

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

TESTOSTERON PROPİYONATIN KEMİK İLİĞİ
KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
PROLİFERASYON VE CANLILIĞINA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAŞAK ARU

OCAK 2016

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

TESTOSTERON PROPİYONATIN KEMİK İLİĞİ
KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
PROLİFERASYON VE CANLILIĞINA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAŞAK ARU

DANIŞMAN

DOÇ. DR. GÜLDEREN YANIKKAYA DEMİREL

OCAK 2016

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı
Tez Başlığı : Testosteron Propiyonatın Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyon ve Canlılığına Etkisi
Tez Sahibi : Başak ARU
Sınav Tarihi : 12.01.2016

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Turgay İSBİR

Yeditepe Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Moleküler Tıp
Anabilim Dalı Başkanı

Tez danışmanı:

Doç Dr Gülderen
YANIKKAYA DEMİREL

Üye:

Yeditepe Üniversitesi
İmmunoloji Anabilim Dalı
Doç Dr Esin AKTAŞ
İstanbul Üniversitesi DETAE
İmmunoloji Anabilim Dalı

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 19.../01.../2016 tarih ve 02.../...sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Ocak 2016
Başak Aru

Aileme



Bu çalışmayı yapmamı mümkün kılan hocam Doç. Dr. Gülderen Yanıkkaya Demirel'e; laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Doktora öğrencileri Fatma Tuba Akdeniz, Zeynep Akbulut ve Gökhan Terzioğlu'na; Biyolog Sema Aktaş, Biyolog Hüsniye Dağdeviren ve Biyolog Ebru Baktemur'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ocak 2016

Başak Aru



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI	iii
BEYAN	iv
İTHAF	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	xi
SUMMARY	xiv
TÜRKÇE ÖZET	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Tez çalışmasının amacı	1
2. GENEL BİLGİ	2
2.1. Mezenkimal Kök Hücre Kavramının Ortaya Çıkışı	2
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler: Tarihçe	4
2.3. MKH Kaynakları	5
2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakteristik Özellikleri	6
2.5. MKH'lerin İmmünolojik Özellikleri	9
2.5.1. İnflamasyonun Erken Safhalarında MKH'lerin Etkileri	9
2.5.2. Doğal İmmün Yanıtın Düzenlenmesinde MKH'ler	10
2.5.2.1. MKH'ler ve Makrofaj Polarizasyonu	10
2.5.2.2. MKH'ler ve Doğal Öldürücü Hücreler	11
2.5.3. Adaptif İmmün Yanıtın Düzenlenmesinde MKH'ler	11
2.5.3.1. MKH'ler ve Effektör T Hücreler	11
2.5.3.2. MKH'ler ve Düzenleyici T Hücreler (Treg)	11
2.5.3.3. MKH'ler ve B Hücreler	12
2.6. MKH'lerin Farklılaşmalarının Düzenlenmesi	12
2.6.1. Osteojenik Farklılaşma	13
2.6.2. Adipojenik Farklılaşma	15
2.6.3. Kondrojenik Farklılaşma	16
2.7. MKH'lerin Terapötik Etkileri ve Tedavilerde Kullanımı	17
2.7.1. Graft Versus Host Disease (GVHD)	18
2.7.2. Miyokard Enfarktüsü	19
2.7.3. Osteoartrit	20
2.7.4. Karaciğer Fibrozu	21
2.7.5. Diyabet	23
2.7.6. Merkezi Sinir Sistemi Hastalıkları	24
2.7.7. Kök Hücrelerden Elde Edilen Bir İlaç: Prochymal	25

2.8. Testosteron	26
2.8.1. Testosteron Sentezi ve Etkileri	26
2.8.2. Testosteronun Kemikler Üzerindeki Etkisi	30
2.8.3. Testosteronun Kas Kütlesi Üzerindeki Etkisi	30
2.8.4. Testosteronun Hematopoez Üzerindeki Etkisi	30
2.8.5. Testosteronun Beyin Üzerindeki Etkisi	30
2.8.6. Kadınlarda Post-Menopozal Dönemde Testosteronun Etkisi	31
3.YÖNTEM	32
3.1.Hücre Kültürü	32
3.2.Testosteron Propiyonatın Hazırlanması	34
3.3.Hücre Proliferasyonunun Tayini	34
3.4.Hücre Canlılığının ve Apoptozun Tayini	35
3.5.İstatistiksel İncelemeler	37
4.BULGULAR	38
4.1. CFSE Proliferasyon Ölçümleri	38
4.1.1. 24. Saat CFSE Karşılaştırmaları	39
4.1.2. 0. ve 24. Saat Proliferasyon Karşılaştırmaları	39
4.1.3. Ölçümler Arası Karşılaştırma	42
4.2. Annexin V – Propidyum İyodit Apoptoz Analizi	43
4.2.1. Apoptoz Yoğunlukları	44
4.2.2. Canlı Hücre Yoğunlukları	45
4.2.3. Nekroz Yoğunlukları	46
4.2.4. Erken Apoptoz Yoğunlukları	47
4.2.5. 0. ve 24. Saat Canlılık ve Apoptoz Karşılaştırmaları	48
4.2.6. Ölçümler Arası Karşılaştırma	49
4.3. Sonuç	51
5.TARTIŞMA	52
6.REFERANSLAR	56
7.EKLER	68
Ek 1: CFSE Akan Hücre Ölçer Grafikleri ve Veriler	68
Ek 2: Annexin V – PI Akan Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri	73
Ek 3: Hücre Yüzey Belirteçleri Akan Hücre Ölçer Analizinin Histogram Grafikleri	77
8.CV	78

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1: Testosteronun cinsiyete göre etkileri	28
Tablo 2.2: Testosteronun vücuttaki etkisinin özeti	29
Tablo 3.1: CFSE boyaması akış şeması	34
Tablo 3.2: Annexin V – PI boyaması akış şeması	37
Tablo 4.1: Grupların 0.saat ve 24.saat nesil sayılarının değerlendirilmesi	38
Tablo 4.2: Nesil sayısının doza bağlı değişimi	38
Tablo 4.3: Hücre nesil sayısının doza bağlı değişimi	42
Tablo 4.4: 24. saatte CFSE ölçümlerinin uyum değerlendirmesi	42
Tablo 4.5: Grupların 0. ve 24.saat hücre yoğunluklarının değerlendirilmesi	43
Tablo 4.6: Canlılığın doza bağlı değişimi	46
Tablo 4.7: 0. ve 24. saatlerde canlılığın değişimi	50
Tablo 4.8: 24. saatte Annexin V - PI ölçümlerinin uyum değerlendirmesi	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması	5
Şekil 2.2: MKH kendilerini yenileme ve farklılaşmalarında görevli genler	7
Şekil 2.3: Mezenkimal kök hücre kültürü	8
Şekil 2.4: MKH'lerin immün sistem hücreleri ile etkileşimleri	9
Şekil 2.5: In vitro ortamda MKH farklılaşması	13
Şekil 2.6: MKH'lerin osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaları	14
Şekil 2.7: MKH'lerin adipojenik farklılaşmaları	15
Şekil 2.8: Testosteronun molekül yapısı	26
Şekil 2.9: Cinsiyet steroidleri biyosentezi	27
Şekil 3.1: Hücre yüzey belirteçlerinin analizi	33
Şekil 3.2: MKH'lerin invert ışık mikroskobu görüntüleri	33
Şekil 3.3: Örnek CFSE akan hücre ölçer görüntüsü	35
Şekil 3.4: Örnek annexin V-PI akan hücre ölçer görüntüleri	36
Şekil 4.1: Aseton ve TP uygulanan hücrelerin CFSE histogramları	40
Şekil 4.2: 0. ve 24. saatlerde CFSE histogramlarının kıyaslanması	41
Şekil 4.3: Annexin V – PI analizi akan hücre ölçer yoğunluk kadranı görüntüleri	44

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

α -SMA	Alfa - Düz Kas Aktin
3 β HSD	3- β -Hidroksisteroid Dehidrojenaz (<i>3β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>)
17 β HSD	17- β -Hidroksisteroid Dehidrojenaz Tip3 (<i>17β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>)
AD-MKH	Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
AGC1	Agrekan
Akt	Protein Kinaz B
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
BMP-2	Kemik Morfojenik Protein 2
BMP-6	Kemik Morfojenik Protein 6
C/EBP	CAAT/Enhansır Bağlanma Proteini
CFU-F	Colony Forming Unit - Fibroblast
CD	Cluster of Differentiation
Col2A1	Kollajen Tip II, alfa I
CXCL-9	CXC Kemokin Ligandı 9
CXCL-10	CXC Kemokin Ligandı 10
CXCL-11	CXC Kemokin Ligandı 11
CYP11A1	Kolesterol Yan Zincir Parçalayıcı Enzim (<i>Cholesterol side chain cleavage enzyme</i>)
CYP17A1	17 α -hidroksilaz/17,20-liyaz (<i>17α-hydroxylase/17,20-lyase</i>)
DHT	Dihidrottestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsRNA	Çift Zincirli Ribonükleik Asit
EKH	Embriyonik Kök Hücre
EİD-SH	Erişkin İnsan Derisi Kökenli Stromal Hücre
ESET	Histon-Lizin N-Metiltransferaz (SETDB1)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FoxP3	Forkhead Box P3
FSH	Foliküler Stimulan Hormon
GATA2	Eritroid Transkripsiyon Faktörü 2
GATA3	Eritroid Transkripsiyon Faktörü 3
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
GnRH	Gonadotropin Salıverici Hormon (<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>)
GvHD	Graft Versus Host Disease
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HO	Hemoksijenaz
IDO	3 İndolamin 2,3-Dioksijenaz
IFN- γ	İnterferon – Gamma
Ig	İmmünglobulin

IL-2	İnterlökin 2
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
IL-10	İnterlökin 10
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
iPSC	İndüklenebilir Pluripotent Kök Hücre
Jmjd3	Jumanji Domain Containing 3
Kİ-MKH	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
LH	Lüteinizan Hormon
LIF	Lösemi İnhibitör Faktör
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleks
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NIK1	Histidin Kinaz Osmosensör
NO	Nitrik Oksit
Oct-4	Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4
Osx	Osterix
p38 MAPK	p38 Mitojen Aktive Protein Kinaz
PCAF	K(Lizin) Asetiltransferaz 2B
PGE2	Prostaglandin-E 2
PI	Propidyum İyodit
PPAR γ	Peroksizom Proliferasyon Aktivatör Reseptörü – Gamma
Rex1	Zinc Finger Protein 42
Runx2	Runt-ilişkili Transkripsiyon Faktörü 2
SMILE	Small Heterodimer Partner-Interacting Leucine Zipper Protein
SMURF	SMAD Spesifik E3 Ubikitin Protein Ligaz
Sox2	SRY-Box İçeren Gen 2
Sox5	SRY-Box İçeren Gen 5
Sox9	SRY-Box İçeren Gen 9
SREBP1	Sterol Regülatör Eleman Bağlayıcı Protein 1
TAB1	Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz Kinaz 7 İlişkili Protein
TAK1	Mitojen Aktive Protein Kinaz Kinaz Kinaz 7
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü - Beta
TLR-3	Toll Benzeri Reseptör 3
TLR-4	Toll Benzeri Reseptör 4
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TP	Testosteron Propiyonat
Treg	T Regülatör Hücre
TZD	Tiyazolidindion
Wnt	Memeli Drosophila Wingless Homologu



Aru, B (2016). Effects of Testosterone Propionate on Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells' Proliferation and Viability. Yeditepe University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine, MSc thesis. İstanbul

Mesenchymal stem cells can be found in various tissues such as adipose tissue, bone marrow and umbilical cord; they have CD73, CD90 and CD105 surface markers whereas they are lack of hematopoietic markers; they are able to attach plastic surfaces; they can differentiate and they have self renewal capacity. Nowadays, bone marrow derived stem cells are being successfully used in clinical applications. Testosterone, which is a steroid hormone, is responsible for maintaining male characteristic features, for both genders it speeds up the metabolism and has effects on various tissues: it increases muscle and bone mass whereas decreases fat mass. There are various studies, indicating effects of testosterone on different cell types (both healthy and cancer cells). But currently effects of testosterone on mesenchymal stem cells are unknown. In this study, we aimed to show effects of testosterone on human bone marrow derived mesenchymal stem cells after 24 hours of incubation. We expanded commercially available MSCs in vitro and added testosterone propionate at specific concentrations. We used Annexin V – Propidium Iodide viability and apoptosis test for detecting viability and CFSE staining for detecting proliferation. Measurements were performed with flow cytometry. This study shows that testosterone promotes proliferation and over a concentration, it is toxic for MSCs. Our study is the first, showing effects of testosterone on MSCs' viability and proliferation, and also it may help the future studies of diseases which are thought to be linked with mesenchymal stem cells.

Key words: Cell Culture, Testosterone, Mesenchymal Stem Cells

Aru, B. (2016). Testosteron Propiyonatın Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyon ve Canlılığına Etkisi. Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Mezenkimal kök hücreler; adipoz doku, kemik iliği ve kordon kanı gibi çeşitli dokularda buldukları bilinen; hematopoietik belirteçlerden yoksunlukları ve CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerine sahip olmaları, plastik yüzeylere tutunmaları ve osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitelerine sahip olmaları ile karakterize olan; kendini yenileme özelliğine sahip hücrelerdir. Günümüzde kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler çeşitli klinik uygulamalarda başarıyla kullanılmaktadır. Steroid yapılı bir hormon olan testosteron, erkek bireylerde cinsel karakteristik özelliklerin gelişimini sağlamasının yanında hem erkeklerde hem de kadınlarda bazı dokularda etkilidir: kas kütlelerinin artışı ve kemik dokusunun oluşumunu desteklerken metabolik hızın artışı sağlar, yağ kütlelerini azaltır. Günümüzde testosteronun farklı hücre tipleri üzerindeki etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar hem sağlıklı hem de bazı kanser hücre hatlarını kapsamakla birlikte henüz testosteronun insan mezenkimal kök hücrelerine etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda; insan mezenkimal kök hücrelerinin 24 saat testosteron ile muameleleri sonucunda proliferasyon ve canlılıklarında meydana gelen değişimleri tespit etmeyi hedefledik. Bu amaçla satın aldığımız insan mezenkimal kök hücrelerini in vitro ortamda çoğalttıktan sonra üzerlerine belirli konsantrasyonlarda testosteron propiyonat ekledik. Çalışmamızda canlılık analizi için Annexin V-Propidyum İyodit canlılık ve apoptoz testi, proliferasyon ölçümü için ise CFSE boyası kullanılmıştır. Ölçümler akan hücre ölçeği ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki in vitro ortamda testosteron propiyonat, insan mezenkimal kök hücrelerin bölünmesini artırırken belirli dozun daha üzerinde hücreler için toksiktir. Çalışmamız, testosteronun insan mezenkimal kök hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarına etkisinin tespit edilmesi açısından bir ilk özelliği taşımakta, patogenezinde mezenkimal kök hücrelerde meydana gelen bozulmaların olduğu düşünülen hastalıkların tedavilerine ışık tutabilme özelliğine sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Hücre Kültürü, Testosteron, Mezenkimal Kök Hücreler

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahip hücrelerdir. Gelecekte pek çok hastalığın tedavisinde kök hücrelerden yararlanılacağına inanılmakla birlikte, klinikte kullanımlarına yönelik araştırmalar sürdürülmektedir. Embriyonik kök hücrelerin hem in vitro ortamda teratom oluşturma eğilimleri olması, hem de kullanımları önünde etik engeller bulunması nedeni ile araştırmalar, erişkin dokulardan elde edilen kök hücreler üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Kolay elde edilmeleri ve in vitro ortamda çoğaltılabilmeleri sebebi ile mezenkimal kök hücreler araştırmalarda ve klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin sahip olduğu özellikler, elde edildikleri dokulara göre farklılıklar göstermektedir. Mezenkimal kök hücreler ilk olarak kemik iliğinde tespit edilmiş olsalar da, günümüzde yağ doku da sıkça kullanılan bir diğer mezenkimal kök hücre kaynağıdır, ancak bu iki doku haricinde farklı dokularda da mezenkimal kök hücrelerin oldukları bilinmektedir.

1.1. Tez Çalışmasının Amacı

Çalışmada testosteronun kısa dönem etkili, enjekte edilebilir yağ bazlı bir formu olan testosteron propiyonatin, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin bölünmelerine ve canlılıklarına etkisi araştırılmıştır. Kemik iliği aspiratından elde edilerek yapılan hücre kültürlerinde, ancak üçüncü pasaj sonucunda saf mezenkimal hücreler (%90 MKH) elde edilebildiği gösterilmiştir [1]. Her ne kadar düşük glukozlu besiyeri kullanılarak yapılan bir hücre kültürü çalışmasında düşük glukozlu DMEM besiyerinin mezenkimal kök hücrelerdeki reseptör dökülmesini (*receptor shedding*) onuncu pasaja dek engellediği tespit edilse de, mezenkimal kök hücrelerde standart kültür koşullarında altıncı pasajdan sonra reseptör dökülmesinin başladığı belirtilmektedir [2-5]. Bu iki özellik sebebiyle mezenkimal kök hücrelerin kültürdeki kullanım süreleri sınırlıdır. Hücre kültürü ortamının standart bileşenlerine ek olarak, bazı hormonlar hücre kültüründe proliferasyonu desteklemek ve hücre canlılığını artırmak amacı ile kullanılmaktadır [6-8]. Bizim çalışmamızda, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH) kültüründe, testosteronun proliferasyon ve canlı hücre yoğunluğu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede, kültür ortamında daha fazla hücrenin daha az pasajlama ile elde edilmesi mümkün olabilecektir.

Testosteronun hücrelerin proliferatif ve canlı hücre yoğunluğunu artıran özellikleri sebebiyle MKH kökenli olduğu düşünülen, MKH fonksiyonlarında bozulmaların tespit edildiği Multipl Myeloma gibi hastalıklarda kullanımının hücrelerin fonksiyonları üzerinde olumlu etkiler yaratabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızın ikincil amacı ise, testosteronun kök hücre kökenli olduğuna inanılan hastalıklarda kullanıma uygunluğunun tespiti için, farklı konsantrasyonda testosteronun bölünme ve canlılık üzerine etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Mezenkimal Kök Hücre Kavramının Ortaya Çıkışı

Darwinist bir zooloji profesörü olan Ernst Haeckel (1834-1919), *Natürliche Schöpfungsgeschichte*'de (1868) yayımlanmış derslerinde çok hücreli organizmaların filogenetik ataları olduklarına inandığı tek hücrelilerden ya da protozoalardan '*Stammzell*' (*stem cell*) olarak bahsetmiştir. Bu yeni terim, '*Stammbaum*'un kalıtımsal ve evrimsel kökeni ve biyolojik '*Stamm*' (filum) kelimelerinden meydana gelmiştir. Haeckel'e göre bu kök hücreler, onun '*Moneren*' olarak adlandırdığı, küçük mucus ya da protein kitleleri olan en primitif hayat formlarından köken almaktaydı. 1877 yılında kök hücre konseptini, '*Stamzelle*' ya da '*Cytula*' haline getirerek bu isimleri, döllenmiş yumurta hücresi şeklinde kullandı. Bu tanımları "Kök hücre adını kullanmak benim için en doğrusu, çünkü diğer tüm hücreler ondan köken alıyorlar ve edebi yönden 'kök ebeveynler' sayısız hücre jenerasyonundan sonra çok hücreli organizmayı oluşturuyor" şeklinde açıklamıştı. Haeckel için döllenmiş yumurta morfolojik, kimyasal ve fizyolojik olarak orijinal yumurta hücresinden çok daha farklı olduğu için yeni bir tanımlamaya gereksinim vardı. 1879 yılında öğrencisi Oscar Hertwig, deniz kestaneleri üzerinde döllenmenin bir yumurta hücresi ile bir spermatozoonun nükleusunun birleşmesi olduğunu göstermiştir. Kök hücre için Haeckel, "yarı anne ve yarı baba kökenli olduğu için, artık bu kök hücreden gelişen çocuğun iki ebeveynin de bireysel özelliklerini taşımasına şaşırılmaması gerektiğini" vurgulamıştır. Bu sebeple Haeckel için kök hücre, gelecekteki bebek demektir.

Haeckel'in bu yeni terimi metamorfik dile yerleşti ve vücut ile hücrelerden bahsederken genel bir kullanım haline geldi. 1850'den beri vücut hücrelerini bir eyaleti oluşturan yurttaşlar ('*cell state*', '*Zellenstaat*') ile kıyaslamış olan Rudolf Virchow'un da kısmen etkisi ile hücrelerden bireyler gibi bahsetmek alışılmış bir hale geldi. Virchow ile tıp eğitimi almış Haeckel de insan vücudunu hücrelerin bir birleşimi olarak tanımlamıştır, ancak daha hiyerarşik ve merkezi bir yol izlemiştir. Buradan da anlaşıldığı üzere bu tarz metaforlara bilimsel yazılarda da yer verilmektedir. Metaforlar bilim insanlarının üzerlerinde araştırma yapılacak yeni konuların oluşturulmasına yardımcı olurlar. Burada da, Haeckel tarafından bahsi geçen bu "kök hücreler", kısa zamanda diğer zoolog ve anatomistlerin çalışmalarında kendilerine yer bulmuştur.

1890'ların başında '*kök hücre*' terimi, August Weismann'ın embriyoloji çalışmalarında '*germ plazma*'nın devamlılığı olarak yer bulmuştur. Embriyonik gelişimin en erken fazında primordiyal germ hücrelerinden ayrılan bu '*germ plazma*'nın (*Keimplasm*) yumurta ve spermden gelen kalıtımsal özellikleri bir nesilden diğer nesile aktardığı düşünülmüştür. Valentin Haecker, 1892 yılında krustase Cyclops'un embriyonik gelişiminde tüm primordiyal germ hücrelerinin ve tüm somatik hücrelerin 'kök hücre' kökenli olduğundan bahsetmiştir. Aynı yılda bu terim, *ascaris megalocephala* embriyosu ile çalışan Theodor Boveri tarafından 'çeşitli primordiyal somatik hücrelerin köken aldığı, primordiyal germ hücresini oluşturan döllenmiş yumurta' olarak da kullanılmıştır. Başka bir şekilde; Boveri için ilk nesildeki bir hücre ikiye bölündüğünde bir tanesi 'kök hücre' özelliğini korurken diğeri somatik hücrelerin

öncülü oluyordu. Beş bölünmeden sonra, embriyo 32 hücre safhasındayken, kök hücre farklılaşarak germ hücrelerini meydana getiriyordu. Bovari'nin tanımı ve ufak eklemelerle birlikte pek çok çizimi çeşitli yayınlarda ve erken embriyonik gelişimin anlatıldığı kitaplarda yer aldı.

Kök hücre konsepti zamanla embriyoloji ve sitoloji alanlarına, anlamında meydana gelen çeşitli farklılıklar ile birlikte yerleşti. Boveri tarafından yapılan kök hücre karakterizasyonuna göre bu hücreler; 1. kendilerini yenileme özelliğine sahip olmalıydı ve 2. belirli somatik ya da germ hücrelerine farklılaşabilmelilerdi [9].

Kök hücreler, embriyolojiden farklı alanlarda çalışan araştırmacıların da ilgisini çekmiştir. Örneğin Berlin'deki Virchow's Pathological Institute'da eritrositlerin oluşumu üzerine amfibilerle çalışmalar yapan Artur Pappenheim, eritrosit ve lökositlerin öncüllerini 'kök hücre' olarak adlandırmıştır [10]. Pappenheim 'kök hücre' ya da 'ana hücre'lerin (*Mutterzellen*) bilincindeydi, ayrıca onların yumurta ya da folikül hücrelerine; spermatoblastlara ya da spermatogoniaya; sensör hücrelere ya da duyu organlarını destekleyici hücrelere; ganglion hücrelerine ya da nörogliaya ve konnektif dokunun çeşitli hücrelerine farklılaştıklarını belirtmiştir [9]. Pappenheim, daha sonraları lösemnin farklı türleri ile yaptığı çalışmalarda myelositler ve lenfositlerin aynı 'lenfomyeloblast multipotent kök hücrelerden köken aldığı' ifade etmiştir. Moskova Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Enstitüsü'nde çalışmalarını sürdüren Wera Dantschakoff; tavuk embriyosunda kan oluşumunu incelemiştir ve 'lenfosit'lerin; eritrositlerin ve granüllü lökositlerin kök hücreleri olduğunu ifade etmiştir [11]. St. Petersburg'lu histolog Alexander Maximow, 1909 yılında Berlin Hematoloji Derneği'ndeki konuşmasında; memelilerde hem embriyonik gelişim hem de yetişkin yaşamları süresince tüm kan hücrelerinin 'genel kök hücre' olan 'lenfosit'lerden köken aldığından bahsetmiştir [12]. Bu üç araştırmacı da kan hücrelerinin tek bir 'hematopoietik kök hücre'den köken aldığı konusunda fikir birliğine varmıştır. Bu görüşün bir destekçisi ise patoloji profesörü Ernst Neumann'dı. Neumann, 1868 yılında insanlar ve diğer memelilerde kemik iliğinin, kan hücrelerinin oluşumunun gerçekleştiği bölge olduğunu göstermiştir. Daha sonra kurbağalar üzerinde yaptığı çalışmalarda kemik iliğinde bulunan lenfositlerin; eritrositlerin, granülositlerin ve dolaşımdaki lenfositlerin öncülleri olduğunu iddia etmiştir [9].

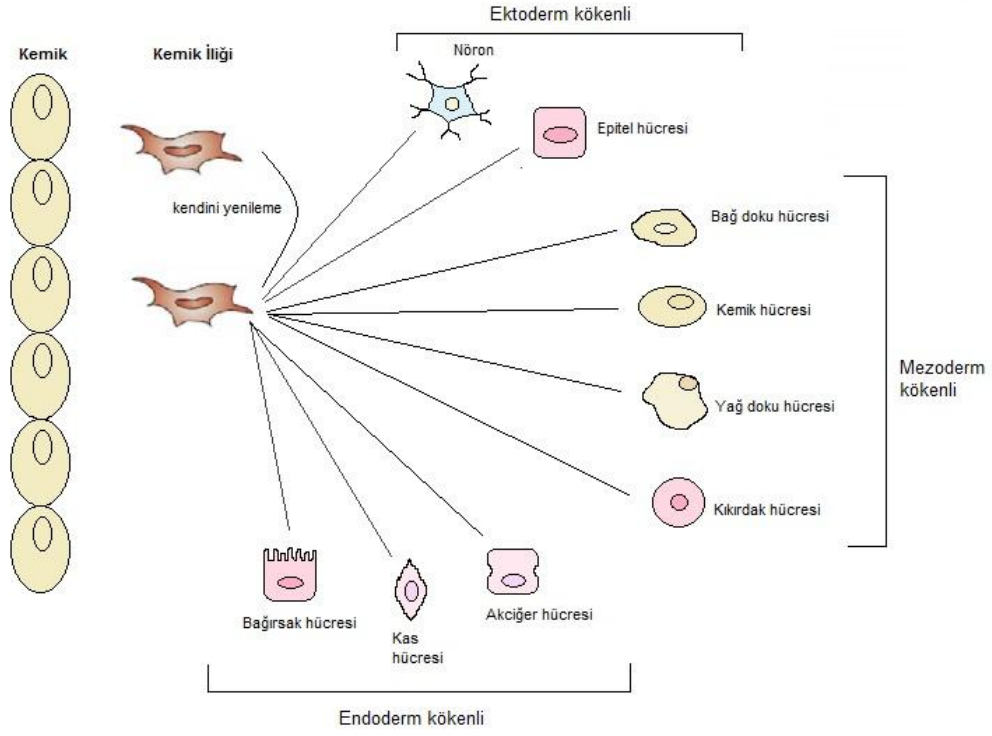
Bu bakış açısı, Paul Erlich'in dualist doktrini ile zıt düşmüştür. Erlich'e göre lenfositler ve granülositler morfolojik olarak farklı öncüllerden farklı organlarda meydana gelmektedir: lenfositler lenf nodları ve dalakta; granülositler kemik iliğinde gelişmektedir [13].

