaj sayısı arttıkça telomer kısalmasına bağlı olarak replikatif yaşlanma meydana gelmekte ve apoptoz indüklenerek hücre ölümü meydana gelmektedir. *BCL-2* protein ailesi apoptozun inhibe edici ve uyarıcı olmak üzere regülatör genlerini içermektedir. *BCL-2*’nin aşırı ifade edildiği zaman apoptozdan koruduğu, *BAX*’ın aşırı ifade edildiği zaman ise apoptozu uyardığı görülmüştür (Jin , ve diğerleri, 2016). Ardehali ve ark. yaptığı çalışmada *BCL-2* ifadesi insan embriyonik kök hücrelerinde aşırı ifade edildiği durumlarda apoptoza direnç geliştirmekte ve teratom oluşumu geliştirmektedir (Ardehali, ve diğerleri, 2011). *BCL-2*, *BAX*’ın ifadesini inhibe ederek apoptozu inhibe etmektedir.

Tersi durumda da mitokondrinin dış membranında bulunan *BCL-2*'yi inhibe eden *BAX* mitokondri membranının por oluşumuna neden olarak mitokondriyal apoptozu başlatabilmektedir (Khodapasand, Jafarzadeh, Farrokhi, Kamalidehghan, & Houshmand, 2015). Bu iki büyük apoptozun düzenleyici genlerinin hücreye dışarıdan herhangi başka bir ölüm uyararı yok ise hücrenin apoptoz yolağının aktivasyonunun belirlenmesi açısından önemlidir (Yu, ve diğerleri, 2008). Yapılan çalışmada *BCL-2* ve *BAX* oranının en dengede olduğu pasaj P4 olarak bulunmuştur. Normal hücrede hücre membranının iç yüzeye bakan tarafında bulunan fosfotidilserin hücre apoptozu kararlaştırıldığında plazma iç membranından dış membranına dönmektedir. Bu da hücre dışı çevre için hücrenin apoptozu girdiğini ve fagositozla ortadan kaldırılması için bir tabela görevi görmesini sağlamaktadır. Erken apoptozun belirteci olan fosfotidilserine yüksek afinitesi olan Annexin V akım sitometrisinde hücrenin apoptoz durumu hakkında bilgi vermektedir. Apoptozun ilerleyen evrelerin DNA fragmentasyonu ile apoptozun geç evresine girildiği anlaşılmaktadır (Wlodkovic, Skommer, & Darzynkiewicz, 2009). Yapılan çalışmada karşılaştırılan pasajlar arasında en yüksek canlı hücre yüzdesi ve en düşük apoptoz yüzdesi Pasaj 4'te elde edilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* kültür ortamında morfolojik, immunfenotipik, gen ifadesinde değişiklik, apoptozda artış gibi meydana gelen değişikliklerin yanı sıra hücre döngüsünde de değişiklikler meydana gelmektedir. Gu ve ark. yaptığı çalışmada Pasaj 4'ten Pasaj 17'ye kadar yaptıkları uzun kültürde G1 evresinde artış ve sentez evresinde azalma görmüşlerdir (Gu, ve diğerleri, 2016). Yapılan bu çalışmada ise karşılaştırılan pasajlar arasında G1 ve Sentez evresindeki en yüksek yüzdeyi Pasaj 4 vermiştir.

Sonuç olarak mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımı için literatüründe desteklediği ve yapılan bu çalışmanın da sonucu ile birlikte kullanılacak en uygun pasajın pasaj 4 olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKÇA

- Ardehali, R., Inlay, M., Ali, S., Tang, C., Drukker, M., & Weissman, I. (2011). Overexpression of BCL2 enhances survival of human embryonic stem cells during stress and obviates the requirement for serum factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 3282-3287.
- Arutyunyan, I., Elchaninov, A., Makarov, A., & Fatkhudinov, T. (2016). Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cell International*, 1-13.
- Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B., & Ashammakhi, N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, 170-179.
- BAX Gene*. (tarih yok). GeneCards: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BAX> adresinden alındı
- BCL2 gene*. (tarih yok). gene card: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2&keywords=bax> adresinden alındı
- BCL2 Gene*. (tarih yok). GeneCards: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2> adresinden alındı
- BCL2 GENE*. (tarih yok). Gene Card: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2&keywords=bax> adresinden alındı
- Becker, A., McCulloch, E., & Till, J. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 1-3.
- Can, A. (2013). *Kök Hücre*. Ankara: Akademisyen Yayınları.
- Chen, X., Shoudong, Y., & Ying, Q.-L. (2015). Stem cell maintenance by manipulating signaling pathways: past, current and future. *BMB Reports*, 669.
- ClinicalTrials.gov. (tarih yok). ClinicalTrials.gov: <https://clinicaltrials.gov/> adresinden alındı
- Coşkun, G., & Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 145-156.
- Counter, C., Avilion, A., LeFeuvrel, C., Stewart, N., Greider, C., Harley, C., & Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO Journal*, 1921-1927.
- De Bruyn, C., Najar, M., Raicevic, G., Meuleman, N., Pieters, K., & Stamatopoulos, B. (2011). A Rapid, Simple, and Reproducible Method for the Isolation of Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly Without Enzymatic Treatment. *Stem Cells And Development*, 545-556.
- de Lange, T. (1994). Activation of Telomerase in a Human Tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*.
- Dietz, A., Padley, D., & Gastineau, D. (2007). Infrastructure development for human cell therapy translation. *Clin Pharmacology and Therapeutics*, 320-324.
- Ding, D.-C., Chang, Y.-H., Shyu, W.-C., & Lin, S.-Z. (2015). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. *Cell Transplantation*, 340-342.
- Dominici, M., Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., & Krause, D. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 1.



Drela, K., Stanaszek, L., Nowakowski, A., Kuczynska, Z., & Lukomska, B. (2019). Experimental Strategies of Mesenchymal Stem Cell Propagation: Adverse Events and Potential Risk of Functional Changes. *Stem Cells International*, 1-9.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 495-513.

Friedenstein, A., Chailakhyan, R., Latsinik, N., Panasyuk, A., & Keiliss-Borok, I. (1974). Stromal Cells Responsible For Transferring The Microenvironment Of The Hemopoietic Tissues: Cloning In Vitro and Retransplantation In Vivo. *Transplantation*, 331-340.

Greco, S., Liu, K., & Rameshwar, P. (2007). Functional Similarities Among Genes Regulated by Oct4 in Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 3143-3154.

Gu, Y., Li, T., Ding, Y., Sun, L., Tu, T., Zhu, W., . . . Sun, X. (2016). Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 5208-5214.

Han, S.-M., Han, S.-H., Coh, Y.-R., Jang, G., Ra, J., & Kang, S.-K. (2014). Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 1-2.

Han, S.-M., Han, S., Coh, Y.-R., Jang, G., Chan Ra, J., Kang, S.-K., . . . Youn, H.-Y. (2014). Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Nature*, 1-3.

Harley, C., Futcher, A., & Grei, C. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 39-42.

Holden, C. (2007). Versatile Stem Cells Without the Ethical Baggage? *Science*, 170.

Jin, S., Li, H., Han, M., Ruan, M., Liu, Z., & Zhang, F. (2016). Mesenchymal Stem Cells with Enhanced Bcl-2 Expression Promote Liver Recovery in a Rat Model of Hepatic Cirrhosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 1118.

Kalaszczynska, I., & Ferdyn, K. (2015). Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance. *BioMed Research International*, 1-8.

Kassem, M. (2004). Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Potential Clinical Applications. *Cloning and Stem Cells*, 369-374.

Kerr, J., Currie, A., & Wyllie, A. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications In Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*, 239-256.

Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B., & Houshmand, M. (2015). Is Bax/Bcl-2 Ratio Considered as a Prognostic Marker with Age and Tumor Location in Colorectal Cancer? *Iranian Biomedical Journal*, 69-75.

Lazarus, H., Haynesworth, S., Gerson, S., Rosenthal, N., & Caplan, A. (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*, 557-564.