1912 yılında Neumann, *'Bir gün Robert Koch'un bakteriler ile yaptığı gibi kan hücrelerini kültür ortamında yetiştirmek mümkün olursa, bu iki farklı görüşün uzlaşmaya varabileceğini'* ifade etmiştir [14].

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler: Tarihçe

Kök hücrelerin tarihi; 19. yüzyılda bazı hücrelerin, diğer hücrelerin öncülleri olabileceği düşüncesi ile başlamıştır [15]. “Mezenkimal kök hücre” kavramı ise, heterotopik anatomik bölgelere yapılan kemik iliği transplantasyonunu takiben de novo kemik ve ilik oluşumunun gözlemlendiği klasik deneylere uzanmaktadır. Ancak bu çalışmalarda tamamen kemikten arındırılmış kemik iliği kullanılması sebebiyle hangi hücre tipinin farklılaşmış kemik hücrelerinin öncülü olduğu tespit edilememiştir. 1960 ve 1970lerde yapılan çalışmalar, kemik iliği hücrelerinin heterotopik transplantasyonlarının gösterdiği osteojenik potansiyelin, kemik iliğinde az miktarda bulunan bir hücre popülasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir [16]. 20. yüzyılda yapılan bir çalışma ile ise kemik iliğinin osteojenik potansiyeli açıkça kanıtlanmıştır [17].

Kemik iliğindeki stromal fraksiyonda kök hücrelerin varlığı ve farelerde transplantasyonu takiben kemik ve kemik iliği mikroçevresi oluşturabildikleri ilk kez Friedenstein tarafından gösterilmiştir. Hematopoietik kök hücrelerin tanımlanmasından kısa süre sonra Friedenstein ve arkadaşları, farelerde heterotopik transplantasyonu takip eden süre içinde kemik iliği stromasının farklı dokulara ait hücreleri meydana getirdiğini tespit etmişlerdi. 1970 yılında ise kemik iliği hücrelerini %10 fetal kalf serumu içeren besiyeri içinde plastik kültür kaplarına bıraktıktan sonra, kemik iliğinin plastiğe tutunma özelliğine sahip olmayan hematopoietik hücrelerle birlikte az miktarda plastiğe tutunabilen hücreler içerdiğini göstermişlerdi. Bu hücreler hematopoietik hücrelerin genelinden, hücre kültür plaklarına hızlıca tutunabilmeleri ve kültürdeki fibroblast benzeri görüntüleri ile ayrılmaktaydılar. Ayrıca bu çalışmalar, kemik iliği süspansiyonlarının kültür plaklarına ekildiklerinde birkaç gün içinde tek bir hücreden farklı koloniler meydana getirebildiklerini göstermiştir [16]. Friedenstein aynı zamanda bu kolonilerden bazılarının kıkırdak ya da kemik oluşturabildiğini tespit etmiştir [18]. Daha sonrasında yapılan çalışmalarda bu öncüllerin, plastik yüzeylere tutunabilmeleri sayesinde seçilip laboratuvar koşullarında çoğaltılabilen fibroblast benzeri hücrelerin bir alt sınıfı olduğu gösterilerek “CFU-F” (Colony Forming Unit – fibroblast) olarak isimlendirilmişlerdir. 1980li yıllarda CFU-F kökenli hücrelerin osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Caplan, kemik-kıkırdak dönüşümlerine mezenkimal stromal hücrelerin aracılık ettiğini ve çevresel koşulların MKH farklılaşmasının indüklenmesi açısından kritik öneme sahip olduğunu kanıtlamıştı [19]. Laboratuvar şartlarındaki bu farklılaşma ve proliferasyon kapasiteleri, kendisinden farklı hücreleri meydana getirebilme (*multipotency*) ve kendini yenileyebilme (*self-renewal*) gibi “kök hücre” kavramının özelliklerini işaret etmekteydi. Orijinal tanımlarına göre bu stromal hücreler, canlıların yetişkin ve embriyonik dokularının adheran fraksiyonlarından izole edilen, üç farklı hücre tipine farklılaşabilen hücreler olarak kategorize edilmiştir.



Şekil 2.1: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması

2.3. MKH Kaynakları

MKH'lerin kaynaklarından biri, kemik iliğidir. Ancak bu hücreler kemik iliğini meydana getiren hücrelerin çok azını oluştururlar; yoğunluk gradienti yöntemi kullanılarak ayrılan mononükleer hücrelerin yalnızca %0.01 - %0.001 kadarı plastik yüzeylere tutunma özelliğine sahip fibroblast benzeri kolonileri meydana getirebilmektedir [20]. Aynı donörden alınsa dahi MKH'lerin miktarı ve verimlilikleri değişiklik gösterebilmektedir [21]. Kemik iliği haricinde MKH'lerin vücuttaki diğer dokularda da bulunduğu belirten araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır [22]. Kemik iliği, adipoz doku, sinoviyal doku, akciğer dokusu, kordon kanı ve periferik kandan elde edilen MKH'lerin büyüme potansiyelleri aynı olmasa da hepsinin yüzey belirteçleri ve mezodermal farklılaşma potansiyelleri birbirlerine yakındır. 2013 yılında yapılan bir çalışmada kemik iliği, adipoz doku ve deri kökenli MKH'lerin aynı yüzey belirteçlerine sahip oldukları ($CD34^-$, $CD45^-$, $CD14^-$, $CD31^-$, $HLA-DR^-$, $CD13^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD90^+$, ve $CD105^+$), ancak büyüme hızlarının ve farklılaşma yeteneklerinin değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmada kemik iliğinden elde edilen MKH'ler (Kİ-MKH), adipoz dokudan elde edilen MKH'ler (AD-MKH), erişkin insan derisi kökenli stromal hücreler (EİD-SH) ve yenidoğan deri stromal hücreleri (YD-DSH) kullanılmıştır. Sonuç olarak büyüme hızının en yüksek olan hücrelerin YD-DSH'ler, en yavaş olan hücrelerin ise EİD-SH'ler olduğu; ayrıca her hücre tipinin farklı adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda hücre tiplerinin moleküler fenotiplerinde de farklılıklar görülmektedir [23]. Ayrıca, yetişkin farelerde neredeyse tüm doku tiplerinden MKH'lerin izole

edilebilmiş olması, insanlarda da tüm postnatal organlarda bulunabileceğini düşündürmektedir [24].

2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakteristik Özellikleri

Günümüzde MKH'leri kesin olarak ayırt etmeye yönelik özgül bir yüzey belirteci bulunmamaktadır. The International Society for Cell Therapy tarafından, bu hücrelerin tanımlanmaları için üç kriter belirlenmiştir: 1. standart kültür şartlarında plastik yüzeylere tutunabilmek 2. CD73, CD90 ve CD105 yüzey moleküllerine sahipken CD34, CD45, HLA-DR, CD14 ya da CD11b, CD79a veya CD19 yüzey moleküllerinden yoksun olmak 3. osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitelerine sahip olmak. Bu kriterler insan MSC'lerinin standardizasyonu için kabul görmektedir [25]. Ancak izole edilen ve kültürlenen hücrelerde, hücrelerin sahip olduğu yüzey belirteçlerinin bazılarının eksplantasyon sonrası kaybolabileceği, buna karşılık ekspansiyon süresince yeni yüzey belirteçlerinin kazanılabileceği tespit edilmiştir. Örneğin izole edilmiş bir MKH hücre hattında hücrelerin farklılaşma kapasitelerini korumalarına, plastik yüzeylere tutunabilmelerine ve CD90 ile CD105 yüzey belirteçlerine ek olarak, hücrelerde normalde ekspresyonu izlenmeyen HLA-DR ekspresyonu tespit edilmiştir [26].

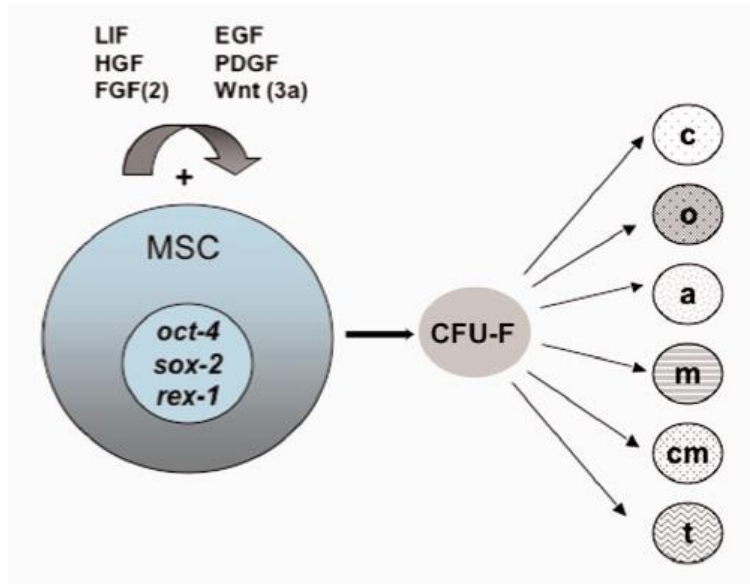
In vitro ortamda osteoblastları, adipositleri ve kondrositleri meydana getirebilmelerinin yanı sıra in vivo ortamda ektopik implantasyonu takiben MKH'lerin kemik ve kıkırdak oluşturdıkları, genetik kemik bozukluğu oluşturulmuş hayvan modellerinde kemik rejenerasyonuna katkıda buldukları belirlenmiştir. Ek olarak, yapılan çalışmalar; MKH'lerin hem mezoderm kökenli, hem de mezoderm kökenli olmayan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabildiklerini de göstermektedir. Ancak farklılaşım fonksiyonel açıdan olgunlaşmış populasyonların izolasyonları, çoğaltılmaları ve tanımlanmaları için genel olarak kabul görmüş metodların bulunmayışı ile tanımlanmaları için uygulanan yöntemlerin değişkenlik göstermeleri sebebiyle, MKH'lerin sahip oldukları bu multipotensi dünya çapında kabul görmemektedir. Proliferatif kapasiteleri, farklılaşma potansiyelleri ve yüzey belirteçleri, hücrelerin köken aldıkları dokulara göre farklılık gösterebilmektedir.

Kök hücreler genel olarak kendilerini yenileyebilme ve multipotensi özellikleri ile karakterize edilmektedirler. Bu durum, MKH'lerin gerçek kök hücreler mi yoksa öncül hücreler mi oldukları sorusunu yaratmıştır. Farklı dokulardan elde edilmiş MKH'lerin biyolojik olarak birbirlerine denk olmaları mümkün olmayabilmekte; bu hücrelerin morfolojileri, farklılaşma ve proliferasyon kapasiteleri, yüzey belirteçleri ve gen ekspresyonları birbirlerinden farklı olabilmektedir [27,28]. Ayrıca MKH'lerin farklı yüzey belirteçlerine sahip olabilmeleri ve morfolojik açıdan heterojen hücre topluluğu özelliği göstermeleri de "kök hücre" özelliklerinin sorgulanmasına sebep olmuştur. Bu sebeple farklı dokulardan elde edilmiş MKH'lerin biyolojik farklarının anlaşılması; dokuya özgü yenilenme ve multipotensi özelliklerinin tanımlanmaları için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

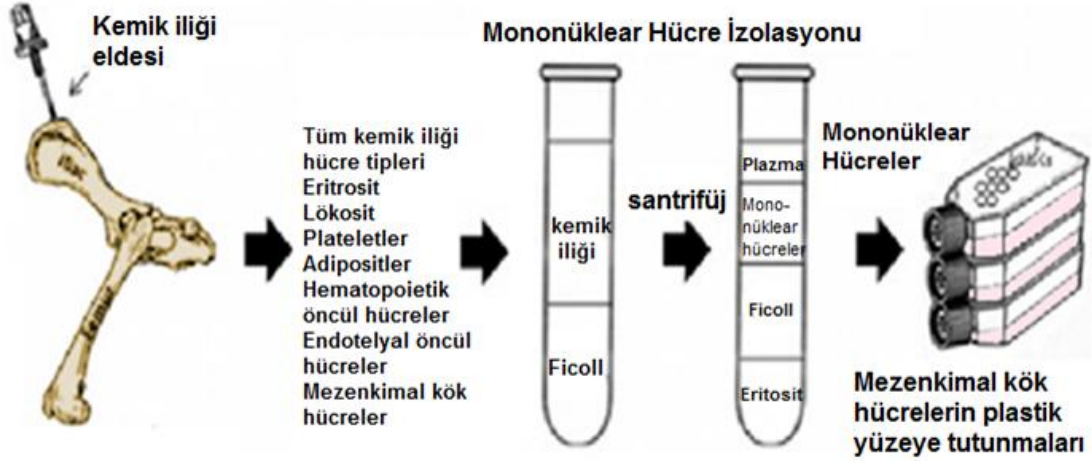
Kendini yenileyebilme özelliği (*self-renewal*); hücrenin farklılaşmamış 'kök' halini korumasını sağlayan biyolojik yollar ve mekanizmaları ifade etmektedir.

MKH'ler de dahil olmak üzere kök hücrelerin bu özelliklerini korumalarını sağlayan moleküler yollar incelenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda Lösemi İnhibisyon Faktörü (LIF), Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGFler), memeli *Drosophila wingless* homologları (Wntler) ve diğer faktörler ile sitokinlerin; MKH'lerin 'kök hücre' özelliklerinin korunmasında fonksiyonel oldukları belirtilmiştir [29-32].

Bu faktörlerin diğer kök hücre türlerinin de kendilerini yenilemelerini sağladıkları bilinmektedir. Ayrıca farklılaşmamış embriyonik mezenkim dokusunun korunumu ve farklılaşması ile tümör oluşumunda da bu faktörler işlevseldir [33]. Bir pleiotropik sitokin olan LIF, MKH'lerin ve diğer kök hücrelerin 'kök' halini korumalarına yardımcı olur. Aynı zamanda LIF, osteoblastik ve osteoklastik aktiviteleri engeller ya da uyarır. LIF'nin çift potansiyeli ile hücrel çevre ve hedef hücrenin gelişimsel basamağı; hücrenin bu sitokine olan cevabını belirlemesini sağlar. LIF'nin MKH yenilenmesine etki mekanizması bilinmemekle birlikte komşu hücreler ile parakrin iletişimin sağlanmasında görev aldığı düşünülmektedir [34]. Farklı türlerde, bazı durumlarda otonom olarak, FGF2'nin MKH'lerin kültürdeki canlılık sürelerini uzattığı ve kök hücre özelliklerini koruduğu bilinmektedir [27, 28]. Yapılan bir diğer çalışmaya göre Wnt'ler hematopoietik, nöral, intestinal ve deri kök hücrelerinde olduğu gibi MKH'lerin de korunumlarında işlevseldir [33]. Wnt3a uygulanması yetişkin MKH proliferasyonunu artırırken osteojenik farklılaşmayı baskılar. Farklı memeli türlerinden elde edilen MKH'lerin aynı zamanda embriyonik kök hücre belirteçleri olan oct-4, sox-2 ve rex-1 genlerini de eksprese ettiği bilinmektedir [35]. Sahip oldukları tüm bu özellikler göz önüne alındığında; insanlardan elde edilen, kendilerini yenileme ve farklılaşma kapasiteleri kanıtlanmış olan kemik iliği kökenli MKH'ler "kök hücre" olarak kabul edilmektedir [19].



Şekil 2.2: MKH kendilerini yenileme ve farklılaşmalarında görevli genler.
Kolf CM vd. Arthritis Res Ther. 2007 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır [33].



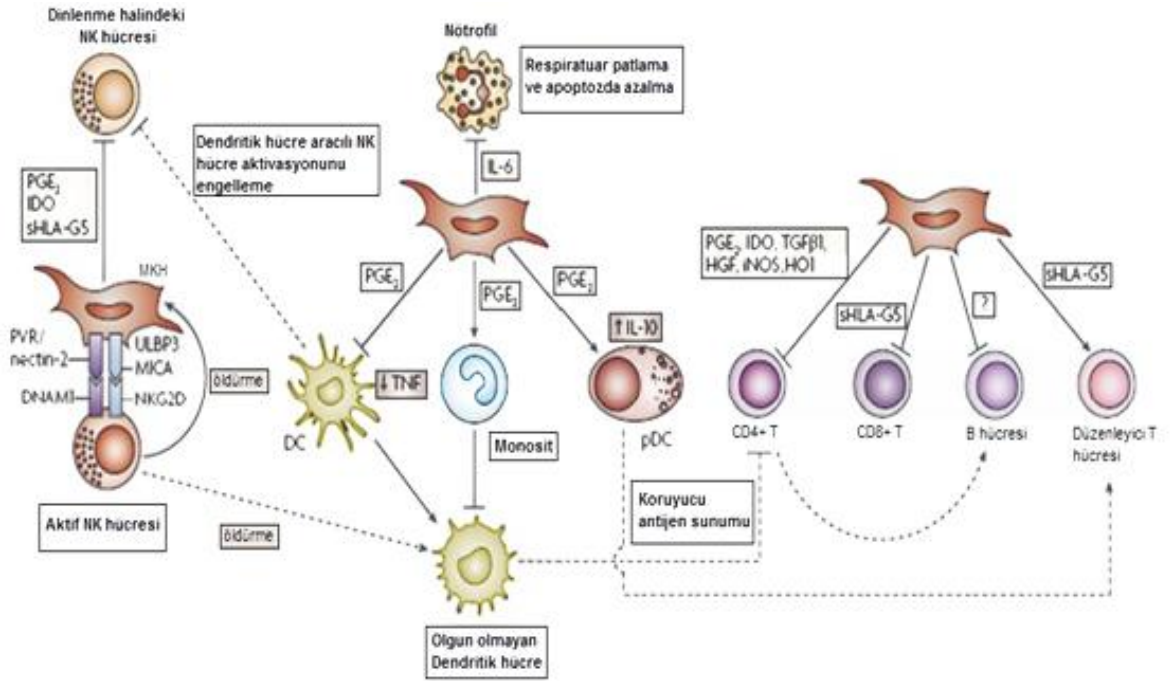
Şekil 2.3: Mezenkimal kök hücre kültürü. Williams AR, Hare JM, Circ Res. 2011 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır [19].

Kemik iliği hücreleri içinde MKH'leri elde etmek için gerekli üç temel aşama vardır: 1.gradiente bağlı ayırma yöntemi kullanılarak mononükleer hücrelerin nukleusa sahip olmayan eritrositlerden ayrılması 2.MKH'lerin plastik yüzeye tutunmaları ve 3.monositlerin tripsinizasyon ile MKH'lerden ayrılması [19].

Bu yöntemde; yoğunluğa bağlı ayırma işlemi ile elde edilen mononükleer hücreler, %10 fetal sıgır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile hazırlanan besiyeri ile süspanse edilerek flasklara ekilir ve 37°C sıcaklık ile %5 CO₂ şartlarını sağlayan inkübatörde 2-3 gün boyunca kültürlenir. Plastik yüzeye yapışma özelliğine sahip olmayan hücreler besiyeri değiştirilirken ortamdan uzaklaştırılacaktır [36]. Hücreler ekildikten sonra her 2-3 günde bir besiyeri değiştirilmelidir. Işık mikroskobu altında yapılan incelemelerde hücreler flask yüzeyinin %80'ini kapladığı zaman hücreler tripsin ile yüzeyden kaldırılır ve pasajlanırlar.

2.5. MKH'lerin İmmünolojik Özellikleri

İnsan MKH'leri orta seviyede HLA MHC sınıf I moleküllerini eksprese ederler; MHC sınıf II molekülleri, kostimülatör molekül B7 ailesi ve CD40 ligandına ise sahip değildirler [37,38]. Antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan ve B7-1 (CD80) ile B7-2'yi (CD86) kapsayan B7 molekül ailesi, antijene bağlı immün yanıt gelişimi için gerekli sinyallerin oluşturulmasında rol oynamaktadır [39]. CD40, TNF-R ailesine ait bir hücre yüzey reseptörüdür. İlk olarak B lenfositler üzerinde tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Ancak günümüzde CD40'ın monositler, dendritik hücreler, endotelial hücreler ve epitel hücreleri gibi farklı hücre tiplerinde yaygın olarak eksprese edildiği bilinmektedir. CD40 ligandı ise TNF ailesine ait bir hücre yüzey molekülü olup aktif CD4⁺ T lenfositler tarafından eksprese edilmektedir [40]. CD40 ligandının CD40 ile etkileşimi temel immün düzenleyici fonksiyonlara aracılık etmektedir [41].



Şekil 2.4: MKH'lerin immün sistem hücreleriyle etkileşimleri. Uccelli A vd. Nat Rev Immunol. 2008 makalesinden modifiye edilerek alıntılanmıştır [42].

Bir enfeksiyona karşı oluşturulan özgül olmayan yanıtta doğal bağışıklık sistemi hücreleri -nötrofiller, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, eozinofiller, mast hücreleri, makrofajlar- sorumludur ve MKH'lerin bu inflamatuvar hücrelerin çoğunu baskıladığı gösterilmiştir.

2.5.1. İnflamasyonun Erken Safhalarında MKH'lerin Etkileri

MKH'lerin proinflamatuvar aktiviteleri inflamasyonun erken safhalarında etkilidir ve immün yanıtın başlamasına yardımcı olur. İnflamasyonun akut fazında nötrofiller inflamasyon bölgesine göç ederek temel etkilerini fagositoz ile gösterirler [43]. Farelerde, dokuda bulunan MKH'lerin IL-6, IL-8, granülosit-makrofaj koloni

stimulan faktör (GM-CSF), ve makrofaj migrasyonunu inhibe edici faktör salarak nötrofilleri inflamasyon bölgesine çektikleri ve proinflamatuvar etkilerini arttırdıkları gösterilmiştir [44]. Ayrıca insanlarda da in vitro ortamda TLR-3 ile aktive olan Kİ-MKH'lerin IL-6, IFN- γ ve GM-CSF etkisiyle nötrofillerin sağkalımını arttırdıkları gösterilmiştir [45].

Nötrofillere ek olarak MKH'ler de inflamasyon bölgesine lenfositlerin ulaşmalarını sağlayacak kemokinler üreterek immün yanıtta katkıda bulunabilirler. İnsan MKH'leri proinflamatuvar sitokinler ile uyarılınca CXCL-9, CXCL-10, ve CXCL-11 kemokinlerini salarlar.

2.5.2. Doğal İmmün Yanıtın Düzenlenmesinde MKH'ler

İnflamasyon; infeksiyon, doku hasarı, yaralanma gibi durumlar sonucu meydana gelen ve patojenlerin etkisiz hale getirilmelerini hedefleyen bölgesel ya da sistemik bir koruma yanıtıdır. İnflamatuvar yanıtın başlangıcını takiben doğal bağışıklık sistemi hücreleri, patojenler tarafından ya da doku hasarına ilişkin üretilen molekülleri, TLR'ler ile algılar. TLR bağlanması, fagositozu ve çeşitli inflamatuvar araçların üretimini tetikler. Bu inflamatuvar araçlar, özellikle makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositik hücreleri aktive ederek özgül olmayan doğal bağışıklık yanıtı meydana getirirler [46]. Farklı TLR'ler farklı endojen ya da patojene ilişkin moleküllerce aktive olur. Örneğin gram-negatif bakterilerin ürettiği lipopolisakkarit (LPS) TLR-4'ü aktive ederken bazı virüslerin taşıdığı çift iplikli RNA (dsRNA) TLR-3'ü aktive eder. Waterman vd., TLR aktivasyonuna göre MKH'lerin iki farklı şekilde polarize olarak farklı immün düzenleyici etkiler yarattığını ileri sürmüştür. Buna göre TLR-4 ile başlatılan MKH aktivasyonu proinflamatuvar etki yaratırken TLR-3 ile başlatılan MKH aktivasyonu anti-inflamatuvar etki ile sonuçlanır [47]. Ancak günümüzde TLR bağlanmasının sebep olduğu proinflamatuvar ve antiinflamatuvar etkilerin moleküler mekanizmaları bilinmemektedir [48].

2.5.2.1. MKH'ler ve Makrofaj Polarizasyonu

Makrofajların doğal bağışıklık sisteminde inflamasyonu başlatan ve kontrol altında tutan hücreler oldukları bilinmektedir ve MKH'ler makrofajların fonksiyonlarını kontrol edebilirler. İnflamatuvar bölgeye ulaşan monositler, mikroçevrenin etkisine göre aktif M1 makrofajlara ya da aktif M2 makrofajlara dönüşebilirler. M1 makrofajlar proinflamatuvar sitokinler üreterek bölgesel inflamasyonu tetiklerken M2 makrofajlar antiinflamatuvar etki yaratan bazı sitokinlerin kombinasyonunu (hem yüksek seviyede IL-10 ve TGF- β 1, hem de düşük seviyede IL-1, IL-6, TNF- α ve IFN- γ) salarken inflamasyonu takiben doku yenilenmesini tetikler [49].

MKH'ler doğal bağışıklık sisteminin bileşenleri ile ilişki kurarak immün düzenleyici özelliklerini gösterirler. M1 makrofajlar ya da aktive T hücrelerinin ürettikleri proinflamatuvar sitokinler, MKH'leri aktive ederek monositlerin anti-inflamatuvar profil kazanmasını ve M2 makrofajlara dönüşümlerini sağlayabilirler. MKH polarizasyonuna ek olarak makrofaj polarizasyonu da proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar etkilerin dengesinde rol oynar. MKH'ler ile makrofajlar arasındaki bu

dinamik etkileşim, mikroçevrede yoğun bir hassasiyet yaratır. Her iki durumda da yanıt mekanizmaları, proinflamatuvar sitokinlerce aktive edilen immün baskılayıcı faktörler indüklenebilir NO sentaz (fareler için iNOS) veIDO (insanlar için) solubl aracı moleküllere bağlıdır. Bu faktörlerin konsantrasyonları hem M1 ve M2 makrofajların arasındaki dengede, hem de proinflamatuvar - anti-inflamatuvar etkinin dengesinde önem sahibidir [48].

1.5.2.2. MKH'ler ve Doğal Öldürücü Hücreler

Doğal öldürücü hücreler tümör ya da virüs ile enfekte hücreler üzerinde sitolitik aktivite gösteren doğal bağışıklık sistemi hücreleridir. İşlevleri, sahip oldukları yüzey reseptörlerinin baskılayıcı ve uyarıcı sinyalleri algılamaları ile düzenlenir.

Doğal öldürücü hücreler ile MKH'ler arasındaki hücresel ilişkiler hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada MKH'lerin, aktive olmamış doğal öldürücü hücrelerin IL-2 aracılı proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir, ancak proliferasyon alan doğal öldürücü hücreler üzerinde çok kısıtlı inhibitör etki gösterebilirler. Daha önemlisi, aktif doğal öldürücü hücreler MKH'leri etkili bir şekilde lize edebilirler [50].

2.5.3. Adaptif İmmün Yanıtın Düzenlenmesinde MKH'ler

Adaptif immün yanıt CD4⁺ yardımcı T ve CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerden oluşur ve antijene özgü olup immünolojik hafızanın gelişimini sağlar. Yardımcı T hücreler içinde bir grup olan Treg'ler ise T hücre aracılı immün yanıtın baskılanmasında görevlidir.

2.5.3.1. MKH'ler ve Effektör T Hücreler

MKH'lerin in vitro ortamda, indüklenmiş T lenfosit proliferasyonunu baskıladıkları bilinmektedir [51]. Bu baskılama MKH'ler tarafından salınan TGF- β , Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), PGE2, IDO, NO, ve hemoksijenaz (HO) gibi solubl faktörlerce gerçekleşir [52]. Bu baskılayıcı faktörlerin salınımı, MKH'lerin TNF- α ve IFN- γ ile uyarılmaları ile kuvvetlenir; ancak uyarılmamış MKH'lerin de bu araçları saldıkları bilinmektedir. İnsan hücrelerinde IDO, triptofanın degradasyonunu artırır. Bu aşamada meydana gelen katabolitlerin hem T hücre proliferasyonunu baskıladığı, hem de Treg farklılaşmasını indükledikleri bilinmektedir. MKH'ler T hücre proliferasyonunu baskılayan solubl faktörler salmalarının yanı sıra in vitro ortamda MKH'lerin T hücreleri baskılamalarının monositlere bağlı olduğu da öne sürülmüştür; çünkü monositlerin olmadığı kültür ortamında MKH'lerin T hücreler üzerindeki inhibitör etkilerinde azalma izlenmiştir [53, 54].

2.5.3.2. MKH'ler ve Düzenleyici T Hücreler (Treg)

Treg'ler yardımcı T hücrelerin bir alt grubudurlar. Görevleri özellikle T hücre aracılı immün yanıtın baskılanması olup *forkhead box P3* (FoxP3) ekspresyonu ile karakterize edilirler. Treg'lerin iki ana alt tipi bulunmaktadır: konak antijenlerine özgü

timus kökenli FoxP3⁺ doğal hücreler ve inflamatuvar yanıtı takiben meydana gelen, periferde bulunan olgun CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ öncülleri kökenli indüklenmiş/adaptif Treg'ler [55].

In vitro ortamda MKH'lerin periferik kanda bulunan mononükleer hücreler ile inkübasyonu, CD4⁺ T hücrelerin CD25⁺FoxP3⁺ regülatör T hücrelere (indüklenmiş Treglere) farklılaşmasını sağlar. Bu süreçte MKH'lerin yardımcı T hücreler ile bağlantı kurmalarında PGE2 ve TGF- β salınımı görevlidir [56,57]. Treg oluşumu monosit bağımlıdır. Monositlerin olmadığı ko-kültürlerde bu oluşum gözlenmemektedir [58].

Mitojen ile uyarılan T hücre kültürüne MKH'ler ile uyarılan Treg'lerin eklenmesinin T hücre proliferasyonunu uyardığı bilinmektedir [57]. Ayrıca MKH'ler aracılığıyla HLA-G5 salınımının da MKH'ler ile uyarılan Treg üretimini artırdığı bilinmektedir. HLA-G'nin bloklandığı çalışmalar sonucu HLA-G5'in önce allojenik T hücre proliferasyonunu baskıladığı, daha sonra ise CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg hücrelerin ekspansiyonunu baskıladığı bildirilmiştir [59].

Özet olarak; yapılan çalışmalar göstermektedir ki MKH'ler inflamatuvar efektör T hücreler ile antiinflamatuvar Treg'lerin arasındaki dengenin sağlanmasında görev almaktadırlar.

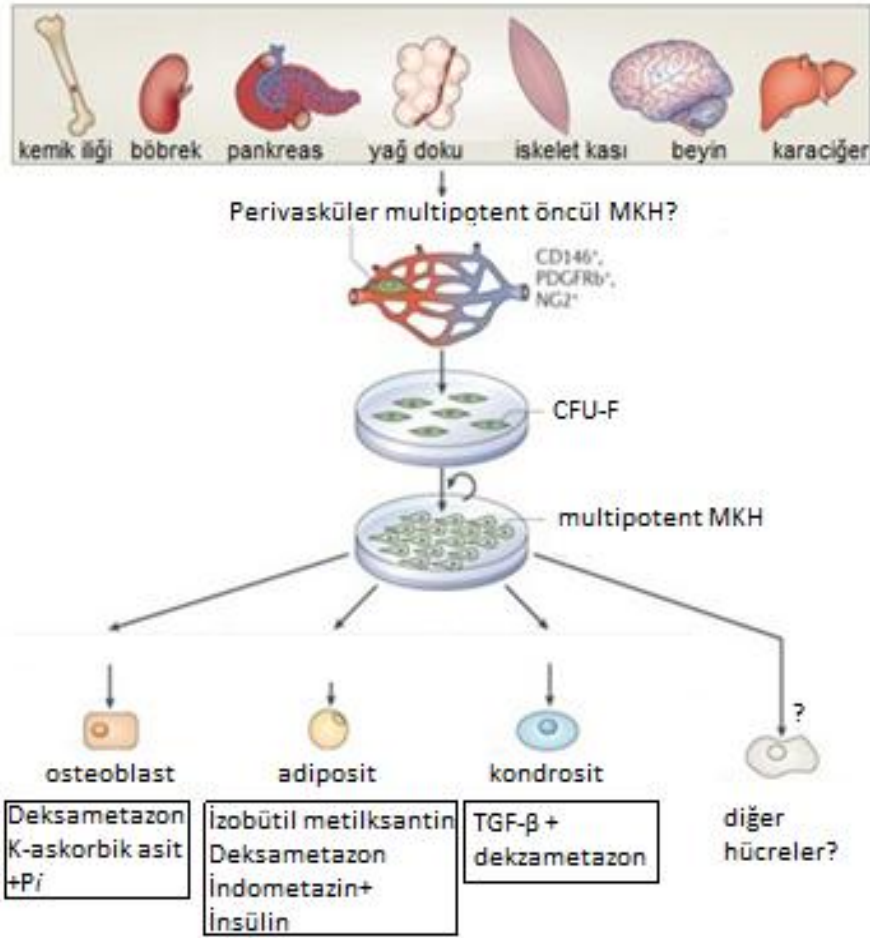
2.5.3.3. MKH'ler ve B Hücreler

B hücrelerin gelişimleri kemik iliğinde meydana gelir. Aynı zamanda bu hücrelerin gelişimleri, B hücre öncüllerinin sağkalımları ve proliferasyonlarını destekleyen sitokinleri üreten stromal hücreler ile olan ilişkilerine dayanmaktadır. Mezenkimal kök hücreler, olgun B hücrelerin proliferasyon, farklılaşma ve kemotaktik davranışları üzerinde belirgin derecede etkilidir.

Yapılan bir çalışma göstermiştir ki in vitro ortamda MKH'ler B hücre proliferasyonunu, antikor salınımına hücrelere yanıt olarak gerçekleşen farklılaşmayı ve kemotaksisi baskırlar. Bu iki hücre tipinin ko-kültüründe IgM, IgG, ve IgA üreten hücrelere cevap olarak meydana gelen B hücre proliferasyonu ve farklılaşması belirgin derecede sekteye uğramıştır. MKH'lerin B hücreler üzerindeki bu etkisi, kültürdeki hücre oranları ile de yakından ilişkilidir; MKH'lerin kültürdeki oranı azaldıkça baskılayıcı etkileri de azalmıştır. B hücreler ko-kültürde proliferasyon olmamış ya da apoptoza uğramamış, ancak hücre döngüsünde G₀-G₁ fazlarında kalmışlardır [60].

2.6. MKH'lerin Farklılaşmalarının Düzenlenmesi

MKH'lerin osteoblastik, adipositik ve kondrositik dizileri oluşturmasında diziye özgü Runx2, PPAR γ ve SOX9 genlerinin aktivasyonlarının etkili olduğu bilinmektedir. Bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları ve aktiviteleri, hormonlar ve faktörleri kapsayan mikro-çevresel şartlar ile düzenlenmektedir.

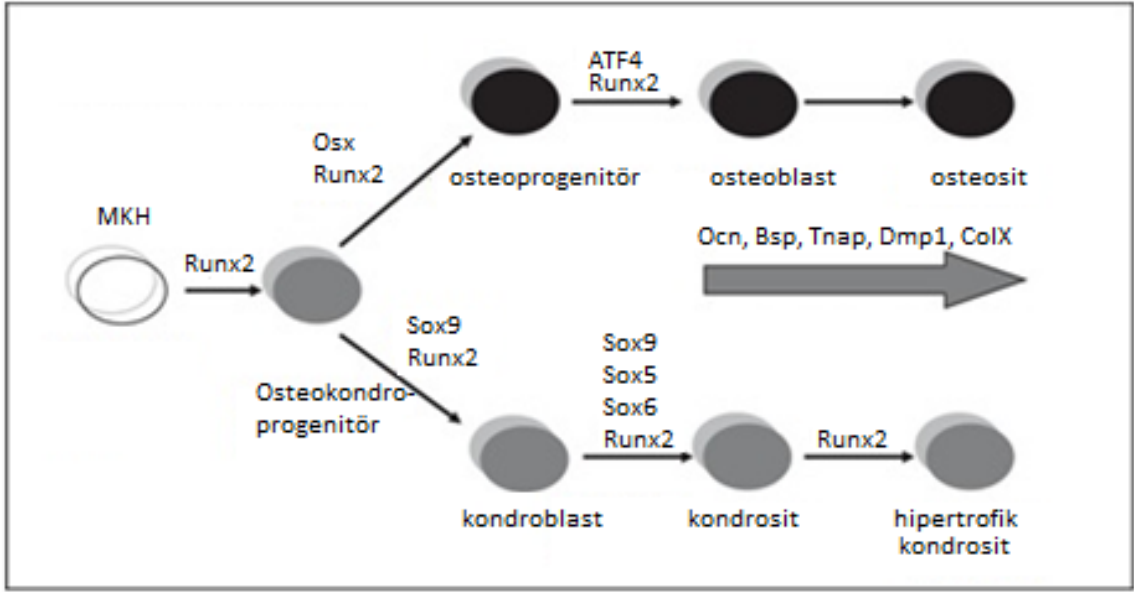


Şekil 2.5: In vitro ortamda MKH farklılaşması. Nombela-Arrieta C vd. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır [27].

2.6.1. Osteojenik Farklılaşma

Kemik Morfojenik Protein ailesi (BMPlar); özellikle BMP-2 VE BMP-6, MKH'lerde osteojenezi uyarır. BMP-2, Runx2 asetilasyonunu ve buna bağlı aktivasyonunu sağlar. Bu asetilasyon, histon deasetilaz 4 ve 5'e özgü olup sonucunda SMURF1, SMURF2 ve E3 ubiquitin ligaz degradasyonu sağlanır. İnflamasyon aracılı kemik yıkımında işlevsel olan sitokin TNF- α da SMURF1 ve SMURF2 degradasyonunu artırarak Runx2 protein seviyesini düşürür [33].

Runt-related transcription factor-2 (Runx2 ya da diğer adıyla Cbfa1) osteojenezi düzenleyen ana faktör olup aynı zamanda hipertrofik kırık oluşumunda da önemli bir role sahiptir [61]. Günümüzde Runx2'nin mezoderm kökenli hücreleri osteojenik dizi oluşumuna yönlendirmede gerekli ve yeterli olduğu gösterilmiştir [62].



Şekil 2.6: MKH'lerin osteojenik ve kondrojenik farklılaşması. Franceschi RT vd. Ann N Y Acad Sci. 2007 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır [63].

Runx2 iskelet oluşumunun erken safhalarında eksprese olmaya mezenkimal yoğunlaşmasının olduğu bölgelerden başlar [63]. Runx2 ile birlikte pek çok transkripsiyon faktörü, hücrelerin kondrosit ya da osteosit dizilerine farklılaşmalarını kontrol eder. Osteoblastlar için bu kontrol, osteokondroprogenitör hücreleri osteoblast dizisine yönlendiren *Osterix* (Osx) ile gerçekleşir [64].

Transkripsiyonel düzenlemeye ek olarak Runx2'nin görevi, post transkripsiyonel modifikasyonlar (fosforilasyon ve asetilasyon) ile diğer nükleer ko-aktivatör ve ko-stimülatörler kontrolündedir. Runx2 ekspresyonu β -katenin, msh homeobox ve distal-less homeobox 5 gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. *Small heterodimer partner-interacting leucine zipper protein* (SMILE), kurduğu temas ile Runx2 transkripsiyonunu baskılar. Runx2 ile glukokortikoid reseptörünün fiziksel ilişkisi, Runx2'nin işlevinin baskılanması ile sonuçlanır. Bir histon metiltransferaz olan ESET'in Runx2 ile ilişkisi sonucunda Runx2'yi baskıladığı gösterilmiştir. Bir histon demetilaz olan Jmjd3'ün Runx2 ve osteojenezde temel işleve sahip bir diğer transkripsiyon faktörü olan Osx'in promotor aktiviteleri için gerekli olduğu gösterilmiştir. PCAF ise direkt olarak Runx2'ye bağlanıp asetilasyonu sağlayarak Runx2'nin transkripsiyonel aktivitesini artırır [62].

Osx, aynı zamanda specificity protein 7 olarak da bilinmekte olup bir çinko parmak osteoblast spesifik transkripsiyon faktörüdür [64]. Çeşitli osteoblast farklılaşma genlerinin promotor aktivitelerini indükler. Runx2 ve Osx, BMP-2 yolağını baskırlar. Yapılan bir hayvan modeli çalışmasına göre Osx-null farelerde Runx2 ekspresyonu normalden Runx2-null farelerde Osx ekspresyonu gözlenmemiştir [65].

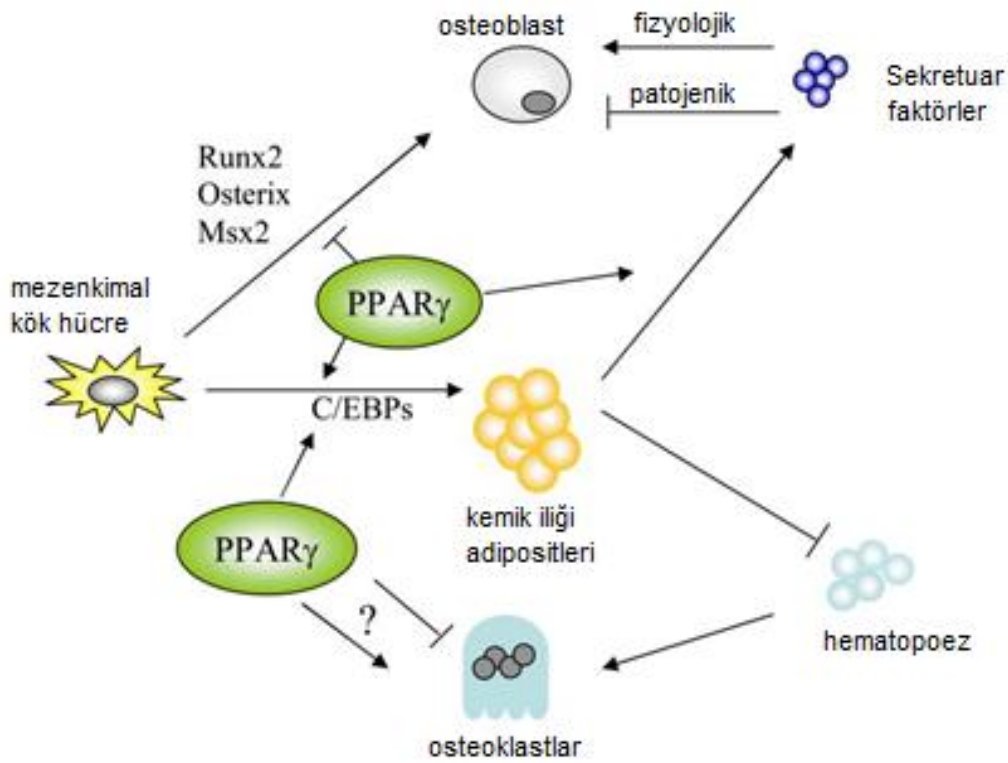
Osx aktivitesi; fosforilasyon ve ubiquitinleme gibi post translasyonel modifikasyonlarla düzenlenir. Osx'in transkripsiyonal aktivitesini; p38 MAPK ile fosforilasyonu ve Akt artırır. Glikojen sentez kinaz 3- α ve kalmodulin-bağımlı kinaz II;

Osx'in transkripsiyonel aktivitesini, protein seviyelerini ve protein stabilitesini artırır. Ek olarak Osx ile bazı diğer transkripsiyonel faktörlerin ilişkileri Osx aktivitesinde artış ile sonuçlanır.

Ayrıca, Osx promotör bölgesinde Osx bağlanma bölgelerinin bulunması, Osx ekspresyonunun temel kontrol mekanizmalarından birinin oto-regülasyon olduğunu göstermektedir [66].

2.6.2. Adipojenik Farklılaşma

Bir nükleer hormon reseptör transkripsiyonel faktör olan *peroxisome proliferator-activated receptor-γ* (PPAR γ), adipojenezin temel düzenleyicisidir. MKH'lerin adipositlere farklılaşmasında PPAR γ gerekli ve yeterlidir [67].



Şekil 2.7: MKH'lerin adipojenik farklılaşmaları. Nuttall ME vd. Calcif Tissue Int. 2014 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır [67].

PPAR γ 'ya bağlı ko-represörleri uzaklaştırıp ko-aktivatörleri bağlama özelliğine sahip lipin, PPAR γ aktivitesini düzenleyen ana faktörlerdendir. PPAR γ düzenleyicilerinden birisi, PPAR γ mRNA ekspresyonunu inhibe eden Wnt- β -catenin yolağıdır. Wnt sinyali, histon metilasyonu yolu ile PPAR γ transaktivasyonunu inhibe eden metil transferaz ESET'i aktive eder [68]. TNF- α ya da TAK1/TAB1/NIK sinyal kaskadı, PPAR γ aracılı adipojenezi inhibe eder [69]. Nocturnin, PPAR γ 'ya bağlanarak adipojenezi sağlar [70]. Bir çinko parmak transkripsiyon faktörü olan SNAIL, promotör bölgesine bağlanarak PPAR γ transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder [71]. SREBP1, adiposit farklılaşması ve kolesterol dengesini kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür.

PPAR γ promotoruna bağlanan SREB1, PPAR γ ekspresyonunu artırır [72]. PPAR γ 'ya bağlı ko-represörleri uzaklaştırıp ko-aktivatörleri bağlama özelliğine sahip lipin, PPAR γ aktivitesini düzenleyen ana faktörlerdendir. Hem GATA2 hem de GATA3 direkt olarak PPAR γ 'ya bağlanarak adipojenezi negatif yönde etkilerler. Bu negatif etki kısmen C/EBP α ya da β ile protein kompleksi oluşturmaları sonucu meydana gelir [73,74].

In vitro ortamda PPAR γ ligand antagonisti olan TZD uygulaması, MKH'lerin osteojenezini baskımlarken adipojenezi artırmıştır. Hayvanların çeşitli tiyazolidindionlara maruz bırakıldığı bir çalışmada ise çoğu tiyazolidindionun hayvanlarda kemik iliği yağ miktarını yükseltirken kemik kütlelerinde azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir [62].

C/EBP, adipojenezin düzenlenmesinde anahtar role sahip bir başka transkripsiyon faktörüdür. C/EBP α 'nın yüksek miktarda ekspresyonu fibroblastlarda adipojenezi indüklerken C/EBP α olmadan adipojenezin inhibe olduğu gösterilmiştir [75,76]. C/EBP ekspresyonu, PPAR γ ekspresyonunu da kapsayan bir pozitif feedback döngüsü ile düzenlenir. PPAR γ promotorunda C/EBP bağlanma bölgeleri bulunmaktadır [77]. C/EBP homolog proteinleri, C/EBP ile ilişki kurarak adipojenezi baskımlarlar [78]. Ayrıca post translasyonel modifikasyonların ve epigenetik mekanizmaların da C/EBP α ekspresyonunun ve fonksiyonunun düzenlenmesinde rolü vardır.

2.6.3. Kondrojenik Farklılaşma

Kondrositler, osteoblastlar ile aynı mezenkimal progenitörlerden köken alırlar [79]. Bu hücreler osteokondroprogenitörler olarak adlandırılıp hem Sox9 hem Runx2 hem de β -catenin eksprese etmeleri sebebi ile bipotent addedilirler [80].

Bir transkripsiyon faktörü olan Sox9, kondrojenezin temel düzenleyicisidir. Sox9, Col2a1 ve AGC1 gibi kondrosit-spesifik genlerinin ekspresyonunu aktive eder ve Sox9 ile sağlanan negatif ile pozitif transkripsiyonel kontrol, kondrositlerde faza özgü gen ekspresyonu ile farklılaşmayı sağlar. Ayrıca Sox5 ve Sox6 birlikte Sox9 fonsiyonlarını artırır. Endokondral kemik ve kıkırdak oluşumu için kondrojenezin, kondrosit proliferasyonunun ve mitotik olmayan hipertrofik duruma geçişin Sox9 ile düzenlenmesi gereklidir. Sox9 geninde meydana gelen heterozigot mutasyonlar insanda, endokondral kemiklerde hipoplazi ile karakterize edilen iskelet displazisi olan kampomelik displazi sebebidir [61].

Sox9 geninin ekspresyonu çeşitli transkripsiyonel ko-aktivatörler, histon modifiye edici enzimler, genin transaktivasyon bölgesine bağlanan transkripsiyonel düzenleyiciler ile düzenlenir. Kondrojenezin temel transkripsiyonel faktörleri üzerine çalışmalar 1980lerde başlamıştır. Bu araştırmalar ilk olarak transkripsiyonel düzenleyici Col2a1 üzerinde yoğunlaşmıştır, çünkü bu gen kondrositlere özgü olup Tip II kollajeni kodlamaktadır [80].

Wnt sinyal yolağı kondrojenezini inhibe eder. β -catenin, Wnt yolağının transkripsiyonel indükleyicisi olup preosteoblastlarda seviyesi yükselirken prekondrositlerde seviyesi azalır. Sox9; β -catenine bağlanarak degradasyonunu indükler, bu da β -catenin transkripsiyonel aktivitesinin engellenmesi ile sonuçlanır [81]. Sox9 ayrıca β -catenini yok eden bir kompleksin alt birimleri olan glukojen sentez

kinaz 3 ve β -transdüsün tekrar-içeren protein genine de bağlanarak β -catenin fosforilasyonunu sağlar [82].

Wnt sinyal yolağında, bir transkripsiyonel düzenleyici olan Twist1 de baskılayıcı olarak rol oynar. Yapılan bir araştırmada kondrojenik hücrelerde Wnt sinyal yolağının Twist1 ekspresyonunu indüklediği gözlenmiştir. Ayrıca kondrosit öncüllerinde Twist1'in ektopik ekspresyonunun baskılandığı, bunun da Col2a1 ve AGC1 gibi kondrosit belirteç genlerinin ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir [83]. Notch sinyal yolağı da Sox9 transkripsiyonunu baskılayarak kondrojenezini inhibe eder [84].

2.7. MKH'lerin Terapötik Etkileri ve Tedavilerde Kullanımı

İnsanlarda çoğu doku ve organ spontan olarak yenilenemez. Bu sebeple günümüzde hücresele terapiler doku ve organ tamirinde kullanılmaktadır. MKH'lerin hasarlı dokulara yerleşme özellikleri vardır. Hasarlı dokuya yerleştikten sonra bölgedeki inflamatuvar sitokinler, TLR ligandları ve hipoksi ile uyarılırlar ve sonuç olarak doku yenilenmesini sağlayan çeşitli faktörleri salarlar [85,86]. Ayrıca MKH'ler inflamasyonu ve apoptozu baskılayan, anjiyogenez ve doku yenilenmesini uyarayan büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler salarlar [87]. Kemik iliği kökenli hematopoietik kök hücrelerin terapötik kullanımlarının başladığı 1960'lardan beri çoğalıp farklılaşarak çeşitli dokuları meydana getirebilen progenitör hücreler ile yapılan çalışmalar gittikçe artmaktadır. Kullanımları için etik engeller bulunmamaları sebebi ile kemik iliği, adipoz doku ya da Wharton Jeli'nden elde edilen MKH'ler rejeneratif tıp klinik uygulamaları için potansiyel taşımaktadır. Ayrıca bu hücrelerin allojenik immün yanıtı engelleyebilecekleri ve immün düzenleyici etkileri olabileceği gösterilmiştir. Tüm bu özellikleri, rejeneratif tıpta kullanılabilmesi için onları ilgi çekici adaylar haline getirmektedir. Günümüzde MKH'lerin farklı klinik uygulamaları üzerine çalışmalar devam etmektedir [15].

İlk başarılı kemik iliği transplantı 1950'lerin sonunda, graft-versus-host hastalığı gibi problemleri engellemek amacı ile biri lösemi olan identik ikizler arasında gerçekleştirilmiştir [88]. 1968 yılında ise donörün, hastanın kardeşi olduğu ilk başarılı allojenik nakil uygulanmıştır [89]. Donör ve alıcının akrabalığının bulunmadığı ilk transplant ise 1973'te New York'ta gerçekleştirilmiştir. Bu durumda alıcı, genetik immün yetmezlik sahibi bir çocuk iken donör, Danimarka'da kan bankasından bulunmuştur. Bir lösemi hastasına yapılan ilk başarılı nakil ise 1979 yılında gerçekleşmiş olup o günden bu zamana kadar kemik iliği nakli gittikçe daha sık uygulanan bir prosedür halini almıştır [90].

Tıp disiplinlerinin çoğunluğunun önümüzdeki on yıl içinde rejeneratif tıpta gerçekleşen gelişmelerden yararlanacakları öngörülmektedir. MKH uygulamalarının çoğu, tek istisnası kemik iliği transplantasyonu olmak üzere, henüz deney aşamalarında. Günümüzde üç binden fazla klinik denemesi yapılan hücresele terapi; kanser tedavisi ve rejeneratif tıp için potansiyel vaatmektedir.

Ancak, kök hücre terapi uygulamalarının klinikte kullanılmaya başlanmasından önce; hem transplantasyon sonrası davranışlarının, hem de hasarlı mikro çevre ile olan

ilişkilerinin daha iyi anlaşılması gereklidir. Günümüzde kök hücrelerin etki mekanizmaları hala araştırılmaktadır.

Yaşlanmanın, MKH'lerin fonksiyonel özelliklerindeki azalma ile birlikte organların tamir kapasitelerindeki düşüşle bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple MKH tabanlı terapilerin başarı oranlarının donörün yaşı ile yakından ilişkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bunu destekleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yaşlanmakta olan farelerden elde edilen Kİ-MKH'lerde sayıca azalmaya ek olarak proliferasyon, farklılaşma, anjiyogenik özelliklerde artmaya ek olarak apoptoz ve yaşlılıkla ilişkili özellikler gözlenmiştir.

2.7.1. Graft Versus Host Disease (GVHD)

GvHD; allojenik kök hücre nakli sonrası görülebilen, ölümlü sonuçlanma potansiyeli olan bir hastalıktır. Steroide dirençli GvHD için uygulanan tedaviye verilen yanıt zayıf olmakla birlikte hastalığın genel olarak kabul gören bir tedavisi bulunmamaktadır [91]. MKH'lerin klinikte en yaygın çalışıldığı alan allojenik nakil sonrası meydana gelen GvHD'nin tedavisidir. İmmün-düzenleyici özellikleri sebebiyle Kİ-MKH ve AD-MKH'ler bu hastalığın tedavisinde başarıyla kullanılmışlardır. Yapılan bir çalışmada 19 kronik GvHD hastasına MKH verilmiş, sonuç olarak bu hastaların 14'ünde kısmen ya da tamamen iyileşme görülürken 5 hasta kullandıkları immüsupresif ajanları bırakmışlardır. Bu çalışmada 2 yıllık sağkalım oranı %77,7 olarak belirtilmiştir. Hiçbir hasta MKH terapisine bağlı yan etki bildirmemiştir [92]. MKH'lerin olumlu etkileri, ağır ve steroidlere dirençli GvHD görülen 55 çocuk ile yetişkini kapsayan bir faz II çalışmasında da bildirilmiştir. İntravenöz otolog MKH infüzyonu uygulaması sonrasında, tedaviye cevap veren hastalarda daha yüksek hayatta kalım oranı ve transplantasyona bağlı ölümlerde belirgin derecede azalma izlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, 8'i steroidlere dirençli akut GvHD ve 1'i kronik GvHD hastası olan toplam 9 katılımcıya sistematik olarak MKH enjeksiyonu uygulanmış ve 8 hastanın 6'sında iyileşme izlenmiştir. Hastalardan ikisi herhangi bir sebep olmaksızın tedaviye cevap vermeden kısa süre sonra ölmüştür [93]. Steroide dirençli GvHD görülen 58 yetişkin hastaya MKH uygulandığı bir çalışmada 5 hastada tam iyileşme görülmüş, 5 hastada olumlu sonuçlar alınmış, 17 hasta tedaviye kısmen cevap vermiş, 31 hasta ise tedaviye cevap vermemiştir [91]. Steroide dirençli GvHD hastası 37 çocukla yapılan bir diğer faz II çalışmasında hastaların %59'unda tam iyileşme görülmüştür. Bu hastalarda transplanta bağlı ölüm oranı %14 iken diğer hastalarda bu oran %60'tır. 2,3 yıllık takip süresi sonucunda sağkalım oranı %62 olarak belirlenmiştir [94].