Mankikar, S. D. (2010). Stem Cells: A New Paradigm in Medical Therapeutics. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* Volume 20 Issue 3, 1.

Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., . . . Selleri, C. (2019). Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *International Journal of Stem Cells*, 220-221.

Mason, C., & Dunnill, P. (2007). A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine* Vol3, No 1, 1.

- Musial-Wysocka, A., Kot, M., Sulkowski, M., Badyra, B., & Majka, M. (2019). Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency. *International Journal of Molecular Sciences*, 2.
- Norbury, C., & Hickson, I. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 367-389.
- OpenStax College. (2018). Regulation at Internal Checkpoints. *Biology* (s. 286). içinde
- Osińska, I., Popko, K., & Demkow, U. (2014). Perforin: an important player in immune response. *Central European Journal of Immunology*, 109-114.
- Öniz, H. (2004). Apoptoz: Ölmeye Yatınak . SSK Tepecik Hastane Dergisi , 2-19.
- Paladino, F. V., Rodrigues, J., Silva, A., & Goldberg, A. C. (2019). The Immunomodulatory Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Stem Cells International*, 1-5.
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., . . . Marshak, D. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* , 143-147.
- POU5F1 Gene.* (tarih yok). GeneCards: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=POU5F1&keywords=pou5f1> adresinden alındı
- Rudolph, K. (2008). Telomerase and Aging . K. L. Rudolph içinde, *Telomeres and Telomerase in Ageing, Disease, and Cancer* (s. 78-79). Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sağsöz, H., & Ketani, A. M. (2008). Kök Hücreler. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakülte Dergisi, 31.
- Sandner, B., Prang, P., Rivera, F. J., Aigner, L., Blesch, A., & Weidner, N. (2012). Neural stem cells for spinal cord repair. *Cell and Tissue Research*, 352.
- Seluanov, A., Hine, C., Bozzella, M., Hall, A., Sasahara, T., & Ribeiro, A. (2008). Distinct tumor suppressor mechanisms evolve in rodent species that differ in size and lifespan. *Aging Cell*, 1-7.
- Shahriyari, L., & Komarova, N. L. (2013). Symmetric vs. Asymmetric Stem Cell Divisions: An Adaptation against Cancer? *Plos One*, 1-2.
- Simonsen, J., Rosada, C., Serakıncı, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S., . . . Kassem, M. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *nature biotechnology*, 592.
- Smith, S., Neaves, W., Teitelbaum, S., Prentice, D. A., & Tarne, G. (2007). *Science*. Adult Versus Embryonic Stem Cells: Treatments, 1422-1425.
- Son, M.-Y., Choi, H., Han, Y.-M., & Cho, Y. S. (2013). Unveiling the Critical Role of REX1 in the Regulation of Human Stem Cell Pluripotency. *Stem Cells*, 2374-2375.
- SOX2 Gene.* (tarih yok). GeneCards: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOX2&keywords=pou5f1> adresinden alındı
- TERT Gene.* (tarih yok). GeneCards: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TERT> adresinden alındı
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*, 697-707.
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 11.
- Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 440-442.

Vermeulen , K., Van Bockstaele, D., & Berneman, Z. (2003). The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Proliferation*, 131.

Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 1-9.

Wlodkowic, D., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Molecular Biology*, 1-14.

Yalçın, B. (2013). Major doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülleri: genel özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi. *Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi*, 12-16.

Yılmaz, F., & Tekmen, I. (2018). Blastosist gelişimi; hücre soylarının farklanma. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 244-247.

Yu, C.-X., Zhang, X.-Q., Kang, L.-D., Zhang, P.-J., Chen, W.-w., & Liu, W.-w. (2008). Emodin Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cell LNCaP . *Asian journal of andrology*, 625-634.

*ZFP42 Gene.* (tarih yok). GeneCards: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZFP42&keywords=zfp42> adresinden alındı

Zhao, K., Lou, R., Huang, F., Peng, Y., Jaing, Z., & Huang, K. (2015). Immunomodulation Effects of Mesenchymal Stromal Cells on Acute Graft-Versus-Host Disease After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.*, 97-100.