MKH tedavisinin etkinliğinin belirlenmesinde kullanılacak biyobelirteçlerin tespiti için, MKH terapisi görmüş bir hasta grubunda akut GvHD gelişimi ile ilişkili iki faktörün serum seviyeleri tedavi öncesinde ve sonrasında ölçülmüştür. Tedaviye cevap veren hastalarda bu iki faktörün plazma seviyelerinde azalma tespit edilmiştir [95]. Bu sonuç, MKH'lerin terapötik etki gösterebilmeleri için inflamatuvar çevre koşulları ile uyarılmaları gerektiğini gösteren bulgular ile örtüşmektedir [96].

MKH'ler aynı zamanda allojenik hematopoietik kök hücre naklini takip eden diğer komplikasyonların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bir raporda, nakilden sonra çeşitli komplikasyonlar görülen 15 hastaya MKH tedavisi uygulanmıştır. 12 hastaya ağır hemorajik sistit için intravenöz MKH infüzyonu verilmiştir ve sonucunda 8 hastada 1-14 günler arasında hematüri belirtileri kaybolmuştur. 2 hastada görülen pnömomediastinum, MKH tedavisi sonrasında iyileşmiştir. Ağır gastrointestinal GvHD görülen ileri yaşta bir kadın hastada kolon perforasyonu ve peritonit iyileşmiştir [97]. Bir faz I çalışmasında, pnömodinastinum/pnömotoraks görülen iki transplant hastasına haftalık olarak sabit dozda (2×10^6 /kg) Kİ-MKH üç hafta boyunca intravenöz yoldan verilmiş ve komplikasyonlarda iyileşme görülmüştür. MKH infüzyonuna hızlı cevap verilmesi, inflamatuvar sitokinlerdeki azalma ile ilgilidir [98]. Bu çalışmalardan hareketle, MKH'lerin sahip oldukları immün-düzenleyici ve anti-inflamatuvar etkileri ile akut doku toksisitesi tedavisinde yeni bir tedavi yöntemi olabilecekleri söylenebilir.

Tüm bu bilgiler birlikte değerlendirildiklerinde intravenöz MKH infüzyonu GvHD tedavisi için güvenilir ve önemli bir terapi olarak görülmektedir. Terapide, çocuklarda ve tedavinin erken evrelerde uygulanmaya başladığı hastalarda daha olumlu sonuçlar elde edilebilmektedir [99].

2.7.2. Miyokard Enfarktüsü

Günümüzde kalp hastalıklarının tedavisi için uygulanan kırktan fazla kök hücre terapisi; ağırlıklı olarak kemik iliği, Wharton jeli ve adipoz doku kök hücreleri ile yapılmıştır [100,101]. Farklı cinsiyetler arasında kardiyak aşılama yapılmış bireylerden otopside alınan örneklerin histolojik incelemelerinde alıcılarda, miyokardiyal dokuda donör genotipine sahip kardiyomiyositlere rastlanmıştır [102]. Doku tamirini sağlayan moleküler sinyaller tam olarak bilinemekte birlikte, iskemi süresince salınan bazı sitokinlerin etkili olabileceği düşünülmektedir [15].

Domuz, koyun ve köpek modelleri ile yapılan çeşitli hayvan çalışmaları ile kronik ve akut miyokardiyal enfarktüs sonrası ventriküler fonksiyon bozukluğunda MKH terapisinin etkinliği incelenmiştir. Araştırmalarda; verilen hücrelerin çoğunun, uygulanan metottan bağımsız olarak akciğer ve dalakta toplandığı görülmüştür. Ancak çalışmalar, MKH'lerin kalbe yerleşip çoğalabileceği kanıtlanmıştır [19]. 2001 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir ki, β -galaktozidaz reporter geni ile transfekte insan MKH'lerinin immün yetmezlik gösteren farelerin kalplerine enjekte edildiği zaman enjeksiyondan 4 gün sonra yalnızca %0,44'ünün miyokarda yerleşmektedir ve zaman içinde hayvanda bulunan kardiyomiyositlerden ayırt edilemeyecek bir morfoloji almaktadırlar [103]. Enjeksiyondan 14 gün sonra anti- β -galaktozidaz ile yapılan immunfloresans çalışması ile miyokardiyuma yerleştirilen MKH'ler tanımlanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada ise araştırmacılar miyokard enfarktüsü modeli oluşturulan domuzlarda direkt miyokardiyuma Di-I ile işaretli otolog MKH enjekte etmiştir. Başarılı enjeksiyon işaretli hücrelerin takibi ile gösterilmiş, ayrıca enjeksiyondan 2 hafta sonra eksprese edilen kardiyomiyosit belirteçleri ile de kanıtlanmıştır [104]. Bir başka domuz kronik iskemik kardiyomiyopati modelinde erkek domuzlardan alınan Kİ-MKH'ler dişi domuzlara nakledilmiş ve Y kromozomu takip edilerek enjekte edilen MKH'lerin

yaklaşık %14'ünün kardiyomiyositleri oluşturduğu, aynı zamanda yapısal kardiyak proteinlerin ve transkripsiyonel faktörlerin işaretlenmesi ile gösterilmiştir. MKH'lerin koroner anjiyogenezde rol aldığı da gösterilmiştir [105]. Statin ile kombine intramiyokardiyal KI-MKH uygulanan bir domuz akut miyokardiyal enfarktüs modelinde statinin kardiyomiyosit farklılaşmasını dört kat artırdığı kanıtlanmıştır [106]. Kronik iskemik kardiyomiyopati modeli oluşturulan köpeklerde, verilen MKH'lerin vasküler fenotipte hücelere farklılaştığı gösterilse de kardiyomiyositlere farklılaşma gösterilememiştir [107]. Sadece koyunlar ile yapılan bir çalışmada MKH'lerin kardiyomiyositlere dönüşümü gösterilememiştir [108]. Miyokardiyal enfarktüs tedavisinde hücrelerin acil elde edilmeleri gerekliliği, terapinin kısıtlayıcı yanıdır. Kemik iliğinden alınan hücrelerin intrakoronar enjeksiyonu sonucu hücrelerin en fazla %3'ünün sol ventriküle yerleştiği gösterilmiştir. Kalp yetmezliği durumunda hücre terapisi etkisiz kalacaktır. Günümüzde miyokardiyal enfarktüs için onaylanmış hücresel bir terapi bulunmamaktadır [15].

2.7.3. Osteoartrit

Dejeneratif eklem hastalıkları içinde osteoartrit en sık rastlanılan hastalık olup herhangi bir sinoviyal eklemi etkileyebilir [109]. Hastalığın prevalansı yaş ile birlikte artış göstermektedir ve ilerleyen yıllarda hastalık ile ilgili masrafların sosyoekonomik bir yük oluşturacağı tahmin edilmektedir. Henüz hiçbir tedavi yöntemi, bu hastalığın ilerleyişini engellemekte tam etkinlik gösterememiştir. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemleri; aktivite modifikasyonu, konservatif ağrı tedavisi, kilo kaybı, ve gerekli görüldüğü takdirde cerrahi müdahaledir [110]. İlk seçenek olarak eklem üzerindeki stresi azaltma yöntemleri sonuçsuz kaldığı zaman bir diğer seçenek olan kortikosteroid kullanımları düşünülebilir. Günümüzde bir sene içinde bir eklem en fazla dört iğne yapılması önerilmektedir [111]. Bu tedavinin etkinliği hastaya göre değişmekte olup yapılan kortikosteroid enjeksiyonları arttıkça ilaçların etkinlikleri azalmaktadır [112]. Ayrıca kortikosteroid enjeksiyonlarının kondrositler ve MKH'ler üzerinde toksik etki gösterdiği bilinmektedir, ancak bu toksisitenin derecesi kullanılan ilacın formülasyonuna bağlıdır [113]. Eğer kortikosteroid tedavisi başarısız olursa hyalüronik asit enjeksiyonları uygulanabilmekle birlikte yapılan çalışmalara göre bu tedavinin sonuçları değişkenlik göstermektedir [114]. Osteoartrit için en başarılı tedavi, eklem yapay bir protez ile değiştirilmesidir. Modern tıptaki en başarılı prosedürlerden birisi total eklem değişimi olmakla birlikte bazı komplikasyonlar görülmektedir; prostetik eklemler tam fonksiyona sahip değildir [115]. Eğer kortikosteroid tedavisi uygulanan bir prostetik eklem enjeksiyon yapılacak ise en az 8-12 hafta enjeksiyon için beklenmelidir [111].

Osteoartrit patofizyolojisinde MKH'lerde azalmanın etkili olduğu düşünülmektedir. Hastaların MKH'lerinin proliferasyon ve farklılaşma kapasitelerinde azalma görülmekle beraber sayıca da azalma izlenmektedir. Bu hastalarda, özellikle kondrojenez ve adipojenezde azalma görülürken, osteojenez artmaktadır [116]. Osteoporoz ve osteonekrozda da MKH fonksiyonlarında değişimler tespit edilmiştir [110].

Pek çok araştırmacı tarafından MKH'ler, özellikle osteoartrit gibi dejeneratif patoloji görülen hastalıklarda, kas-iskelet sisteminin rejenerasyonu için ideal bir hüresel terapi aracı olarak görülmektedir. Osteoartrit gibi dejeneratif hastalıklarda kondrosit kullanımına göre MKH'lerin bazı avantajları vardır: kültüre edilmeleri daha kolaydır, kondrositler özelleşmiş hcrelerken MKH'ler eklemi oluşturan tüm dokulara farklılaşma kapasitesine sahiplerdir, proliferasyonları daha hızlıdır ve bu süreçte fenotiplerini daha iyi korurlar.

MKH'ler her ne kadar eklem yüzeylerinin tamiri için ideal bir kaynak olarak görülseler de temel faydaları sağladıkları parakrin etkiyle görülmektedir [117]. Enjeksiyon sonrasında eklem dokularında rejenerasyon tespit edilmiş de olsa yapılan çalışmalar, bu onarımın ağırlıklı olarak dokunun kendi hücreleri tarafından gerçekleştirildiğini göstermektedir [118]. MKH enjeksiyonunu takiben hastada Tip II kollajen üretiminin arttığını ve hücre sinyallerinde değişimler olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [119]. MKH'lerin anti-inflamatuar ve immünmodülatör etkileri de bu bulguları desteklemektedir [120].

Post-tramvatik osteoartrit modelinin uygulandığı bir hayvan çalışmasında, keçilere otolog MKH nakli yapılmış ve kontrol grubuna göre enjeksiyon yapılan hayvanlarda iyileşme tespit edilmiştir. Nakledilen MKH'ler ilk olarak sinoviyal ve meniskal yüzeylere yerleşerek düzenleyici etki yaratmışlardır. Çeşitli hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalardan da bu bulguları destekler sonuçlar elde edilmiştir.

Pre-klinik çalışmalardan elde edilen sonuçları işığında klinik çalışmalar başlamıştır. Çoğu başlangıç aşamasında da olsa 2015 itibari ile Birleşik Devletler'de MKH'ler ile osteoartrit tedavisine yönelik devam eden 15 klinik çalışma devam etmektedir. Bu çalışmaların çoğunda Kİ-MKH'ler ya da AD-MKH'ler kullanılmaktadır. Otolog nakil uygulanan çalışmalarda umbilikal kordon kanı ya da Kİ-MKH'lerden yararlanılmaktadır.

Bu yapılan çalışmalar arasında, bir dozda verilen hücre miktarı değişkenlik göstermektedir. Çalışmaların oğunda MKH'ler direkt olarak enjekte ediliyor olsa da bazı araştırmacılar hyaluronik asit gibi destekleyici maddeler kullanılmaktadır.

Her ne kadar MKH'ler hasarlı eklemde tamirinde bölgede yeni bir doku oluşturmaya elverişli özelliklere sahip olsalar da elde edilen sonuçlar bu hücrelerin etkilerini daha çok parakrin etkileri ile gösterdiklerini işaret etmektedir. Osteoartrit kullanımında MKH'lerin kullanımının standardizasyonu için hücrelerin ideal kaynaklarının, enjeksiyon öncesi izlenen basamakların ve hasarlı bölgeye nasıl ulaştırılacaklarının belirlenmeleri gerekmektedir. Her ne kadar güncel çalışmalar ağırlıklı olarak yalnızca hücrelerin enjekte edildiği Şekilde devam etse de yardımcı olarak biyomatriks kullanımının terapinin etkinliğini arttırabileceği düşünmektedir [110].

2.7.4. Karaciğer Fibrozu

Hepatit, alkol ya da ilaç kullanımı, metabolik hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve konjenital anomaliler sonucu meydana gelebilen karaciğer fibrozu hepatik siroz ve karaciğer yetmezliğine sebep olabilir. Günümüzde, son evredeki karaciğer fibrozunun

tedavisinde tek etkili tedavi yöntemi karaciğer naklidir [121]. Son evredeki karaciğer hastalıkları ve akut karaciğer yetmezliği için karaciğer nakli uygulanmaktadır; ancak nakil, organ donörleri ile sınırlıdır. Ayrıca bazı hastalar için organ nakli gibi ağır bir prosedürün uygulanması zorlayıcı olabilmektedir. Son zamanlarda hepatik hastalıklarda kök hücre nakli, etkili bir alternatif tedavi yöntemi olarak görülmektedir [122]. Karaciğer bozukluklarında hücresel terapi uygulanabileceği yönündeki kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır.

EKH'lerin, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSC), hematopoietik kök hücrelerin ve MKH'lerin hem in vivo hem de in vitro ortamda hepatosit benzeri hücrelere dönüşebildiği bilinmektedir. Bu hücre tipleri arasından MKH'lerin kolay ulaşılabilir olmaları, yüksek proliferatif kapasiteleri ve ex vivo ekspansiyon gibi avantajları vardır. Ayrıca bu hücreler hasarlı dokulara göç edebilir, saldıkları çeşitli tropik faktörler ile hasarlı dokunun onarımını hızlandırabilirler [123].

Yapılan iki çalışmada erkek donörlerden alınan Kİ-MKH'lerin nakledildiği kadınlarda, uygulanan otopsi sonucu Y kromozomuna sahip hepatositlerin bulunduğu gösterilmiştir [124,125]. Siroz tedavisinde MKH'lerin etkinliğinin belirlenmesi üzerine yapılan klinik araştırmalarda dört dekompanse siroz hastasına periferel damar yolu ile Kİ-MKH verilmiştir. Uygulamadan sonra takip süresince hiçbir yan etki gözlenmemiş, takip süresi sonunda hastaların yaşam kalitesinin arttığı belirtilmiştir [126]. Bir faz 1-2 çalışmasında, periferel ya da portal damar yoluyla 30-50 milyon hücre verilen siroz hastalarında karaciğer fonksiyonlarında düzelmeye tespit edilmiştir [127]. Otolog Kİ-MKH'lerinin alkolik siroz tedavisine etkisinin araştırıldığı bir faz 2 çalışmasında hastalara hepatik arterden 4. ve 8. haftalarda 5×10^7 hücre verilmiştir. Sonuç olarak Laennec Fibrosis Skoru'na göre 11 hastanın 6'sında histolojik iyileşme izlenmiş (%54,5), Child-Pugh skoru 10 hastada iyileşmiştir (%90,9). MKH terapisi sonrası TGF- β 1, Tip I kollajen ve α -SMA'da belirgin düşüş tespit edilmiştir [128]. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla başka çalışmaların sonuçları örtüşmektedir. Otolog kemik iliği kökenli hepatosit benzeri hücrelerin intrasplenik ve intrahepatik yolla 20 son seviye karaciğer yetmezliği hastasına nakledilmesi sonucu hastaların karaciğer fonksiyonlarında gelişme izlenmiştir [129]. Hepatit B ile ilişkili karaciğer yetmezliği hastalarında, otolog MKH enjeksiyonu uygulanan grup ile kontrol grubunun 192 haftalık kontrol süreci sonundaki karşılaştırmalarında, karaciğer fonksiyonlarında düzelmeye ek olarak hepatosellüler karsinoma ya da ölüm oranları arasında belirgin bir farklılık tespit edilmemiştir [130].

Karaciğerde üç farklı hücre tipi bulunduğu için büyüme ve rejenerasyon süreçleri oldukça karmaşıktır. Bu yüzden bu üç hücre tipine de farklılaşabilen bir kök hücre tipi kullanımı uygun görünmektedir. Günümüzde, çoğu siroz üzerine olmak üzere yapılmış 32 klinik denemede MKH'lerin in vitro ortamda farklılaşarak hepatosit benzeri bir fenotip gösterdikleri kanıtlanmıştır [129].

MKH'ler karaciğer fibrozunun pre-klinik ve klinik çalışmalarında yaygın olarak kullanılıyor olsalar da fibrojenik potansiyelleri ve tümör gelişimi ile onkojeniteyi artırıcı etkileri göz önünde bulundurulmalıdır. Hücrelerin enjeksiyon yolu ve karaciğer bozukluğunun durumuna göre MKH'ler hepatositler yerine miyofibroblastlara dönüşebilirler. Kronik hasarlı karaciğere göre akut hasarlı akciğerde hücrelerin tutunma

oranları daha düşüktür. Ayrıca insanlarda akut karaciğer hasarında belirgin miktarda MKH miyofibroblast benzeri bir morfoloji göstermeye meyillidir. Ek olarak klinik denemelerde MKH'lerin malignant dönüşümü bildirilmemiş olsa da ex-vivo ekspansiyon süresince meydana gelebilecek genetik mutasyonlar göz önünde bulundurulmalıdır.

Karaciğer fibrozu tedavisinde kök hücre terapilerinin kullanılabilmesi için çeşitli düzenlemelerin yapılması gereklidir. Bunların ilki, MKH'lerin vücuda verilme yolunun standardize edilmesidir. İkincisi, terapötik etkinin artırılması için enjeksiyon sayısı ve enjekte edilen hücre miktarı optimize edilmelidir. Sonuncu olarak aşılana MKH'lerin hayatta kalma süresinin takip edilmesi, etkinliğin artırılması için önemlidir. Pek çok pre-klinik hayvan çalışmasında immünohistokimyasal analizlerle takip edilmiş olmasına rağmen klinik uygulamalarda enjekte edilen hücrelerin takibi ve tanımlanması için yöntemler geliştirilmelidir [131].

2.7.5. Diyabet

Diyabet tedavileri diyet, insülin kullanımı, oral yolla alınan hipoglisemik ajan kullanımı ya da pankreas veya adacık hücreleri naklidir. Plazma glukoz seviyesinin kontrol altında tutulması için ekzojen insülin tedavisi kullanılan en yaygın tekniktir. Ancak organ donörlerinin sayısının azlığı, çalışmaların kök hücreler ile tedaviye yönlmesine sebep olmuştur.

Tip I diyabet, pankreatik adacıkların lenfositik infiltrasyona uğradığı T hücre aracılı bir otoimmün hastalıktır. Oтореaktif T hücreleri timosit negatif seleksiyonundan kaçıp yeterli periferik düzenlenmenin olmadığı durumlarda otoimmüniteye sebep olurlar. Tip I diyabet tedavisinde standart tedavi insülin enjeksiyonudur. Ancak kan glukoz seviyesi sürekli değişkenlik gösterdiği için ekzojen insülin enjeksiyonları normal β hücrelerinin insülin üretimi yerine geçememektedir. Bu sebeple tedavide yeni β hücrelerinin oluşumlarının sağlanması amaçlanmaktadır. Kemik iliği, karaciğer, pankreas kök hücreleri, iPS hücreler ve embriyonik kök hücrelerin β hücrelerine farklılaştıkları bilinmektedir. Gelişim süresince hem karaciğer hem de pankreas endodermden köken aldıkları için hepatik kök hücreler, β hücrelerini oluşturmak için mükemmel adaylardır [132].

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, hayvan diyabet modellerinde insan Kİ-MKH'lerin diyabeti iyileştirdiği ve kan glukoz seviyesinin kontrolünü sağladığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmaya göre insüline bağımlı diyabette Kİ-MKH'ler, β hücrelerinin iyileşmelerini sağlamaktadır. Aynı zamanda MKH'lerin pankreasta β hücrelere özgü T hücre proliferasyonunu baskıladıkları da gösterilmiştir [133]. Tip I diyabet tedavisinde Kİ-MKH'ler günümüzde faz I, II ve III klinik çalışmalarda kullanılmaktadır.

Tip II diyabetin temel sebebi β hücrelerinin yeterli miktarda insülin üretememesidir. Hastalık gelişiminde genetik ve çevresel faktörler etkilidir. Adipositler de TNF α ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımı ile insülin direncini artırabilir ya da azaltabilirler [134]. Sıçanlarda otolog Kİ-MKH naklinin adacık hücrelerinin PDX-1 ve insülin ekspresyonlarını artırdığı, T hücre sitokinlerini düzenlediği bilinmektedir

[135]. İndüklenmiş Hem Oksijenaz-1 (HO-1) ile konjuge Kİ-MKH'lerin kemik içine enjekte edildiği bir çalışmada Tip II diyabeti tedavi edebileceği göstermiştir. HO-1'in etkisi; endotelyal progenitör hücrelerdeki anomalinin meydana gelmesinde, oksidatif stresin artıp adiponektin seviyesinin düşmesine bağlı bir MKH stroması bozulmasına işaret etmektedir [136]. Ayrıca Tip II diyabet tedavisinde intrapancreatip otolog kök hücre infüzyonu ve hiperbarik oksijen tedavisinin hastalarda metabolik kontrolü artırıp insülin ihtiyacını azalttığı görülmüştür [137].

EKH'lerin elde edilmeleri ve kullanılmaları için etik problemler mevcuttur. iPS hücreler ise tüm insan hücrelerine dönüşebilme kapasitelerine sahip olmalarına rağmen henüz klinik denemelerle bu hücrelerin kullanımının güvenilirliği kanıtlanmamıştır. Kİ-MKH'ler yetişkin kök hücreler açısından zengin olmakla birlikte günümüzde Tip I ve II diyabet tedavisinde kullanımının klinik faz I – IV denemeleri devam etmektedir [132].

2.7.6. Merkezi Sinir Sistemi Hastalıkları

Merkezi sinir sisteminin rejenerasyonunun kısıtlı olması, fonksiyonel tamirini sağlayacak terapötik stratejiler geliştirilmesinin önündeki en büyük engeldir. MKH'ler yüksek proliferasyon kapasiteleri ve farklı hücre dizilerine dönüşebilmeleri ile dejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanıma uygun adaylardır. MKH'ler nöron-benzeri hücrelere dönüşüp hasarlı dokuların plastisitesini düzenleyebilirler. Pek çok çalışma Kİ-MKH'lerin hem in vivo hem de in vitro ortamda nöronal, hatta dopaminerjik özellikler gösteren hücrelere farklılaşabildiklerini işaret etmektedir [138-140]. MKH'ler bu parakrin etkilerini; apoptozu inhibe edip nörojenezi, anjiyogenezi, nöronal ve glial hücre sağkalımını artırarak; fonksiyonel afferent ve efferent bağlantıları yeniden kurarak ve sinaptik transmitter salınımlarını düzenleyerek gösterirler. MKH'lerin doku hasarının oksidatif strese ve stresle indüklenen telomer kısalmasına bağlı olduğu durumlarda kullanımının mümkün olabilecekleri tespit edilmiştir; MKH'lerin oksidatif strese somatik hücrelere oranla daha dayanıklı olması, bu hücreleri yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanıma uygun kılmaktadır.

Beyne yerleştirildikten sonra MKH'lerin nöron büyümesini desteklediği, apoptozu azalttığı, serbest radikal seviyelerini düşürdüğü, aksonal büyümeyi destekleyerek yeni sinaptik ağların oluşumunu uyardığı, nöroinflamatuvar aktiviteleri düzenlediği ve ubiquitinlenmiş proteinlerin proteozomal degradasyonunu sağladıkları gösterilmiştir. Parakrin mekanizmalar sayesinde MKH'ler; çevredeki hasarlı konak hücreler ile etkileşip protein, RNA ve hatta mitokondri aktarımında bulunarak mikro çevreleri üzerinde etkili olabilirler.

Günümüzde Alzheimer, Parkinson, ALS, Huntington gibi tedavi edilemeyen kronik ve progresif nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde MKH terapisi kullanımı düşünülmektedir. Alzheimer fare modeli ile yapılan bir çalışmada Kİ-MKH'lerin parakrin etkileri, hücrelerin hastalık tedavisindeki potansiyel rolünü işaret etmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre fare Kİ-MKH'lerinin saldırdığı bir faktör olan prosaposin, olgun nöronları apoptotik ölümden korumaktadır. Ayrıca Huntington modeli oluşturulmuş bir rodent modelinde, bazı davranışsal bozuklukların tedavisinde

zenolog MKH naklinin iyileşmeye katkı sağlaması; Huntington kaynaklı nörodejenerasyon tedavisinde MKH naklinin uygun bir tedavi yaklaşımı olma potansiyelini göstermektedir [141].

2.7.7. Kök Hücrelerden Elde Edilen Bir İlaç: Prochymal

Prochymal (Remestemcel-L), Osiris Therapeutics tarafından geliştirilen, 18-30 yaş arası donörlerden toplanan Kİ-MKH'lerden oluşan, kullanılabilecek dondurulmuş olarak saklanan gerçek bir kemik iliği ürünüdür. Kemik iliğinden elde edilen MKH'ler kültürde çoğaltılarak tek bir donörden 10.000 dozluk Prochymal elde edilmektedir. İlaç hastaya herhangi bir immün baskılayıcı uygulanmaksızın intravenöz yoldan verilebilmektedir. Prochymal; 2009 yılında üç klinik denemede başarısız olmuş olsa da 2010 yılında Osiris, 59 tedaviye dirençli GvHD görülen çocuk ile FDA gözetimi altında yaptığı çalışmanın sonuçlarını açıklamıştır. Açıklanan sonuçlara göre Prochymal, hastaların %63'ünde iyileşme sağlamıştır. 2012 yılında akut GvHD tedavisinde Prochymal kullanımı Kanada tarafından onaylanmıştır ve genişletilmiş erişim kapsamında Birleşik Devletler'de ilaca erişim sağlanabilmektedir. Prochymal, dünyada kabul gören ilk kök hücre ilacıdır. GvHD hastalarına ek olarak akut miyokard enfarktüsü, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, Crohn hastalığı izlenen hastalarla yapılan çalışmalar da mevcuttur [142-144].

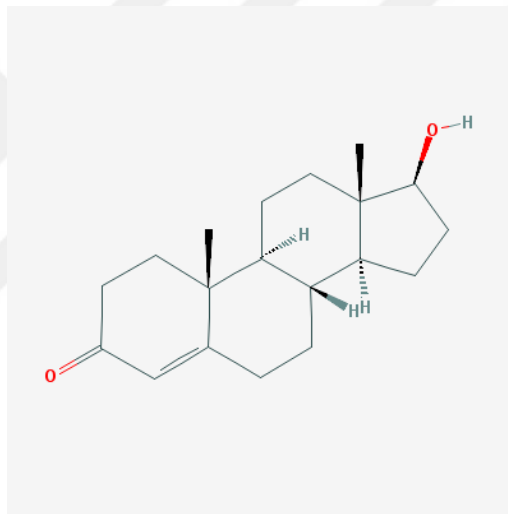
Kök hücrelerin klinikte uygulanmalarından önce açıklığa kavuşturulması gereken bazı sorular vardır:

- Kök hücreler istenilen hücre fenotipine nasıl dönüştürülür? Hücrenin farklılaşma aşamasında hangi biyolojik ve çevresel parametreler önemlidir? Mikroçevrenin rolü nedir?
- Hangi hastalığın tedavisinde hangi kaynaktan seçilen hücreler kullanılmalıdır?
- Hücre kültürü süresince genetik özelliklerde değişim görülme ihtimali var mıdır?
- Allojenik hücrelerin kullanılması durumunda olası immünolojik bariyerler nelerdir?
- İstenilen dokunun oluşumunu destekleyecek moleküller nelerdir?
- Hücrelerin klinik etkinlikleri hangi yöntemlerle takip edilmelidir?

2.8. Testosteron

Testosteron androjenik bir steroid olup erkeklerde testislerdeki Leydig hücreleri tarafından, kadınlarda ise overler ve adrenal bez tarafından üretilir. Testosteron üretimi, hipotalamustan salınan Gonadotropin Salıverici Hormon (GnRH) ile uyarılır. Hipofizden salınan LH ve FSH ile üretimi kontrol edilir. Dokulara göre testosteron, dihidrotestosteron ya da estradiole çevrilebilir.

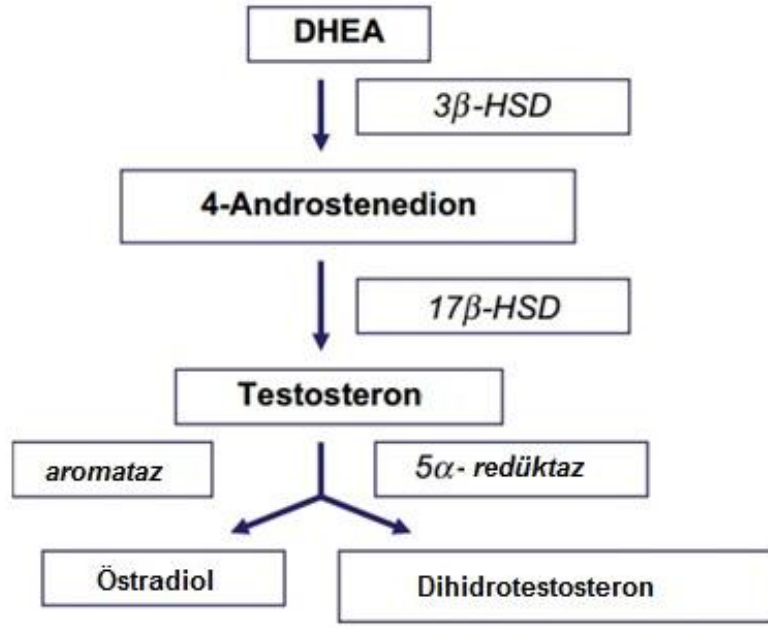
Testosteron ya da dihidrotestosteron ligand-androjen reseptör kompleksi bir transkripsiyon faktör kompleksi olarak etkisini göstererek çeşitli genlerin ekspresyonlarını uyarır. Dihidrotestosteronun androjen reseptörüne affinitesi daha yüksektir, gen ekspresyonunu daha etkin bir şekilde aktive eder. Ayrıca testosteron kısmen karaciğer ve adipoz dokuda aromataz enzim kompleksi tarafından geri dönüşümsüz olarak estradiole çevrilir. Testosteron ve dihidrotestosteron erkek cinsiyet özelliklerinin, iskelet kası ve saç foliküllerinin gelişimi ve korunumunda; estradiol ise epifizyal olgunlaşma ve kemik mineralizasyonunda işlevseldir [145].



Şekil 2.8: Testosteronun molekül yapısı [145].

2.8.1. Testosteron Sentezi ve Etkileri

Fenotipik erkek özellikleri; etkilerini cinsiyet farklılaşması, gelişimi ve ikincil erkek karakteristiklerinin oluşumunda gösteren androjenler tarafından kazanılırlar. Aynı zamanda androjenler spermatogenezin başlamasında ve devamlılığında işlevseldir. Androjen biyosentezinde defekt olan bireyler ile yapılan çalışmalar, iki androjenin net olarak tanımlanmasına olanak sağlamıştır: testosteron ve dihidrotestosteron. Testosteron, testislerde 17 β HSD Tip 3 enzimi tarafından 4-androstenediondan elde edilir. Dihidrotestosteron üretimi için ise 5 α -redüktaz enzimine gereksinim duyulmaktadır [146].



Şekil 2.9: Cinsiyet steroidleri biyosentezi. Luu-The V vd., Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. makalesinden modifiye edilerek alınmıştır [146].

Toplamda testosteron biyosentezinde görevli dört enzim vardır: 1. kolesterolden pregnanolon elde edilmesini sağlayan mitokondriyal enzim *Cholesterol side chain cleavage enzyme* CYP11A1, 2. pregnanolonun progesterona dönüşümünü sağlayan *3β-hydroxysteroid dehydrogenase* HSD3B, 3. progesteronun androstenediona dönüşümünü sağlayan *17α-hydroxylase/17,20-lyase* (CYP17A1), ve 4. androstenediondan testosteron eldesini sağlayan *17β-hydroxysteroid dehydrogenase* (HSD17B3). Testosteron periferel dokularda ve Leydig hücrelerinde ise iki izoformu olan *5α-redüktaz 1* ve *5α-redüktaz 2* tarafından dihidrottestosterona dönüştürülür [147].

Testosteronun periferel etkilerine Androjen Reseptörü (AR) aracılık yapmaktadır. AR'nin temel etki mekanizması direkt olarak gen transkripsiyonunu düzenlemek üzerinedir. Testosteronun androjen reseptörüne bağlanması heat-shock proteininin reseptörden ayrılıp androjen reseptörünün fosforilasyonuna aracı olur [148]. Meydana gelen AR dimeri, "hormone response element" olarak adlandırılan DNA'daki belirli bir diziye bağlanır ve bu şekilde gen ekspresyonu artırılması ya da azaltılması düzenlenir. Ayrıca AR, kinaz sinyal yollarını aktive ederek ve hücre içi kalsiyum seviyelerini düzenler. Testosteronun AR aracılı etkisine ek olarak metaboliti olan dihidrottestosteron ile de etki gösterir [149].

Tablo 2.1: Testosteronun cinsiyete göre etkileri

Etki	Erkekler	Kadınlar
Erkek cinsel karakteristikleri: testosteron erkek cinsel organları ve cinsel karakteristik özelliklerin gelişimini sağlar.	Testosteron ve DHT; cinsel gelişimde, deri kalınlaşması ve erkek tipi kıl oluşumunda fonksiyoneldir.	Kadınlarda hiperandrojenizm, erkek tipi kıllanma ile karakterize edilen hirsütizme sebep olur.
Duygudurum ve cinsel istek: hem erkeklerde hem de kadınlarda testosteronun cinsel isteği artırıcı etkisi vardır.	Erkeklerde testosteron artışı cinsel istekte artışla sonuçlanır. Yaşın ilerlemesi ile testosteron seviyesinde görülen düşüş, cinsel istekte azalmaya sebep olur.	Adrenal yetmezlik ve buna bağlı düşük androjen seviyeleri görülen kadınlarda DHEA replasmanı, cinsel istekte artış sağlamıştır.
Kemik oluşumu: testosteron, kemik kalınlığını ve periosteal kemik oluşumunu artırmaktadır.	Testosteron kemik üzerindeki etkisini, aromatisasyon ile östrojeni meydana getirerek gösterir. Bu durumun erkeklerin kemik gücünün kadınlardan fazla olmasını sağladığı düşünülmektedir.	Hipopituarizm görülen kadınlarda kemik mineral yoğunluğunda artış tespit edilmiştir. Ancak bu, testosteronun aromatisasyon ile östrojene dönüşümü ile ilişkili olabilir.
Metabolizma: testosteronun metabolizmanın hızlanmasında ve kas kütlelerinin artmasında etkilidir.	Testosteron bazal metabolizma hızını ve kas kütlelerini artırır.	Hipopituarizm görülen kadınlarda testosteron desteği, yağsız kütle ve kas kütlelerinde artış sağlamıştır.
Eritropoez: testosteron eritrosit üretimini teşvik eder.	Hipogonadik erkeklerde testosteron replasmanı eritrosit kütlelerinde artış sağlamıştır.	Yaşa bağlı olarak düşük testosteron seviyesi izlenen kadınlarda anemi riski daha fazladır.
Östrojen öncülü: testosteron ve androstenedion aromatisasyon olarak östrojenleri meydana getirirler.	Erkeklerde testosteronun periferik aromatisasyonu, kemik ve üreme kanalında östrojen üretimi için önemlidir.	Post-menopozal dönemdeki kadınlarda dolaşımdaki androjenlerin aromatisasyonu östrojenler için önemli bir kaynak olmakla birlikte menopozun bazı etkilerinin azaltılmasında işlevsel olabilir.

Tablo 2.2: Testosteronun vücuttaki etkisinin özeti. Bhasin S vd. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2003 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır [150].

Yağ Harici Kompartmanlara Etkisi
Yağsız doku ve kas kütlesi artışı Kemik kütlesinde artış Kastrasyon uygulanan erkek memelilerde, enükoidal erkeklerde, kadınlarda ve puberte öncesi erkek çocuklarda azot tutulumunun artışı
Kas Histomorfolojisinde Meydana Gelen Değişimler
Hem Tip I hem de Tip II iskelet kası fibrillerinde artış Miyonüklei sayısında artış Satellit hücrelerinde artış
Protein Dinamiklerinde Meydana Gelen Değişimler
Non-oksidatif lösin haybında meydana gelen artış İskelet kas proteini fraksiyonel sentez oranlarında meydana gelen artış Açlık durumunda net protein dengesinin negativitesindeki azalmaya karşın protein dengesinde net bir artış olmaması Arteriovenöz diferansiasyon metodu ile meydana gelen protein degradasyonunda azalma Proteazom aracılı protein degradasyonunda azalma
Yağ Kompartmanlarına Etkisi
Testosteron replasman tedavisi uygulanan hipogonadal erkeklerde toplam vücut yağ kütlesinde azalma Suprafizyolojik dozda testosteron ve diğer androjenlerin verildiği eugonadal erkeklerde toplam vücut yağ kütlesinde azalma Orta yaşlı düşük ya da normal testosteron düzeylerine sahip erkeklerde intraabdominal yağ kütlesinde azalma Lipolizde artış Lipoprotein lipaz aktivitesinin düzenlenmesi Abdominal yağ kompartmanında trigliserit asimilasyonunda azalma Preadipositlerin adipositlere dönüşümünün inhibisyonu

2.8.2. Testosteronun Kemikler Üzerindeki Etkisi

Testosteron, kemikler üzerinde etkisini iki şekilde gösterir: 1. osteoklastik etkiyi inhibe ederek kemik erimesinin önüne geçer ve 2. 5- α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona dönüşerek osteoblastik aktiviteyi artırır [151, 152].

2.8.3. Testosteronun Kas Kütlesi Üzerindeki Etkisi

Testosteron, kas kütlesinin gelişimi ve korunumu için gerekli bir bileşendir. Testosterondaki azalma, kas kütlesi ve buna bağlı olarak gücün azalması ile sonuçlanır. Hipogonadal erkeklere testosteron tedavisi uygulanan bir çalışmada sonuç olarak genel fiziksel performans ve güçte artış tespit edilmiştir [153]. Prostat kanseri için androjen mahrumiyet tedavisi gören erkeklerin kas kütlesinde ve hemogloblin seviyelerinde azalma görülürken aynı zamanda kilo artışı ve yağ kütlesinde artış tespit edilmiştir [154].

2.8.4. Testosteronun Hematopoez Üzerindeki Etkisi

Testosteron kemik iliğinde hematopoiezi uyarır ve buna bağlı olarak hematokrit seviyesinde artış sağlar [155]. 24-78 yaş arası 70 Tip II diyabet hastası erkek ile yapılan bir çalışmada hipogonadal 37 bireyin hematokrit seviyeleri belirgin derecede düşük bulunmuştur. Hastaların %23'ünde anemi tespit edilmiş olmakla birlikte, 15 anemik hastanın 14'ünün serbest testosteron seviyelerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Testosteron, eritropoietini uyardığı için testosteron tedavisi gören erkeklerin hematokrit seviyeleri düzenli olarak ölçülmelidir, çünkü tedavi gören erkeklerin bir kısmında polisitemi tespit edilmiştir [156].

2.8.5. Testosteronun Beyin Üzerindeki Etkisi

Beyinde androjen reseptörleri bulunmaktadır; testosteron beyinde 5- α -redüktaz ve aromataz ile dihidrotestosteron ile estradiole çevrilir. Steroid hormonlar nöronal hücre büyümesini ve sağkalımını destekler [157]. İleri yaştaki erkeklerle yapılan bilişsel çalışmalara göre testosteron seviyeleri daha yüksek olan bireyler uygulanan testlerden daha yüksek skorlar elde etmişlerdir [158]. Alzheimer hastası hipogonadal erkeklerle yapılan oldukça küçük ve kısa süreli, plasebo kontrollü bir çalışmaya göre testosteron uygulanan hastaların bilişsel değerlendirme testlerinde bir artış görülmüştür [159]. Alzheimer hastası kadın ve erkeklerle yapılan bir çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında hastalarda *sex hormone binding globulin* seviyelerinde artış ve serbest androjen indeksinde azalma tespit edilmiştir [160]. 32-87 yaşları arasındaki 574 erkek bireyle yapılan bir çalışmada ise serbest testosteron indeksindeki her 10 ünitelik artışta Alzheimer riskinin %26 azaldığı gösterilmiştir. Tüm bu bulgular, testosteronun Alzheimer'dan korunmada ve tedavisinde işlevsel olabileceğini göstermektedir [161].

2.8.6. Kadınlarda Post-Menopozal Dönemde Testosteronun Etkisi

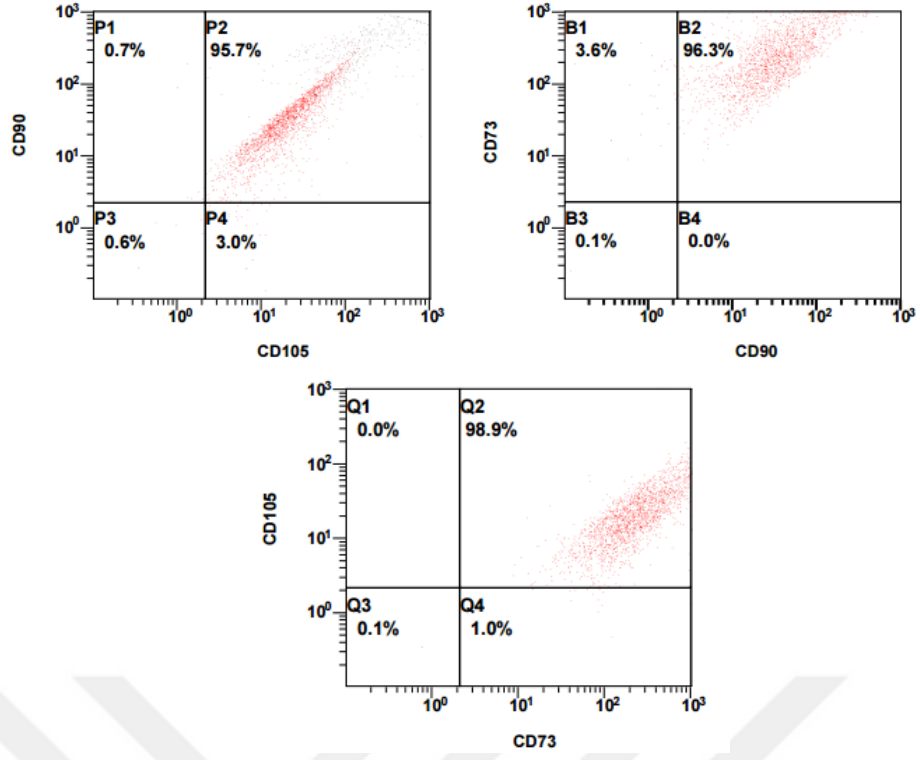
Kadınlarda testosteron üretiminin %50'si adrenal bez tarafından gerçekleştirilir. Yumurtalıklar direkt sekresyon ya da öncül üretimi yolu ile dolaşımdaki testosteronun %50'sinin üretimini üstlenirler. Menopozda yumurtalık fonksiyonlarındaki azalma ile birlikte yalnızca östrojen seviyesinde değil, aynı zamanda testosteron seviyesinde de azalma görülür. Post-menopozal dönemde ya da ooforektomize kadınlara testosteron desteği günümüzde uygulanmaktadır. Bu tedavinin kemik mineral yoğunluğuna, gücün artırılmasına ve duygudurumun iyileştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [162].

3. YÖNTEM

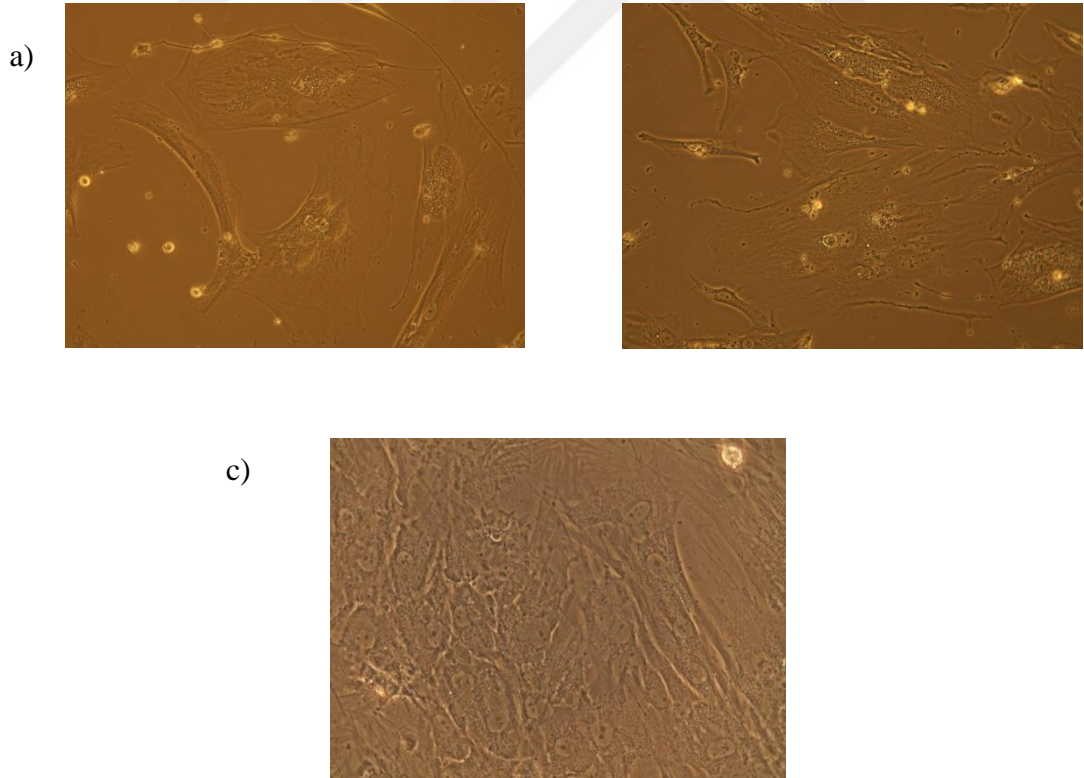
Çalışmamızda günümüze dek farklı hücre tipleri üzerinde yapılan çalışmaların incelenmesi sonucunda testosteronun enjekte edilebilir, 17- β pozisyonunda propiyonat substitüsyonu bulunan yağ bazlı, kısa süreli etki gösteren ester formu olan testosteron propiyonat kullanılmıştır [166]. Üretici çözücü olarak etil alkol ya da aseton kullanılması önermektedir. Testosteron propiyonat etil alkolde 96°C'de çözünmekte, ancak ısı 37°C'ye geldiğinde kristalize olmaktadır. Çözücü olarak aseton kullanıldığında, testosteron propiyonat çözünmekte ve kristalize olmadan 24 saat kullanılabilir. Buna göre TP, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M konsantrasyonlarda olacak şekilde aseton-su karışımı içinde çözüldükten sonra hücre besiyerine eklenmiştir. 24 saat sonunda hücrelerin canlılıkları Annexin V – Propidyum İyodit apoptoz testi; bölünmeleri ise CFSE proliferasyon tayin yöntemi ile ölçülmüştür. Ölçümler Beckman Coulter FC500 akan hücre ölçer ile yapıldıktan sonra sonuçlar CXP analiz programı ile değerlendirilmiştir.

3.1.Hücre Kültürü:

Yetişkin sağlıklı insan kemik iliği mezenkimal hücreleri Gibco Thermo Fisher Scientific'ten alınmıştır. Hücreler besiyerine ekilmeden önce akan hücre ölçer ile yüzey belirteçleri analiz edilmiştir. CD45^{neg}/CD73⁺/CD90⁺/CD105⁺ hücrelerin %90'dan fazla olduğu yapılan analiz sonucu belirlenmiştir. Hücreler dördüncü pasajdadır. MKH kültüründe besiyeri tercihi üzerine yapılmış çalışmaların incelenmesi sonucu kültür boyunca düşük glukozlu DMEM besiyeri tercih edilmiştir [2-5]. Mezenkimal kök hücreler %15 fetal sığır serumu ve %1 penisilin - streptomisin antibiyotik içeren düşük glukozlu DMEM besiyeri içinde 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler ekildikten sonra üç günde bir besiyeri değiştirilmiş ve hücreler, kültür kabı kuyucuklarının yüzeyini kaplayana kadar %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik içeren düşük glukozlu DMEM besiyeri ile kültür devam etmiştir. Hücrelerin büyümesi 37°C derecede %95 hava, %5 CO₂ içeren nemli ortamda gerçekleşmiştir.



Şekil 3.1: Hücrelerin yüzey belirteçlerinin analizi



Şekil 3.2: MKH'lerin invert ışık mikroskobu görüntüleri. a) 7. gün b) 14. gün c) 21.gün

3.2. Testosteron Propiyonatın Hazırlanması

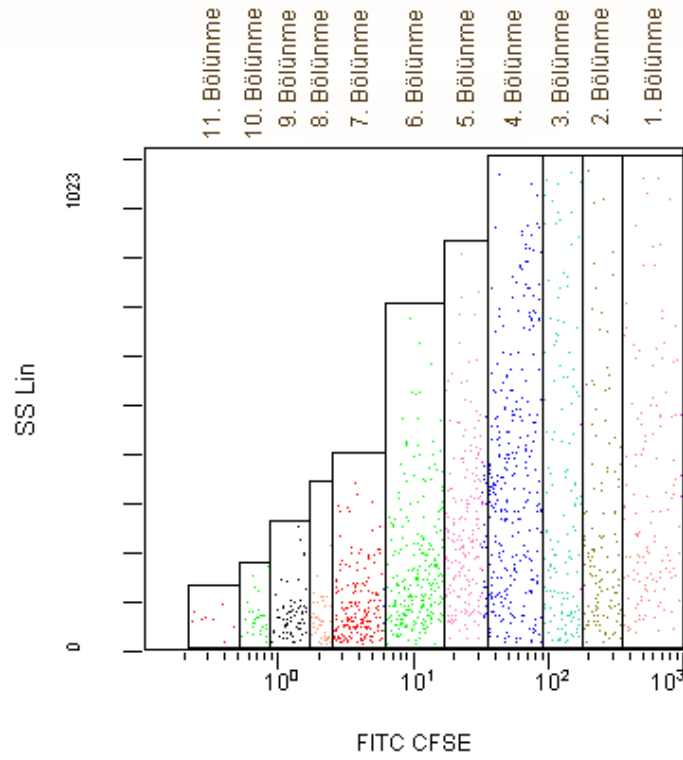
Testosteron propiyonat (T-1875) (Sigma Saint Louis, Missouri 63103 USA), talimatlara uygun olarak 100X konsantrasyonda olacak şekilde 1:3 oranında hazırlanan aseton-su karışımında ısıtılarak çözülmüştür. Testosteron karışımı, hazırlanan besiyeri ile karıştırılarak hücrelerin üzerine eklenmiş ve hücreler, 24 saat süresince 37°C derecede %95 hava, %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe olmuştur. Asetonun besiyerindeki son hacmi %0,003'tür.

3.3. Hücre proliferasyonunun tayini

Hücrelerin 24 saatlik süre sonundaki proliferasyon miktarının belirlenmesi için CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Life Technologies) kullanılmıştır. CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) fluoresans özelliğine sahip bir hücre boyasıdır. Boyanın 488 nm'de ışımaya verir ve meydana gelen sinyal akan hücre ölçerde birinci kanalda görüntülenir. CFSE membrandan geçerek hücrelerin içindeki moleküllere bağlanma özelliğine sahiptir. Hücre metabolizmasına ve canlılığına bir etkisi bulunmamaktadır. Hücre proliferasyonu tayininde bu boyanın kullanımı, hücre bölündükçe hücrenin içinde bulunan CFSE'nin de yeni oluşan iki yavru hücre arasında eşit paylaşımına dayanmaktadır.

Tablo 3.1: CFSE boyaması akış şeması





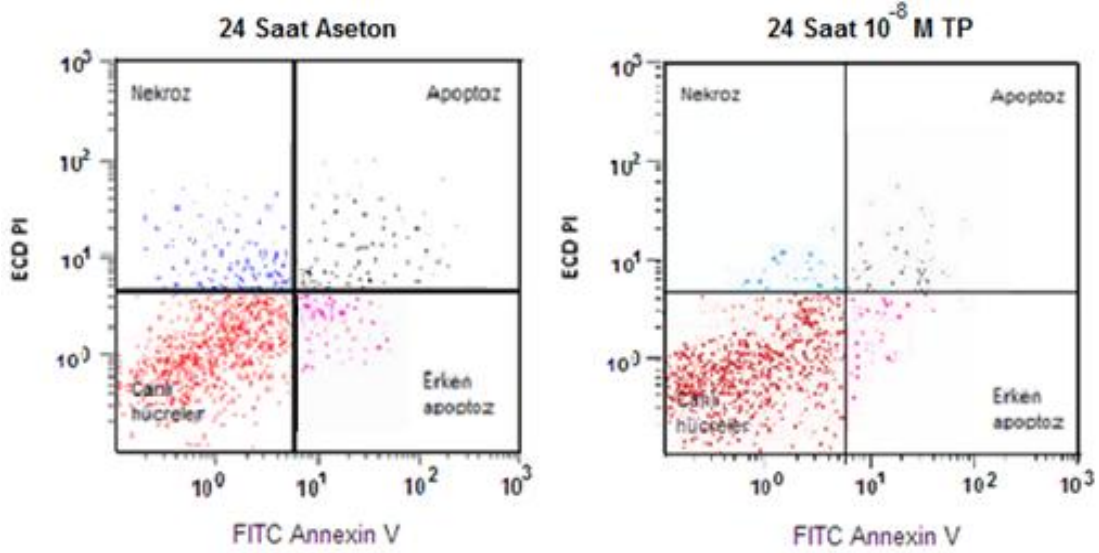
Şekil 3.3: Örnek CFSE akan hücre ölçer görüntüsü

CFSE, kit talimatına uygun şekilde 18 µl DMSO ile karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra, son konsantrasyonu 5 µM olacak şekilde besiyeri ile karıştırılarak hücrelerin üzerine eklenmiş, 20 dakika inkübasyonu takiben uzaklaştırılmıştır. Hücreler Dulbecco's Phosphate Buffer Solution (DPBS) ile yıkayıp belirli oranlarda testosteron propiyonat içeren DMEM besiyerleri hücrelerin üzerine eklenmiştir. 24 saat sonunda besiyeri-testosteron propiyonat karışımı uzaklaştırılmış, hücreler DPBS ile yıkayıp kuyucuklarda Tripsin – EDTA (0,05 M) (Life Technologies) ile kaldırılmış ve akan hücre ölçer ile proliferasyon ölçümü yapılmıştır.

3.4.Hücre Canlılığının ve Apoptozun Tayini

Testosteron propiyonatin hücre canlılığına etkisinin tespitinde Annexin V – Propidyum İyodit boyaması gerçekleştirilmiştir. Annexin V, hücre membranında bulunan fosfatidilserin rezidülerine bağlanan ve akan hücre ölçerlerde birinci kanalda ışığa veren fluoresans bir boyadır. Sağlıklı hücrelerde fosfatidilserin, membranın sitosolik yüzeyinde bulunurken apoptoz sürecinin başlaması ile membranın dış yüzüne transloke olmaya başlar. Apoptozun erken safhalarında plazma membranı, DNA'ya bağlanma özelliğine sahip boyaların hücre içine girişine izin vermemektedir. Bu sebeple yalnızca Annexin V ile boyanan hücreler erken apoptotik hücrelerdir.

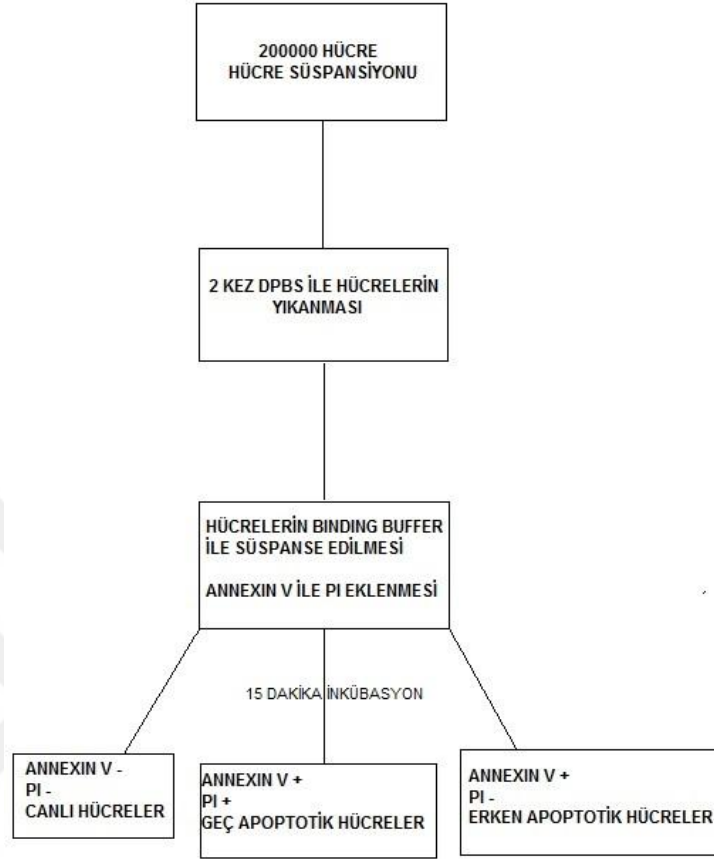
Propidyum İyodit (PI) fluoresans özelliğe sahip bir interkalasyon ajanıdır. Akan hücre ölçerde üçüncü kanalda ışığa verir. DNA'ya bazların arasına yerleşerek bağlanma özelliğine sahiptir. Sağlıklı hücrelerde hücre membranı, hücre içine PI girişini engellemektedir. Apoptozun ilerleyen safhalarında membran bütünlüğü kaybolur, bu sayede PI hücre içine girerek DNA'da bulunan baz çiftleri arasına interkale olur. Annexin V ve PI birlikte boyanan hücreler geç apoptotik hücrelerdir.



Şekil 3.4: Örnek annexin V – PI akan hücre ölçer görüntüleri

Hücrelerin canlılık tayini ApopNexin Annexin V FITC Apoptosis Kit (Merck Millipore) ile yapılmıştır. Kültür kaplarından alınan hücreler kit talimatlarına uygun şekilde 3 µl Annexin ve 2 µl PI ile boyandıktan sonra akan hücre ölçerde canlılık ölçümleri yapılmıştır.

Tablo 3.2: Annexin V-PI boyaması akış şeması



İstatistiksel İncelemeler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirilmiş ve verilerin normal dağılıma uygunluk göstermediği saptanmıştır. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test, farklılığa neden olan grubun tespitinde ise Mann Whitney U test kullanıldı. Parametrelerin grup içi Wilcoxon Signed Ranks test kullanıldı. Uyum değerlendirmesi için Intraclass Correlation Coefficient kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. CFSE Proliferasyon Ölçümleri

Tablo 4.1: Grupların 0.saat ve 24.saat nesil sayılarının değerlendirilmesi

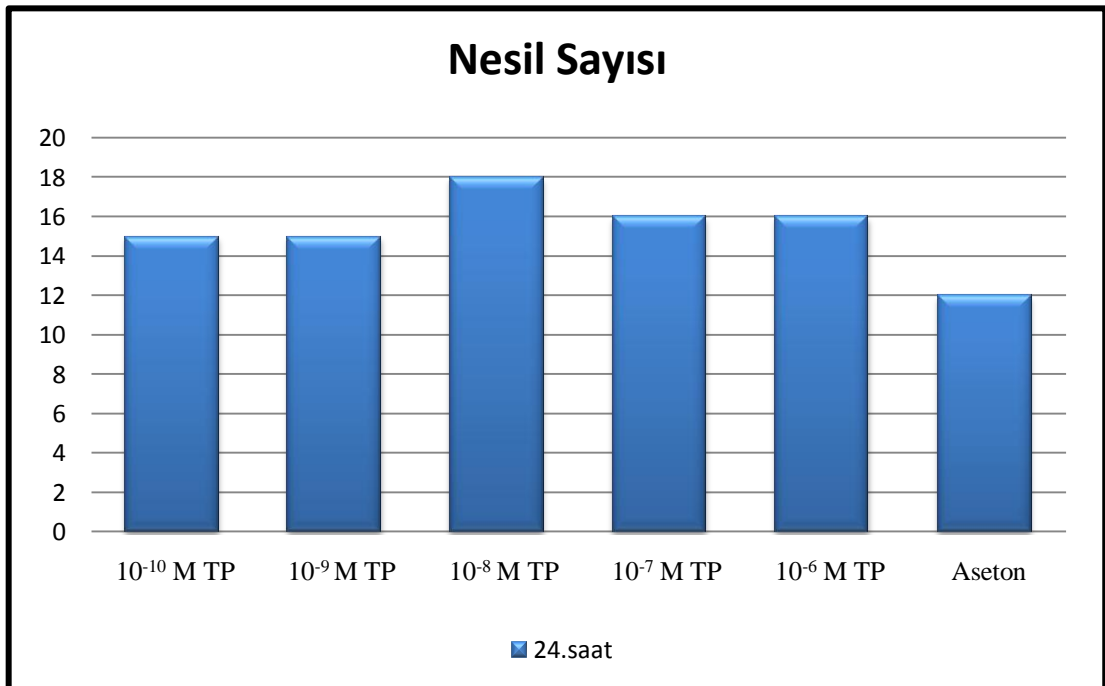
Nesil Sayısı	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	Aseton	¹ p
	TP	TP	TP	TP	TP	TP	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
0.saat	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
24.saat	15±0 (15)	15±0 (15)	18±0 (18)	16±0 (16)	16±0 (16)	12±0 (12)	0,004**
Fark	12±0 (12)	12±0 (12)	15±0 (15)	13±0 (13)	13±0 (13)	9±0 (9)	0,004**
² p	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	

¹Kruskall Wallis Test

²Wilcoxon Signed Ranks Test

**p<0.01

Tablo 4.2: Nesil sayısının doza bağlı değişimi



4.1.1. 24. Saat CFSE Karşılaştırmaları

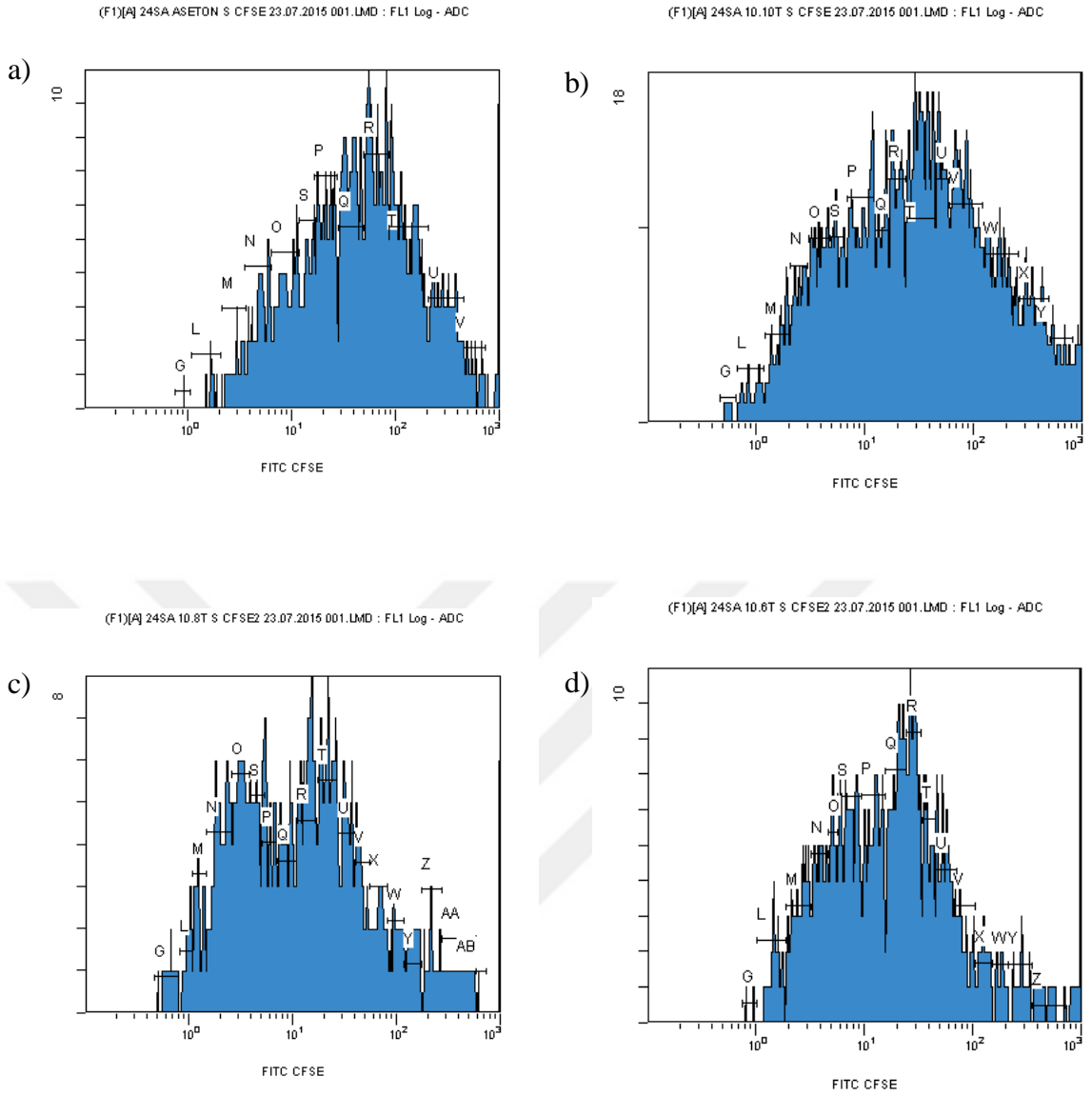
Gruplar arasında 24.saatteki nesil sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- 10^{-8} M TP grubunun 24.saatteki nesil sayıları, diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
- 10^{-7} M TP grubunun 24.saatteki nesil sayıları, 10^{-10} M TP ($p:0.025$), 10^{-9} M TP ($p:0.025$) ve Aseton ($p:0.025$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
- 10^{-6} M TP grubunun 24.saatteki nesil sayıları, 10^{-10} M TP ($p:0.025$), 10^{-9} M TP ($p:0.025$) ve Aseton ($p:0.025$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
- Aseton grubunun 24.saatteki nesil sayıları, 10^{-10} M TP ($p:0.025$), 10^{-9} M TP ($p:0.025$) gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$).
- 10^{-10} M TP ve 10^{-9} M TP grupları ile 10^{-6} M TP ve 10^{-7} M TP gruplarının arasında, 24. saatteki nesil sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

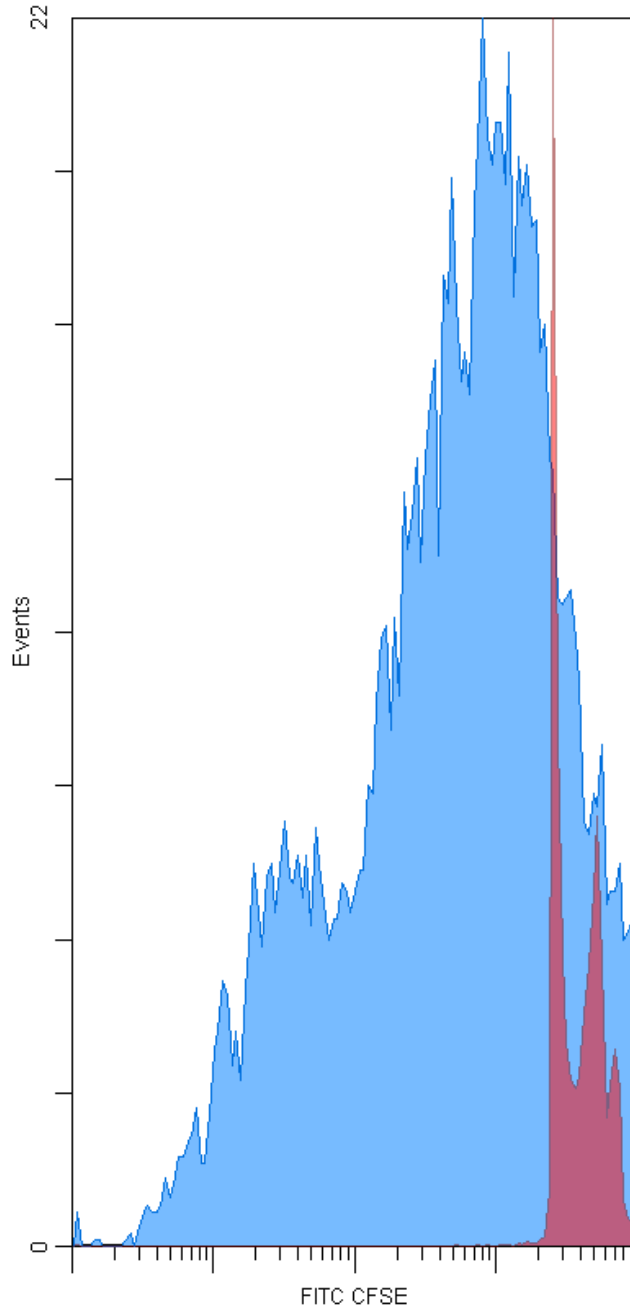
4.1.2. 0. ve 24. Saat Proliferasyon Karşılaştırmaları

Gruplar arasında 0. saate göre 24. saatte nesil sayılarında görülen artış miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- 10^{-8} M TP grubunun 0. saate göre 24. saatte nesil sayılarında görülen artışlar, diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
- 10^{-7} M TP ve 10^{-6} M TP gruplarının 0. saate göre 24. saatte nesil sayılarında görülen artışlar, 10^{-10} M TP ($p:0.025$), 10^{-9} M TP ($p:0.025$) ve aseton ($p:0.025$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
- Aseton grubunun 0. saate göre 24. saatte nesil sayılarında görülen artışlar, 10^{-10} M TP ($p:0.025$), 10^{-9} M TP ($p:0.025$) gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$).
- 10^{-10} M TP ve 10^{-9} M TP grupları ile 10^{-6} M TP ve 10^{-7} M TP gruplarının arasında 0.saate göre 24. saatte nesil sayılarında görülen artış miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

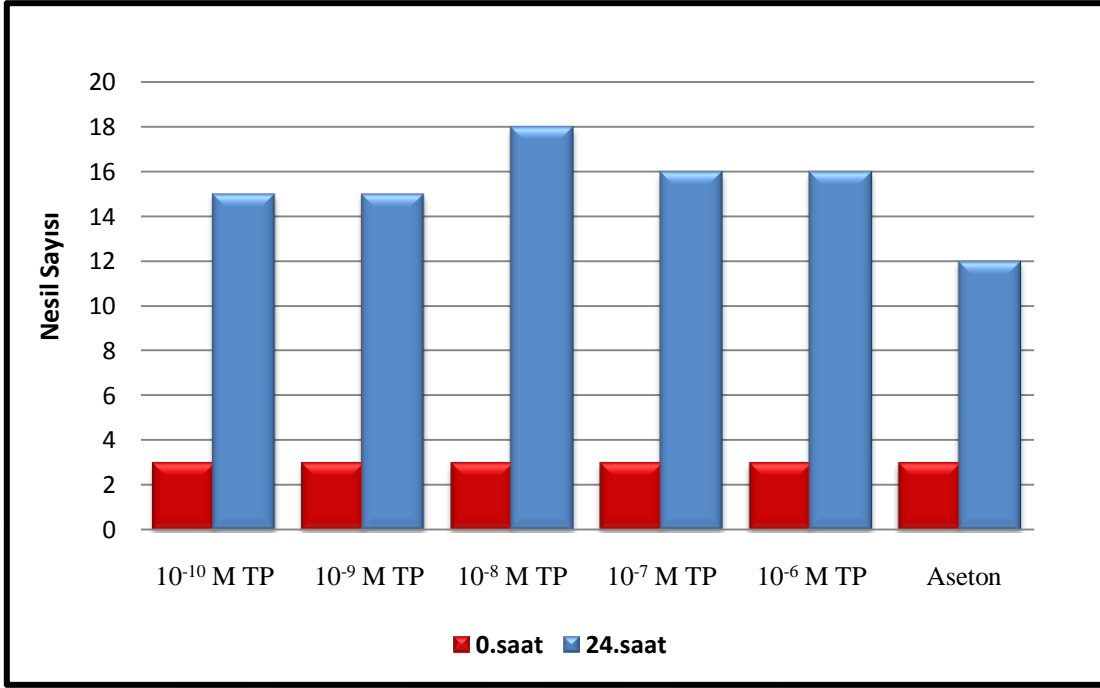


Şekil 4.1: Aseton (a), 10^{-10} M TP (b), 10^{-8} M TP (c) ve 10^{-6} M TP (d) uygulanan hücrelerin CFSE akan hücre ölçer histogram grafikleri.



Şekil 4.2: 0. ve 24. saatlerde CFSE histogramlarının kıyaslanması. Kırmızı renkli grafik 0. saatte hücrelerin bölünmesini göstermektedir. Mavi renkli grafik 24 saat sonra 10^8 M TP grubunda tespit edilen nesil sayısını göstermektedir.

Tablo 4.3: Hücre nesil sayısının doza bağlı değişimi



4.1.3. Ölçümler Arası Karşılaştırma

Tablo 4.4: 24.saatte CFSE ölçümlerinin uyum değerlendirilmesi

	ICC	%95 CI		p
		Lower	Upper	
10 ⁻¹⁰ M TP	0,986	0,959	0,995	0,001**
10 ⁻⁹ M TP	0,976	0,931	0,992	0,001**
10 ⁻⁸ M TP	0,997	0,993	0,999	0,001**
10 ⁻⁷ M TP	0,953	0,870	0,983	0,001**
10 ⁻⁶ MTP	0,999	0,998	1,000	0,001**
Aseton	0,987	0,956	0,996	0,001**

Intraclass Correlation Coefficient

***p<0.01*

- 10⁻¹⁰ M TP grubunda 1. ve 2. CFSE ölçümleri arasında pozitif yönde, %98.6 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).
- 10⁻⁹ M TP grubunda 1. ve 2. CFSE ölçümleri arasında pozitif yönde, %97.6 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).
- 10⁻⁸ M TP grubunda 1. ve 2. CFSE ölçümleri arasında pozitif yönde, %99.7 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).

- 10^{-7} M TP grubunda 1. ve 2. CFSE ölçümleri arasında pozitif yönde, %95.3 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).
- 10^{-6} M TP grubunda 1. ve 2. CFSE ölçümleri arasında pozitif yönde, %99.9 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).
- Aseton grubunda 1. ve 2. CFSE ölçümleri arasında pozitif yönde, %98.7 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).

4.2. Annexin V – Propidyum İyodit Apoptoz Analizi

Tablo 4.5: Grupların 0. ve 24.saat hücre yoğunluklarının değerlendirilmesi

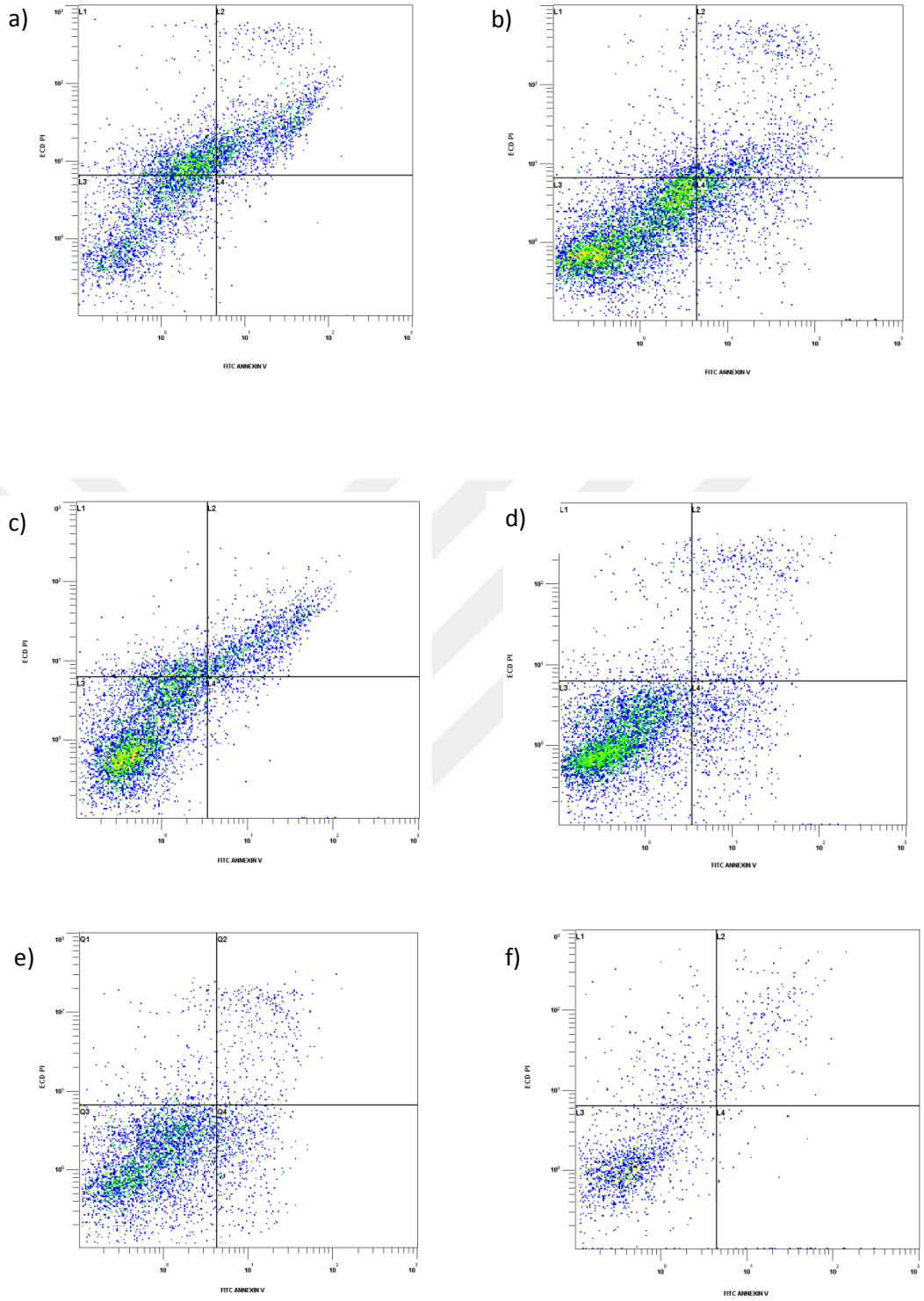
		10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	Aseton	¹ p
		TP	TP	TP	TP	TP	TP	
		Ort±SS (mean)	Ort±SS (mean)	Ort±SS (mean)	Ort±SS (mean)	Ort±SS (mean)	Ort±SS (mean)	
Nekroz	0.saat	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	1,000
	24.saat	4,57±0,32 (4,57)	5,56±0,89 (5,56)	6,53±0,83 (6,53)	13,33±4,0 8 (13,33)	7,51±1,49 (7,51)	15,23±0,4 5 (15,23)	0,001* *
	Fark	-	-	-	-	-	-	0,001* *
		9,84±0,13 (-9,84)	8,86±1,34 (-8,86)	7,88±1,28 (-7,88)	1,08±4,52 (-1,08)	-6,9±1,04 (-6,9)	0,82±0 (0,82)	0,001* *
	² p	0,024*	0,024*	0,024*	0,335	0,024*	0,024*	
Apoptoz	0.saat	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	14,41±0,4 5 (14,41)	1,000
	24.saat	8,48±1,56 (8,48)	6,55±2,66 (6,55)	3,01±0,56 (3,01)	2,09±1,98 (2,09)	15,37±0,6 5 (15,37)	4,55±0,13 (4,55)	0,001* *
	Fark	-	-	-	-	-	-	0,001* *
		5,94±1,11 (-5,94)	7,86±2,21 (-7,86)	11,41±1,0 1 (-11,41)	12,33±1,5 3 (-12,33)	0,96±1,1 (0,96)	9,86±0,58 (-9,86)	0,001* *
	² p	0,024*	0,024*	0,024*	0,024*	0,335	0,024*	
Canlı hücre	0.saat	80,5±0,36 (80,5)	80,5±0,36 (80,5)	80,5±0,36 (80,5)	80,5±0,36 (80,5)	80,5±0,36 (80,5)	80,5±0,36 (80,5)	1,000
	24.saat	82,37±0,4 7 (82,37)	82,9±0,15 (82,9)	85,12±0,4 5 (85,12)	77,6±1,94 (77,6)	68,8±0,77 (68,8)	73,32±0,4 5 (73,32)	0,001* *
	Fark	1,87±0,11 (1,87)	2,4±0,5 (2,4)	4,62±0,1 (4,62)	-2,9±2,3 (-2,9)	11,7±1,13 (-11,7)	-7,18±0,1 (-7,18)	0,001* *
	² p	0,024*	0,024*	0,024*	0,024*	0,024*	0,024*	
		4,43±1,09 (4,43)	4,43±1,09 (4,43)	4,43±1,09 (4,43)	4,43±1,09 (4,43)	4,43±1,09 (4,43)	4,43±1,09 (4,43)	1,000
Erken Apoptoz	24.saat	4,6±2,35 (4,6)	5±1,62 (5)	5,35±0,94 (5,35)	6,99±4,04 (6,99)	8,33±0,07 (8,33)	6,91±0,77 (6,91)	0,032*
	Fark	0,17±1,26 (0,17)	0,58±0,53 (0,58)	0,93±2,03 (0,93)	2,57±5,13 (2,57)	3,91±1,02 (3,91)	2,48±0,32 (2,48)	0,019*
	² p	0,335	0,024*	0,335	0,335	0,024*	0,024*	

¹Kruskall Wallis Test

²Wilcoxon Signed Ranks Test

*p<0.05

**p<0.01



Şekil 4.3: Annexin V – PI analizi akan hücre ölçer yoğunluk kadranı görüntüleri. a) 24. saat aseton b) 24. saat 10^{-10} M TP c) 24. saat 10^{-9} M TP d) 24. saat 10^{-8} M TP e) 24. saat 10^{-7} M TP f) 24. saat 10^{-6} M TP

4.2.1.Apoptoz Yoğunlukları

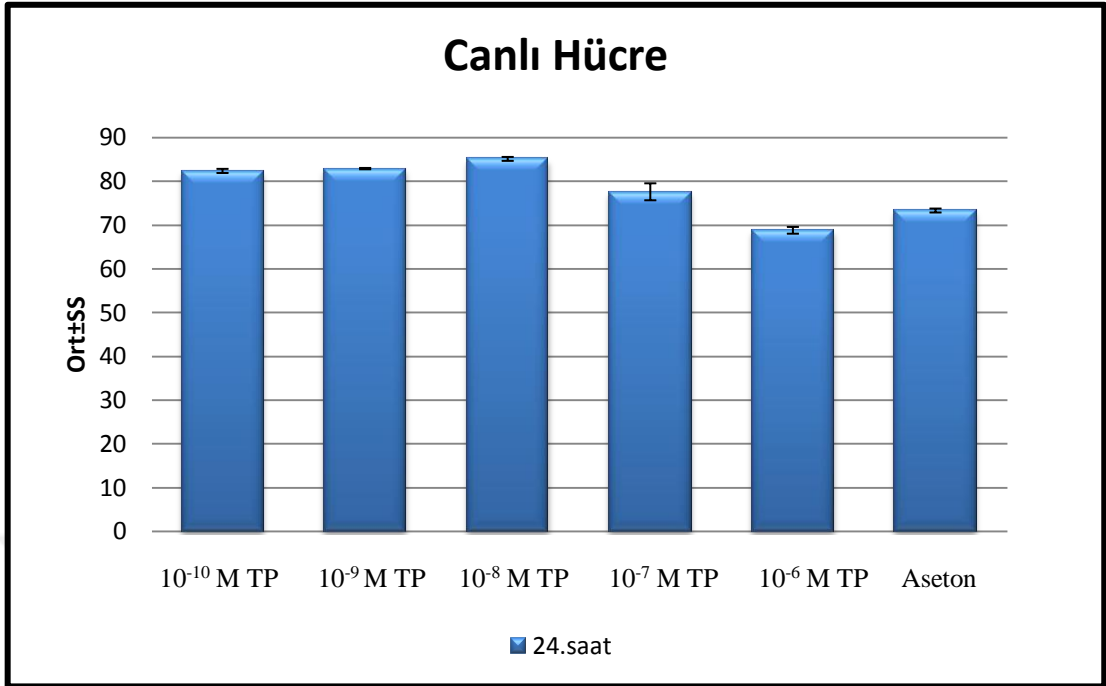
Gruplar arasında 24.saatteki apoptoz yoğunlukları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- 10^{-6} M TP grubunun 24. saatteki apoptoz yoğunlukları, diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).
- 10^{-10} M TP grubunun 24. saatteki apoptoz yoğunlukları, 10^{-8} M TP (p:0.003), 10^{-7} M TP (p:0.003) ve aseton (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).
- 10^{-9} M TP grubunun 24. saatteki apoptoz yoğunlukları, 10^{-8} M T (p:0.003) ve 10^{-7} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).
- Aseton grubunun 24. saatteki apoptoz yoğunlukları, 10^{-8} M TP (p:0.003) ve 10^{-7} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).
- Diğer gruplar arasında 24.saatteki apoptoz yoğunlukları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Gruplar arasında 0.saate göre 24.saatteki apoptoz yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- Tüm grupların 0.saate göre 24.saatteki apoptoz yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0.01).
- 10^{-6} M TP grubunda apoptoz miktarında artış gözlenirken, diğer gruplarda düşüş gözlenmiştir.
- 10^{-8} M TP grubunun 0.saate göre 24.saatteki apoptoz yoğunluklarında görülen düşüş, 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003) ve aseton (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).
- Aseton grubunun 0.saate göre 24.saatteki apoptoz yoğunluklarında görülen düşüş, 10^{-10} M TP grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p:0.003; p<0.01).
- Diğer gruplar arasında 0.saate göre 24.saatteki apoptoz yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Tablo 4.6: Canlılığın doza bağlı değişimi



4.2.2. Canlı Hücre Yoğunlukları

Gruplar arasında 24. saatteki canlı hücre yoğunlukları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.001$; $p<0.01$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- 10⁻⁸ M TP grubunun 24. saatteki canlı hücre yoğunlukları; diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).
- 10⁻⁹ M TP grubunun 24. saatteki canlı hücre yoğunlukları, 10⁻⁷ M TP ($p:0.003$), 10⁻⁶ M T ($p:0.003$) ve aseton ($p:0.003$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).
- 10⁻¹⁰ M TP grubunun 24. saatteki canlı hücre yoğunlukları, 10⁻⁷ M TP ($p:0.003$), 10⁻⁶ M T ($p:0.003$) ve aseton ($p:0.003$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).
- 10⁻⁷ M TP grubunun 24. saatteki canlı hücre yoğunlukları, 10⁻⁶ M TP ($p:0.003$) ve aseton ($p:0.003$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$).
- 10⁻⁶ M T grubunun 24. saatteki canlı hücre yoğunlukları, aseton grubundan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.003$; $p<0.01$).
- 10⁻¹⁰ M TP ve 10⁻⁹ M TP gruplarının 24. saatteki canlı hücre yoğunlukları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Gruplar arasında 0. saate göre 24. saatteki canlı hücre yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır

(p:0.001; p<0.01). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- Aseton ile 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003), 10^{-8} M TP (p:0.003), 10^{-7} M TP (p:0.003) ve 10^{-6} M TP (p:0.003) grupları arasında 0.saate göre 24.saatteki canlı hücre yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0.01).

- 10^{-6} M TP ile 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003), 10^{-8} M T (p:0.003) ve 10^{-7} M TP (p:0.003) grupları arasında 0.saate göre 24.saatteki canlı hücre yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0.01).

- 10^{-7} M TP ile 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003) ve 10^{-8} M TP (p:0.003) (p:0.003) grupları arasında 0.saate göre 24.saatteki canlı hücre yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0.01).

- 10^{-8} M TP grubunun 0.saate göre 24.saatteki canlı hücre yoğunluklarında görülen artış, 10^{-10} M TP (p:0.003) ve 10^{-9} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).

- 10^{-9} M TP grubunun 0.saate göre 24.saatteki canlı hücre yoğunluklarında görülen artış, 10^{-10} M TP grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p:0.003; p<0.01).

- 10^{-10} M TP ve 10^{-9} M TP gruplarının 0.saate göre 24.saatteki canlı hücre yoğunluklarında görülen artış miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

4.2.3. Nekroz Yoğunlukları

Gruplar arasında 24.saatteki nekroz yoğunlukları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- Aseton grubunun 24. saatteki nekroz yoğunluğu, 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003), 10^{-8} M TP (p:0.003) ve 10^{-6} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).

- 10^{-7} M TP grubunun 24.saatteki nekroz yoğunluğu, 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003), 10^{-8} M TP (p:0.003) ve 10^{-6} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).

- 10^{-10} M TP grubunun 24.saatteki nekroz yoğunluğu, 10^{-8} M TP (p:0.003) ve 10^{-6} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p<0.01).

- Diğer gruplar arasında 24. saatteki nekroz yoğunlukları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Gruplar arasında 0.saate göre 24.saatteki nekroz yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- Aseton grubu ile 10^{-10} M TP (p:0.002), 10^{-9} M TP (p:0.002), 10^{-8} M TP (p:0.002) ve 10^{-6} M TP (p:0.002) grupları arasında 0.saate göre 24.saatteki nekroz yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0.01).

- Aseton grubunda artış gözlenirken, 10^{-10} M TP, 10^{-9} M TP, 10^{-8} M TP ve 10^{-6} M TP gruplarında düşüş gözlenmiştir. 10^{-7} M TP grubunun 0. saate göre 24. saatteki nekroz yoğunluğunda görülen düşüş, 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003), 10^{-8} M TP (p:0.003) ve 10^{-6} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p<0.01).

- 10^{-10} M TP grubunun 0. saate göre 24. saatteki nekroz yoğunluğunda görülen düşüş, 10^{-8} M TP (p:0.003) ve 10^{-6} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).

- Diğer gruplar arasında 0. saate göre 24. saatteki nekroz yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

4.2.4. Erken Apoptoz Yoğunlukları

Gruplar arasında 24.saatteki erken apoptoz yoğunlukları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.032; p<0.05). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- 10^{-6} M TP grubunun 24.saatteki erken apoptoz yoğunlukları, 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003), 10^{-8} M TP (p:0.003) ve aseton (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).

- Diğer gruplar arasında 24.saatteki erken apoptoz yoğunlukları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Gruplar arasında 0.saate göre 24.saatteki erken apoptoz yoğunluklarında görülen değişim miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.019; p<0.05). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

- 10^{-6} M TP grubunun 0.saate göre 24.saatteki erken apoptoz yoğunluklarında görülen artış, 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003), 10^{-8} M T (p:0.003) ve aseton (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01).

- Aseton grubunun 0.saate göre 24.saatteki erken apoptoz yoğunluklarında görülen artış, 10^{-10} M TP (p:0.003), 10^{-9} M TP (p:0.003) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.01). Diğer gruplar arasında 0.saate göre 24.saatteki erken apoptoz yoğunluklarında görülen artış miktarları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

4.2.5. 0. ve 24. Saat Canlılık ve Apoptoz Karşılaştırmaları

- 10^{-10} M TP grubunda; 0.saate göre 24.saatteki nekroz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Apoptoz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Canlı hücre yoğunluğunda görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). 0.saat ve 24.saatteki erken apoptoz yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

- 10^{-9} M TP grubunda; 0.saate göre 24.saatteki nekroz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Apoptoz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Canlı hücre yoğunluğunda görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Erken apoptoz yoğunluğunda görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05).

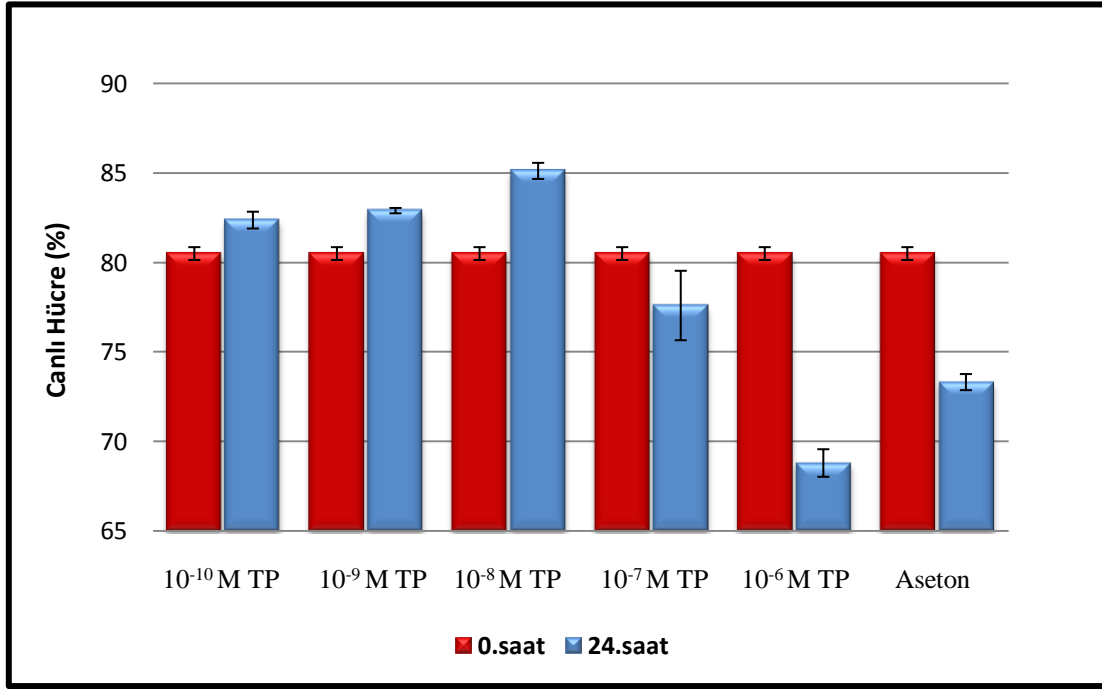
- 10^{-8} M TP grubunda; 0.saate göre 24.saatteki nekroz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Apoptoz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Canlı hücre yoğunluğunda görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). 0.saat ve 24.saatteki erken apoptoz yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

- 10^{-7} M TP grubunda; 0.saate göre 24.saatteki nekroz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Apoptoz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Canlı hücre yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Erken apoptoz yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

- 10^{-6} M TP grubunda; 0.saate göre 24.saatteki nekroz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Apoptoz yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05). Canlı hücre yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Erken apoptoz yoğunluğunda görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05).

- Aseton grubunda; 0.saate göre 24.saatteki nekroz yoğunluğunda görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Apoptoz yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Canlı hücre yoğunluğunda görülen düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05). Erken apoptoz yoğunluğunda görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.024; p<0.05).

Tablo 4.7: 0. ve 24. saatlerde canlılığın değişimi



Tablo 4.8: 24. saatte Annexin V - PI ölçümlerinin uyum değerlendirmesi

	ICC	%95 CI		p
		Lower	Upper	
10-10 M TP	0,989	0,841	0,999	0,001**
10-9 M TP	0,948	0,415	0,997	0,007**
10-8 M TP	0,993	0,900	1,000	0,001**
10-7M TP	0,908	-0,243	0,986	0,009**
10-6 M TP	0,944	0,381	0,996	0,008**
Aseton	0,926	0,253	0,995	0,006**

Intraclass Correlation Coefficient

***p<0.01*

4.2.6. Ölçümler Arası Karşılaştırma

- 10^{-10} M TP grubunda 1. ve 2. annexin V - PI ölçümleri arasında pozitif yönde, %98.9 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).
- 10^{-9} M TP grubunda 1. ve 2. annexin V- PI ölçümleri arasında pozitif yönde, %94.8 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.007; p<0.01).
- 10^{-8} M TP grubunda 1. ve 2. annexin V – PI ölçümleri arasında pozitif yönde, %99.3 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).
- 10^{-7} M TP grubunda 1. ve 2. annexin V – PI ölçümleri arasında pozitif yönde, %90.8 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.009; p<0.01).
- 10^{-6} M TP grubunda 1. ve 2. annexin V – PI ölçümleri arasında pozitif yönde, %94.4 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.008; p<0.01).
- Aseton grubunda 1. ve 2. annexin V - PI ölçümleri arasında pozitif yönde, %92.6 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01).

4.3.Sonuç

0. saate göre 24. saatte tüm grupların bölünme sayılarında görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır. 24. saatte 10^{-8} M TP grubunun bölünme sayısında meydana gelen artış, diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir.

24. saatte 10^{-8} M TP grubunun canlı hücre yoğunluğunun, diğer tüm gruplardan anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. 10^{-6} M TP grubunda ise canlı hücre yoğunluğunda anlamlı derecede düşüş tespit edilmiştir. 10^{-9} ve 10^{-10} M TP gruplarının canlı hücre yoğunlukları arasında belirgin bir fark tespit edilmemiştir, ancak her iki grubun canlı hücre yoğunlukları; 10^{-6} M TP, 10^{-7} M TP ve aseton gruplarından anlamlı derecede yüksektir.

10^{-6} M TP grubundaki apoptotik hücre yoğunluğu, diğer tüm gruplardan anlamlı derecede yüksektir. 10^{-6} M TP grubu hariç, diğer tüm gruplarda apoptotik hücre yoğunluklarında azalma tespit edilmiştir. Apoptotik hücre yoğunluğunda en fazla azalma tespit edilen grup, 10^{-8} M TP grubudur.

24 saat sonunda nekrotik hücre yoğunluğunun en fazla olduğu grubun, aseton uygulanan grup olduğu belirlenmiştir. Aseton grubu hariç tüm gruplarda nekrotik hücre yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir, ancak 10^{-7} M TP grubunda nekrotik hücre yoğunluğunda görülen düşüş, diğer gruplardan belirgin derecede daha azdır.

5.TARTIŞMA

Verzola vd. tarafından 2004 yılında yapılan, androjenlerin apoptotik hücre hasarına etkisinin ve bu etkinin mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada; insan proksimal tübül hücre hattı olan HK-2 hücreleri üzerinde 0,1-1 nmol testosteronun apoptoza ve apoptoz ile ilişkili proteinlerin üretimine etkisi incelenmiştir. Çalışmalar primer proksimal tübüler epitel hücre kültürü çalışmaları ile devam etmiştir. Hem annexin V – propidyum iyodit ile yapılan analiz, hem de TUNEL analizi göstermiştir ki 1 ile 10 nmol/L konsantrasyonda uygulanan testosteron, hücrelerde apoptozu artırmaktadır [163].

2006 yılında yapılan, insan dermal papilla hücreleri üzerinde testosteron ile 5-dihidrotestosteronun apoptotik etkisinin incelendiği bir başka çalışmada 5 sağlıklı bireyden alınan oksipital deri fragmentleri hücre kültürü ortamında çoğaltıldıktan sonra hücrelere 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M 5α -DHT ve testosteron uygulanmıştır. Bu hormonların hücre bölünmesine etkilerinin izlenmesi için hücreler 3-6 gün süresince kültür ortamında testosteron ve 5α -DHT ile inkübe edilmiştir. Apoptozun belirlenmesinde hücrelerin 5α -DHT ve testosteron ile 4, 24 ve 48 saat süresinde inkübasyonunu takiben ELISA yöntemi uygulanmıştır. Dermal papilla hücreleri üzerinde testosteron ile 5α -DHT'nin sitotoksik etkileri, 24 ve 48. saatlerde uygulanan LDH analizi ile tespit edilmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre 5α -DHT ile üç gün inkübasyonun hücre proliferasyonunda 10^{-7} M konsantrasyon hariç artış yaratmadığı, ancak bu süre sonunda 10^{-5} M testosteron ile 5α -DHT'nin hücre büyümesini baskıladığı tespit edilmiştir. Hücrelerin 6 gün süresince hem 10^{-5} M 5α -DHT hem de 10^{-5} M testosteron ile inkübasyonunun proliferasyonda belirgin azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Yüksek konsantrasyonda uygulanan 5α -DHT'nin apoptotik etkileri 48 saat sonrasında görülmeye başlanmıştır, sadece bir bireyden alınan örneklerle yapılan kültürde 24 saat sonunda apoptotik etki tespit edilmiştir. 4, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda 10^{-7} M konsantrasyon 5α -DHT uygulanan hücrelerde apoptotik değişimler görülmemiştir. Aynı sürelerde yapılan ölçümlere göre 5α -DHT hücrelerde anlamlı derecede nekroza sebep olmamaktadır. 48 saat süren inkübasyon sonunda 10^{-5} M testosteron, hücrelerde belirgin miktarda apoptoza sebep olurken az miktarda nekroz tespit edilmiştir. 4, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda 10^{-7} ve 10^{-6} M testosteronun LDH artışına sebep olmadığı görülmüştür [164].

Testosteronun agresif fibromatoz üzerindeki proliferasyon düzenleyici etkisinin belirlenmesi amacı ile yapılan bir diğer çalışmada ise, altı hastadan alınan tümörler ile hücre kültürü oluşturulduktan sonra besiyerine 0-100 µg/mL konsantrasyonlarda dihidrotestosteron eklenmiştir. 24 saat sonunda yapılan analizler sonucunda, eklenen testosteron dozundaki artış ile proliferasyonda ve canlı hücre sayısında artış görülürken ölü hücreler ile apoptoz miktarında artış tespit edilmemiştir [165].

Bir insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y ile 2006 yılında yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyonda uygulanan (100 nM) testosteron canlılığı belirgin derecede etkilemezken, 24 saat sonunda 1 µM testosteronun canlılıkta azalmaya sebep olduğu, canlılıktaki düşüşün 10 µM testosteron uygulamasında daha da fazla olduğu görülmüştür. Çalışmanın devamında apoptoz tespiti için hücreler annexin V ile

işaretlenmiştir. 6 saat sonunda 100 nM testosteron ile inkübe edilen hücrelerde annexin V-pozitif hücreler sayıca az ilen testosteron dozundaki artış ile annexin V-pozitif hücreler de artış göstermiştir. Agaroz jel üzerinde yapılan DNA fragmentasyon analizi göstermiştir ki, 6 saat içinde 1 ve 10 μ M testosteron, nöroblastoma hücrelerinde DNA hasarını artırmakta iken aynı sürede 100 nM testosteron DNA hasarına sebep olmamaktadır [166].

Sıçanların mezenterik yatak bölgesinden alınan vasküler düz kas hücreleri ile oluşturulan bir primer hücre kültürünü çalışmasında ise, testosteronun mitokondriyal reaktif oksijen türevlerinin üretimlerini artırarak ekstrinsik apoptotik yolağı indüklediğinin tespiti hedeflenmiştir. Hücreler 2-12 saat süresince testosteron ile uyarılmıştır. Reaktif oksijen türevleri lucigenin ve dichlorodihydrofluorescein ile ölçülmüştür. Testosteron uygulamasının androjen reseptör aktivasyonuna, reaktif oksijen türevlerine ve mitokondriye etkisinin belirlenmesi amacı ile uygulanan tüm aşamalarda belirli inhibitörler de kullanılarak gözlenen etkiler karşılaştırılmıştır. 2 saat inkübasyon sonucunda 10^{-7} M testosteronun düz kas hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu androjen reseptörlerine bağlanarak ve mitokondri üzerinde etki göstererek artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca 10^{-7} M testosteron ile 6 saat süresince inkübasyonun apoptotik etkisi annexin V-calcein ile ölçülmüş, inkübasyon sonunda testosteronun canlılığı azalttığı görülmüştür [167].

Sıçan iskelet kası miyoblast hücre hattı olan L6 üzerinde testosteronun hücre proliferasyonuna etkisinin gösterilmesi amaçlanan bir çalışmada 10^{-11} ile 10^{-5} arasında değişen dozlarda testosteron, hücrelere uygulanmış ve 6 ile 120 saat arasında değişen sürelerde hücre bölünmeleri ölçülmüştür. İmmünohistokimya sonuçları göstermiştir ki 24 saat sonunda kontrol grubuna oranda 10^{-8} M testosteron uygulanan hücrelerin proliferasyonunda belirgin derecede artış izlenmektedir. 10^{-11} M testosteronun bölünme üzerinde belirgin bir etkisi olmazken 10^{-10} , 10^{-9} ve 10^{-8} M testosteron doz bağımlı olarak bölünmeyi artırmaktadır. Bölünme artışı en fazla 10^{-8} M testosteron uygulanan hücre grubunda görülmekle birlikte doz arttıkça proliferatif etki azalmaktadır. Ancak yine de kontrol grubuna kıyasla belirgin derecede artış görülmesi söz konusudur. Ayrıca testosteronun proliferatif etkisinin zamana bağlı değişiminin araştırılması amacı ile 6, 12, 24 ve 48 saat sonunda 10^{-8} M testosteron eklenen hücrelerin bölünmeleri karşılaştırılmış, testosteronun etkisinin 24 saatte en yüksek olduğu tespit edilmiştir [168].

2013 yılında yapılan bir çalışmada testosteronun insan visceral preadipositlerinin bölünmelerine ve hücre döngüsü genlerinin ekspresyonlarına etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada preadiposit kültürüne 100 nM testosteron ve kontrol olarak etanol uygulanmıştır. 3 günlük inkübasyon sonucunda testosteronun hücre proliferasyonunu artırdığı tespit edilmiştir [169].

Bizim çalışmamızda, testosteronun normal sağlıklı kemik iliği hücrelerinden elde edilen mezenkimal kök hücreler (StemPro® BM Mesenchymal Stem Cells) üzerine 10^{-8} M TP kullanıldığında proliferasyonu artırdığı, ancak doz artışı devam ettikçe proliferasyonun bir miktar azaldığı saptanmıştır. 0. saatte hücrelerde üç nesil tespit edilirken, 24 saat sonunda 10^{-8} M TP uygulanan hücrelerde 18 nesil tespit edilmiştir. Bu sayı 10^{-7} ve 10^{-6} M için 16, 10^{-10} ve 10^{-9} M için 15 nesildir.

24 saat sonunda TP; 10^{-10} , 10^{-9} ve 10^{-8} M konsantrasyonlarda canlılığı artırmaktadır ve bu artış en fazla 10^{-8} M konsantrasyonda tespit edilmiştir. 10^{-8} M konsantrasyonun üzerinde TP, hücre canlılığını olumsuz etkilemektedir. 24. saatte, 0. saate kıyasla 10^{-7} M TP uygulanan hücrelerin canlılıklarında belirgin bir düşüş tespit edilmiştir. 10^{-6} M TP; canlılığı, çözücü olarak kullanılan asetona kıyasla daha fazla azaltmıştır. Ancak çözücü olarak kullanılan aseton tek başına nekroza neden olurken, aynı konsantrasyonda aseton, yüksek dozda (10^{-6} M) TP ile birlikte kullanıldığında apoptotik etki göstermektedir.

Kemik iliğinden yapılan kültür, üçüncü pasaja dek heterojen yapıdadır. Ancak üçüncü pasaj itibariyle saf bir MKH kültüründen bahsedilebilmektedir [1]. Ayrıca yüzey reseptörlerini kaybetmeleri sebebiyle MKH'lerin pasaj sayıları sınırlıdır. Farklı besiyerleri kullanılarak yapılan çalışmalarda çeşitli besiyerleri ile daha çok sayıda pasajlamanın mümkün olduğu belirtilmektedir. Örneğin, bazı çalışmalarda düşük glukoz seviyesine sahip besiyerlerinde MKH'lerin daha uzun süre özelliklerini kaybetmeksizin pasajlanabildikleri tespit edilmiştir [2-5]. Fakat standart kültür koşullarında MKH'ler altı kez pasajlanabildikleri, daha sonra reseptörlerini kaybetmeye başladıkları bilinmektedir. Yine pasaj sayısı ilerledikçe MKH'lerin farklılaşma yeteneklerini kaybettikleri, yapılan çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir [170-173]. Sahip oldukları bu özellikler, bu hücrelerin in vitro ortamda kullanım sürelerini sınırlandırmaktadır.

Kültür ortamında çeşitli hücre tiplerinin büyüme hızlarını artırmak amacıyla, kültür ortamının standart bileşenlerine ek olarak hormonlar ve faktörler kullanılmaktadır. Bu kullanıma örnek olarak MCF-7 meme kanseri hücre hattında insülin kullanımı [6], insan stromal hücre kültüründe FGF-2 kullanımı [7] ya da rat pankreatik adacık kültüründe triiodotironin kullanımı [8] verilebilir. Çalışmamızın sonuçları insan Kİ-MKH kültüründe 10^{-8} M konsantrasyonda TP ilavesinin hücre canlılığını ve bölünmesini artırdığını, bu sayede daha az pasajlama ile daha fazla hücre elde etmenin mümkün olacağını göstermektedir. Bu sonuçlara göre Kİ-MKH kültüründe TP, bölünmeyi teşvik edici bir hücre kültürü besiyeri katkısı olarak kullanılabilir. Bu başlangıç çalışması bulguları ışığında, aynı yöntemler kullanılarak çalışmanın ticari bir hücre hattına ek olarak sağlıklı donörlerden alınan kemik iliğinden oluşturulan primer hücre kültürü çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızın bir diğer amacı ise, testosteronun MKH kaynaklı olduğu düşünülen kronik hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyelini araştırmaktır. Multipl myeloma (MM), malign plazma hücrelerinin kemik iliğindeki klonal proliferasyonu ile karakterize olan, non-Hodgkin lenfomadan sonra en yaygın hematolojik kanserdir. İmmün-düzenleyici ilaç tabanlı tedaviler ve proteaz inhibitörlerindeki gelişmelere karşın MM günümüzde hala büyük ölçüde tedavi edilemez durumdadır. Yapılan çalışmalar, malign plazma hücrelerinin kemik iliği mikroçevresini sitokinler, büyüme faktörleri ve direkt hücre-hücre etkileşimleri ile değiştirdiğini göstermektedir. Ayrıca MM hastalarından elde edilen MKH ve osteoblastların fenotipik ve fonksiyonel olarak farklılıklar gösterdiğini belirtilmektedir [174]. In vitro çalışmalar, sağlıklı insanlardan alınan MKH'ler ile kıyaslandığında MM hastalarından alınan MKH'lerin osteojenik kapasitelerinde bozulma olduğunu işaret

etmektedir [175-177]. Testosteronun kemik erimesini engellediği, kemik oluşumunu desteklediği bilinmektedir [151, 152]. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre belirli dozlarda TP, hücre canlılığı ve proliferasyonunu olumlu etkilemektedir. Fakat MM gibi MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin olumsuz etkilendiği bir hastalıkta etkisinin tespiti için hastalardan elde edilen KI-MKH'lerin hücre yüzey belirteçleri ve testosteron reseptör sayılarından meydana gelen değişimlerin her pasajda ölçülmesi, çalışmanın gen ekspresyon analizleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, testosteron propiyonatın MKH'ler üzerinde proliferasyonu ve canlılığı artırıcı etkisinin doz bağımlı olduğu, bu özelliğin hem MKH kültürlerinde, hem de Multipl Myeloma gibi kemik yapısında değişiklikler ile seyreden kronik hastalıkların tedavisinde testosteron propiyonat kullanılabilmesi için kanıt sağlayan bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmanın bilgileri işığında farklı hücre dizinleri ve primer hücre kültürlerinde benzer çalışmalar yapılmasını öngörmekteyiz.



6. REFERANSLAR

1. Choi MR, Kim HY, Park JY, et al. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2010;472(2):94-8.
2. Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res*. 2006;9(1):31-5.
3. Lo T, Ho JH, Yang MH, Lee OK. Glucose reduction prevents replicative senescence and increases mitochondrial respiration in human mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(6):813-25.
4. Ayatollahi M, Salmani MK, Geramizadeh B, Tabei SZ, Soleimani M, Sanati MH. Conditions to improve expansion of human mesenchymal stem cells based on rat samples. *World J Stem Cells*. 2012;4(1):1-8.
5. Saki N, Jalalifar MA, Soleimani M, Hajizamani S, Rahim F. Adverse Effect of High Glucose Concentration on Stem Cell Therapy. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2013;7(3):34-40.
6. Chappell J, Leitner JW, Solomon S, Golovchenko I, Goalstone ML, Draznin B. Effect of insulin on cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. Direct and potentiating influence. *J Biol Chem*. 2001;276(41):38023-8.
7. Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, et al. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Eng*. 2005;11(1-2):41-9.
8. Verga Falzacappa C, Mangialardo C, Raffa S, et al. The thyroid hormone T3 improves function and survival of rat pancreatic islets during in vitro culture. *Islets*. 2010;2(2):96-103
9. Maehle AH, Ambiguous Cells: The Emergence of the Stem Cell Concept in the Nineteenth and Twentieth Centuries. *Notes Rec R Soc Lond*. 2011;65(4): 359–378.
10. Dinsler R. Der Beitrag Artur Pappenheims zur Hämatologie um die Jahrhundertwende. Villingen, Ruhr-Universität Bochum, 2011.
11. Dantschakoff W. Untersuchungen über die Entwicklung des Blutes und Bindegewebes bei den Vögeln. *Anatomische Hefte*. 1908; 37:471–589.
12. Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. Originally in: *Folia Haematologica* 8. 1909, 125-134. Republished in: *Cell Ther Transplant*. 2009,1:e.000040.01.
13. Ehrlich, P Lazarus, A. *Histology of the blood: normal and pathological*. University Press; Cambridge: 1900. p. 81-120..
14. Neumann E. Hämatologische Studien. III. Leukozyten und Leukämie. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie*. 1912; 207:379–412.
15. Stoltz J-F, de Isla N, Li YP et al. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *Stem Cells International*. 2015;2015:734731.

16. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell stem cell*. 2008;2(4):313-319.
17. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*. 1968;161:54–56.
18. Augello TB, Kurth C, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater*. 2010;20:121-33
19. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: Biology, patho-physiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation research*. 2011;109(8):923-940.
20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
21. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: Variations in yield, growth, and differentiation. *J. Cell. Biochem*. 1999;72(4): 570–585.
22. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: Characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44(4):215-30.
23. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D et al. Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. *Stem Cell Reviews*. 2013;9(1):32-43.
24. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204–2213.
25. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
26. Jones EA, Kinsey SE, English A, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 46: 3349–3360.
27. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(2):126-131.
28. Wyles CC, Houdek MT, Behfar A, Sierra RJ. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells and Cloning*. 2015;8:117-124.
29. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, et al. Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells during Proliferation in Response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(2):413-9.
30. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(11):2412-9.
31. Kléber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):681-7.

32. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stemcells. *J Cell Biochem.* 2004;93(6):1210-30.
33. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204.
34. Schwartz J, Van de Pavert S, Clarke I, Rao A, Ray D, Vrana K. Paracrine interactions within the pituitary gland. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;839:239-43.
35. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, et al. Biologic Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow and Adipose Tissue. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1285-1297.
36. Ng CP, Sharif AR, Heath DE, et al. Enhanced ex vivo expansion of adult mesenchymal stem cells by fetal mesenchymal stem cell ECM. *Biomaterials.* 2014;35(13):4046-57.
37. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2000;7(6):358-63.
38. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75(3):389-97.
39. Zhang P, Martin M, Yang Q-B, Michalek SM, Katz J. Role of B7 Costimulatory Molecules in Immune Responses and T-Helper Cell Differentiation in Response to Recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect and Immun.* 2004;72(2):637-644.
40. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000;67(1):2-17.
41. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: Implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):1931-1936.
42. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726-36
43. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.
44. Brandau S, Jakob M, Hemeda H, et al. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol.* 2010;88(5):1005-15.
45. Cassatella MA. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells.* 2011;29(6):1001-11.
46. Gordon S, Mantovani A. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur J Immunol.* 2011;41(9):2470-2.
47. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory

- MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. Unutmaz D, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10088.
48. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):392-402
 49. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229(2):176-85.
 50. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484-90.
 51. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
 52. Stagg J, Galipeau J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. *Curr Mol Med*. 2013;13(5):856-67.
 53. Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol*. 2010;185(11):6617-23.
 54. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther*. 2012;20(1):187-95.
 55. Chaudhry A, Rudensky AY. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2013;123(3):939-944.
 56. Maccario R, Podestà M, Moretta A, et al. Interaction Of Human Mesenchymal Stem Cells With Cells Involved In Alloantigen-Specific Immune Response Favors The Differentiation Of CD4+ T-Cell Subsets Expressing A Regulatory/Suppressive Phenotype. *Haematologica*. 2005;90(4):516-25.
 57. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E₂ and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4⁺CD25^{High}forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(1):149-160.
 58. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells*. 2013;31(9):1980-91.
 59. Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008;26(1):212-22.
 60. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72.
 61. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54.

62. Zaher W, Harkness L, Jafari A, Kassem M. An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses. *Arch Toxicol.* 2014;88(5):1069-82.
63. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:196-207.
64. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002;108(1):17-29.
65. Baek JE, Choi JY, Kim JE. Skeletal analysis and differential gene expression in Runx2/Osterix double heterozygous embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;451(3):442-8.
66. Barbuto R, Mitchell J. Regulation of the osterix (Osx, Sp7) promoter by osterix and its inhibition by parathyroid hormone. *J Mol Endocrinol.* 2013;51(1):99-108.
67. Nuttall ME, Shah F, Singh V, Thomas-Porch C, Frazier T, Gimble JM. Adipocytes and the regulation of bone remodeling: a balancing act. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):78-87.
68. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(8):442-7.
69. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(5):593-603.
70. Kawai M, Green CB, Lecka-Czernik B, et al. A circadian-regulated gene, *Nocturnin*, promotes adipogenesis by stimulating PPAR- γ nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(23):10508-10513.
71. Lee YH, Kim SH, Lee YJ, et al. Transcription factor Snail is a novel regulator of adipocyte differentiation via inhibiting the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Cell Mol Life Sci.* 2013 Oct;70(20):3959-71
72. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, et al. Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Expression by Adipocyte Differentiation and Determination Factor 1/Sterol Regulatory Element Binding Protein 1: Implications for Adipocyte Differentiation and Metabolism. *Mol Cell Biol.* 1999;19(8):5495-5503.
73. Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science.* 2000 Oct 6;290(5489):134-8.
74. Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP Family of Transcription Factors Is Critical in GATA-Mediated Suppression of Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2005;25(2):706-715.
75. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev.* 1994;8(14):1654-63.

76. Lin FT, Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(19):8757-8761.
77. Park BO, Ahrends R, Teruel MN. Consecutive positive feedback loops create a bistable switch that controls preadipocyte-to-adipocyte conversion. *Cell Rep*. 2012;2(4):976-90.
78. Tang Q-Q, Lane MD. Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein- β during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12446-12450.
79. Akiyama H, Kim J-E, Nakashima K, et al. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(41):14665-14670.
80. Akiyama H, Lefebvre V. Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *Journal J Bone Miner Metab*. 2011;29(4):390-395.
81. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, et al. Interactions between Sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*. 2004;18(9):1072-1087.
82. Topol L, Chen W, Song H, Day TF, Yang Y. Sox9 Inhibits Wnt Signaling by Promoting β -Catenin Phosphorylation in the Nucleus. *J Biol Chem*. 2009;284(5):3323-3333.
83. Reinhold MI, Kapadia RM, Liao Z, Naski MC. The Wnt-inducible transcription factor Twist1 inhibits chondrogenesis. *J Biol Chem*. 2006;281(3):1381-8.
84. Chen S, Tao J, Bae Y, et al. Notch gain of function inhibits chondrocyte differentiation via Rbpj-dependent suppression of Sox9. *J Bone Miner Res*. 2013;28(3):649-659.
85. Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294(3):C675-82.
86. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-84.
87. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*. 2013;95(12):2196-211.
88. Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest*. 1959;38(10 Pt 1-2):1709-1716.
89. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet*. 1968;2(7583):1366-9.
90. Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):231-8.
91. von Dalowski F, Kramer M, Wermke M et al. Mesenchymal Stromal Cells for Treatment of Acute Steroid-Refractory GvHD: Clinical Responses and Long-Term Outcome. *Stem Cells*. 2015 Sep 29.

92. Weng JY, Du X, Geng SX, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(12):1732-1740.
93. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006;81(10):1390-7.
94. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(2):200-7.
95. Dander E, Lucchini G, Vinci P, et al. Mesenchymal stromal cells for the treatment of graft-versus-host disease: understanding the in vivo biological effect through patient immune monitoring. *Leukemia.* 2012;26(7):1681-4.
96. Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia.* 2011;25(9):1408-14.
97. Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(1):65-72.
98. Yin F, Battiwalla M, Ito S, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells to treat tissue damage in allogeneic stem cell transplant recipients: Correlation of biological markers with clinical responses. *Stem cells.* 2014;32(5):1278-1288.
99. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Lett.* 2015 pii: S0165-2478(15)00119-4.
100. Gee AP, Richman S, Durett A, et al. Multicenter Cell Processing for Cardiovascular Regenerative Medicine Applications - The Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CTR) Experience. *Cytotherapy.* 2010;12(5):684-691.
101. Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94(1):92-5.
102. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev.* 2001 May;122(7):713-34.
103. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105(1):93-8.
104. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(6):1919-25; discussion 1926.
105. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(33):14022-14027.

106. Yang YJ, Qian HY, Huang J, et al. Combined therapy with simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells increases benefits in infarcted swine hearts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(12):2076-82.
107. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation.* 2005;111(2):150-6.
108. Dixon JA, Gorman RC, Stroud RE, et al. Mesenchymal Cell Transplantation and Myocardial Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circulation.* 2009;120(11 Suppl):S220-S229.
109. Sinusas K. Osteoarthritis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2012;85(1):49-56.
110. Wyles CC, Houdek MT, Behfar A, Sierra RJ. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications.* 2015;8:117-124.
111. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(2):137-62.
112. Raynauld JP, Buckland-Wright C, Ward R, et al. Safety and efficacy of long-term intraarticular steroid injections in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2):370-7.
113. Wyles CC, Houdek MT, Wyles SP, Wagner ER, Behfar A, Sierra RJ. Differential cytotoxicity of corticosteroids on human mesenchymal stem cells. *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473(3):1155-64.
114. Rutjes AW, Jüni P, da Costa BR, Trelle S, Nüesch E, Reichenbach S. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2012;157(3):180-91.
115. Kurtz SM, Lau E, Ong K, Zhao K, Kelly M, Bozic KJ. Future Young Patient Demand for Primary and Revision Joint Replacement: National Projections from 2010 to 2030. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(10):2606-2612.
116. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(3):704-13.
117. Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis Found Symp.* 2003;249:86-96; discussion 96-102, 170-4, 239-41
118. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(12):3464-74.
119. Horie M, Choi H, Lee RH, et al. Intra-articular Injection of Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Promote Rat Meniscal Regeneration by Being Activated to Express Indian Hedgehog that Enhances Expression of Type II Collagen. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(10):1197-1207.
120. Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells.* 2014;6(5):526-539.

121. Fallowfield JA, Iredale JP. Targeted treatments for cirrhosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2004;8(5):423-35.
122. Zhang Z, Wang FS. Stem cell therapies for liver failure and cirrhosis. *J Hepatol*. 2013 Jul;59(1):183-5.
123. Eom YW, Kim G, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for cirrhosis: Present and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2015;21(36):10253-10261.
124. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*. 2000 20;406(6793):257.
125. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000 Jul;32(1):11-6.
126. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med*. 2007;10(4):459-66.
127. Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21(10):1199-205.
128. Jang YO, Kim YJ, Baik SK, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study. *Liver Int*. 2014;34(1):33-41.
129. Amer ME, El-Sayed SZ, El-Kheir WA, et al. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(10):936-41.
130. Peng L, Xie DY, Lin BL, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology*. 2011 2;54(3):820-8.
131. Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med*. 2015;30(5):580-589.
132. Li M, Ikehara S. Bone Marrow Stem Cell as a Potential Treatment for Diabetes. *Journal of Diabetes Research*. 2013;2013:329596.
133. Urbán VS, Kiss J, Kovács J, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells*. 2008;26(1):244-53.
134. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2062-8.
135. Boumaza I, Srinivasan S, Witt WT, et al. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. *J Autoimmun*. 2009;32(1):33-42.
136. Abraham NG, Li M, Vanella L, Peterson SJ, Ikehara S, Asprinio D. Bone marrow stem cell transplant into intra-bone cavity prevents type 2 diabetes: role of heme oxygenase-adiponectin. *J Autoimmun*. 2008;30(3):128-35.

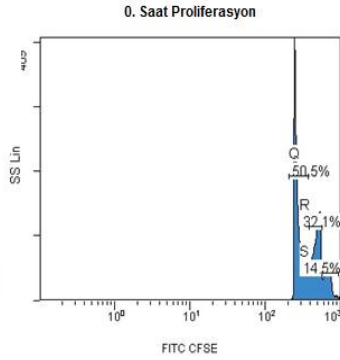
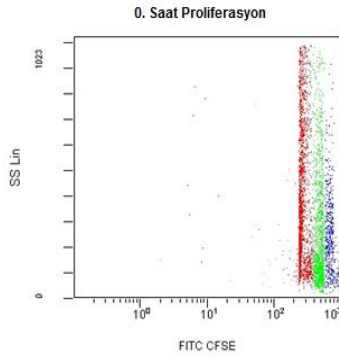
137. Estrada EJ, Valacchi F, Nicora E, et al. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone marrow stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. *Cell Transplant.* 2008;17(12):1295-304.
138. Hermann A, Gastl R, Liebau S, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 19):4411-22.
139. Tropel P, Platet N, Platel JC, et al. Functional Neuronal Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2006;24(12):2868-76.
140. Qin X, Han W, Yu Z. Neuronal-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by striatal extracts from a rat model of Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research.* 2012;7(34):2673-2680.
141. Hosseini M, Moghadas M, Edalatmanesh MA, Hashemzadeh MR. Xenotransplantation of human adipose derived mesenchymal stem cells in a rodent model of Huntington's disease: motor and non-motor outcomes. *Neurol Res.* 2015;37(4):309-19.
142. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(24):2277-2286.
143. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest.* 2013;143(6):1590-8.
144. Mannon PJ. Remestemcel-L: human mesenchymal stem cells as an emerging therapy for Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2011;11(9):1249-56.
145. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID:6013, <https://pubchem.ncbi.nih.gov/compound/6013>
146. Luu-The V, Bélanger A, Labrie F. Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(2):207-21.
147. Ye L, Su ZJ, Ge RS. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules.* 2011;16(12):9983-10001.
148. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):34-45.
149. Tirabassi G, Biagioli A, Balercia G. Bone benefits of testosterone replacement therapy in male hypogonadism. *Panminerva Med.* 2014;56(2):151-63.
150. Bhasin S, Taylor WE, Singh R, et al. The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003;58(12):M1103-10.
151. Tivesten A, Movérare-Skrtic S, Chagin A, et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2004;19(11):1833-9.
152. Davey RA, Morris HA. Effects of estradiol and dihydrotestosterone on osteoblast gene expression in osteopenic ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(3):212-8.

153. Page ST, Amory JK, Bowman FD, et al. Exogenous testosterone (T) alone or with finasteride increases physical performance, grip strength, and lean body mass in older men with low serum T. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1502-10.
154. Smith MR, Finkelstein JS, McGovern FJ, et al. Changes in body composition during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):599-603.
155. Shahani S, Braga-Basaria M, Maggio M, Basaria S. Androgens and erythropoiesis: past and present. *J Endocrinol Invest.* 2009;32(8):704-16.
156. Bhatia V, Chaudhuri A, Tomar R, Dhindsa S, Ghanim H, Dandona P. Low testosterone and high C-reactive protein concentrations predict low hematocrit in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29(10):2289-94.
157. Azad N, Pitale S, Barnes WE, Friedman N. Testosterone treatment enhances regional brain perfusion in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7):3064-8.
158. Moffat SD, Zonderman AB, Metter EJ, Blackman MR, Harman SM, Resnick SM. Longitudinal assessment of serum free testosterone concentration predicts memory performance and cognitive status in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):5001-7.
159. Tan RS, Pu SJ. A pilot study on the effects of testosterone in hypogonadal aging male patients with Alzheimer's disease. *Aging Male.* 2003;6(1):13-7.
160. Paoletti AM, Congia S, Lello S, et al. Low androgenization index in elderly women and elderly men with Alzheimer's disease. *Neurology.* 2004;62(2):301-3.
161. Moffat SD, Zonderman AB, Metter EJ, et al. Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men. *Neurology.* 2004;62(2):188-93.
162. Bain J. The many faces of testosterone. *Clin Interv Aging.* 2007;2(4):567-576.
163. Verzola D, Gandolfo MT, Salvatore F, et al. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. *Kidney Int.* 2004;65(4):1252-61
164. Winiarska A, Mandt N, Kamp H, et al. Effect of 5alpha dihydrotestosterone and testosterone on apoptosis in human dermal papilla cells. *Skin Pharmacol Physiol.* 2006;19(6):311-21.
165. Hong H, Nadesan P, Poon R, Alman BA. Testosterone regulates cell proliferation in aggressive fibromatosis (desmoid tumour). *Br J Cancer.* 2011;104(9):1452-8.
166. Estrada M, Varshney A, Ehrlich BE. Elevated Testosterone Induces Apoptosis in Neuronal Cells. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25492-501
167. Lopes RA, Neves KB, Pestana CR, et al. Testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle cells via extrinsic apoptotic pathway with mitochondria-generated reactive oxygen species involvement. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306(11):H1485-94.
168. Fu R, Liu J, Fan J, et al. Novel evidence that testosterone promotes cell proliferation and differentiation via G protein-coupled receptors in the rat L6 skeletal muscle myoblast cell line. *J Cell Physiol.* 2012;227(1):98-107.

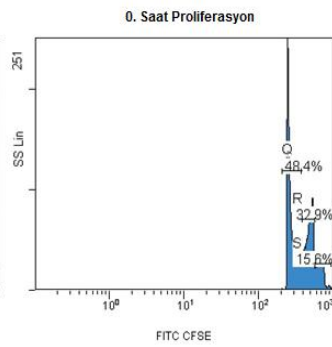
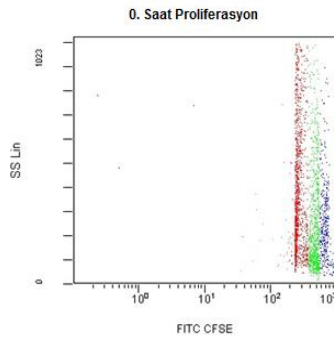
169. Barbosa-Desongles A, Hernández C, Simó R, Selva DM. Testosterone induces cell proliferation and cell cycle gene overexpression in human visceral preadipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;305(3):C355-9.
170. Zhang FB, Li L, Fang B, Zhu DL, Yang HT, Gao PJ. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Oct 28;336(3):784-92.
171. Kretlow JD, Jin Y-Q, Liu W, et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biology*. 2008;9:60.
172. Di Battista JA, Shebawy W, Kizilay O, et al. Proliferation and differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) into osteoblastic lineage are passage dependent. *Inflamm Res*. 2014;63(11):907-17.
173. Choi JS, Lee BJ, Park HY, et al. Effects of Donor Age, Long-Term Passage Culture, and Cryopreservation on Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:85-99.
174. Noll JE, Williams SA, Tong CM, et al. Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating the proliferation of mesenchymal stromal cells. *Haematologica*. 2014;99(1):163-171.
175. Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia*. 2007;21(5):1079-88.
176. Xu S, Evans H, Buckle C, et al. Impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients is associated with a blockade in the deactivation of the Notch signaling pathway. *Leukemia*. 2012;26(12):2546-9.
177. Reagan MR, Mishima Y, Glavey SV, et al. Investigating osteogenic differentiation in multiple myeloma using a novel 3D bone marrow niche model. *Blood*. 2014;124(22):3250-3259.

7-EKLER

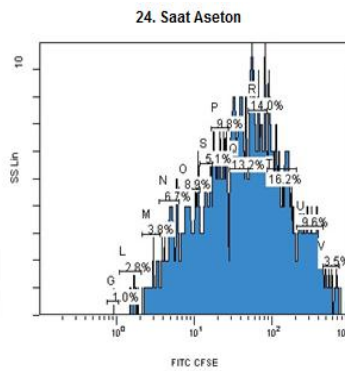
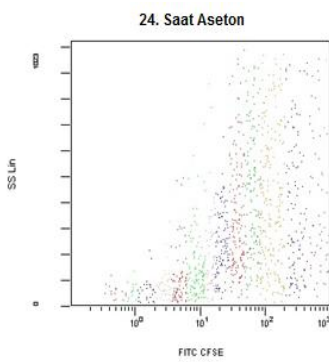
Ek 1: CFSE Akan Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri - 1



Bölünme Sayısı	%	x- median
3	50,48	273
2	32,09	481
1	14,54	688

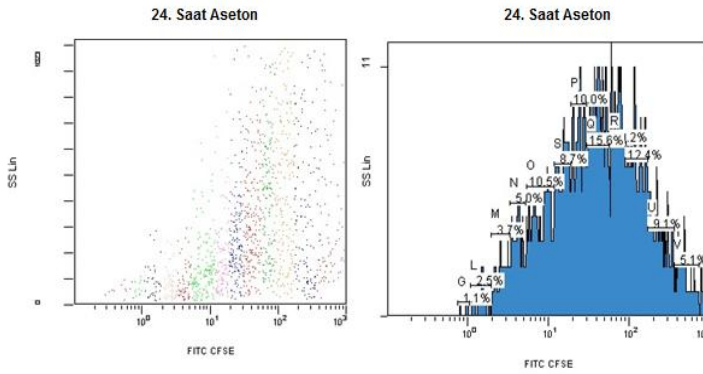


Bölünme Sayısı	%	x- median
3	48,42	274
2	32,95	480
1	15,58	686

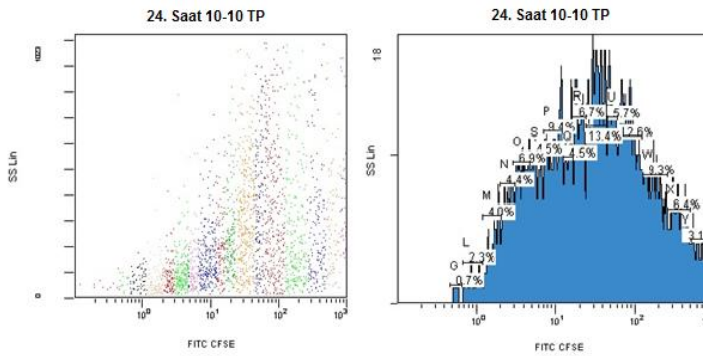


Bölünme Sayısı	%	x- median
12	0,97	0,912
11	2,77	1,57
10	3,76	2,85
9	6,68	4,95
8	8,9	8,95
7	9,77	21,6
6	13,17	37,7
5	13,97	65,8
4	5,07	14,5
3	16,21	131
2	9,63	305
1	3,52	573

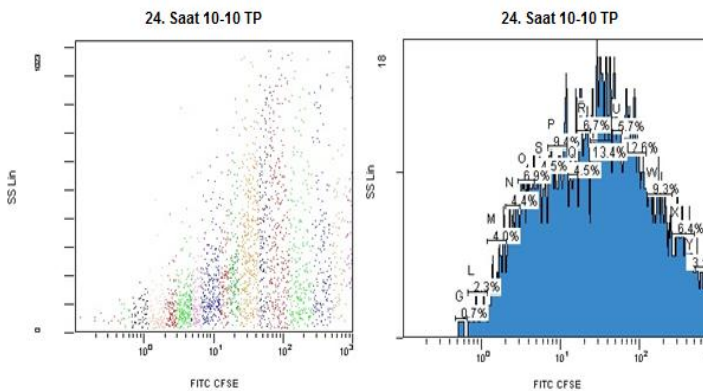
Ek 1: CFSE Akan Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri - 2



Bölünme Sayısı	%	x-median
12	1,13	0,899
11	2,48	1,5
10	3,71	2,63
9	5,02	4,21
8	10,55	8,18
7	9,97	24,1
6	15,63	42
5	10,01	72
4	8,67	15,1
3	12,43	124
2	9,05	248
1	5,15	518

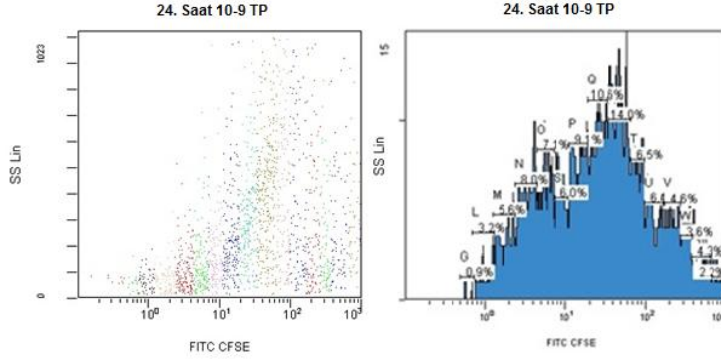


Bölünme Sayısı	%	x-median
15	0,69	0,554
14	2,33	0,913
13	4,04	1,64
12	4,4	2,53
11	6,94	3,77
10	9,35	9,49
9	4,54	14,6
8	6,66	19,6
7	4,51	5,67
6	13,3	33,1
5	5,72	51,6
4	12,6	85,9
3	9,32	181
2	6,38	365
1	3,09	642

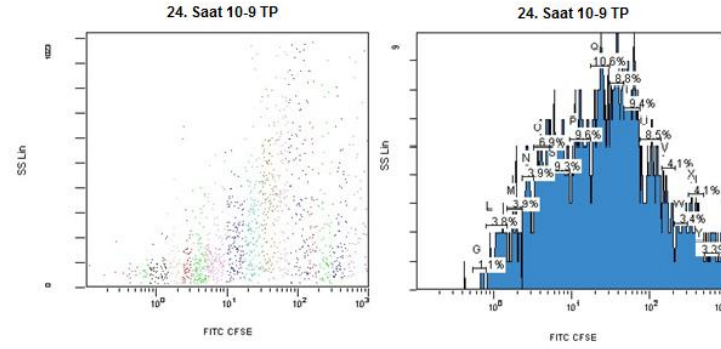


Bölünme Sayısı	%	x-median
15	1,47	0,647
14	3,2	1,1
13	1,87	1,57
12	3,6	2,22
11	6,44	3,34
10	11,19	12
9	5,65	19,8
8	6,11	27
7	9,85	6,02
6	13,38	44,1
5	9,98	81
4	6,22	139
3	8,52	244
2	4,1	442
1	3,38	726

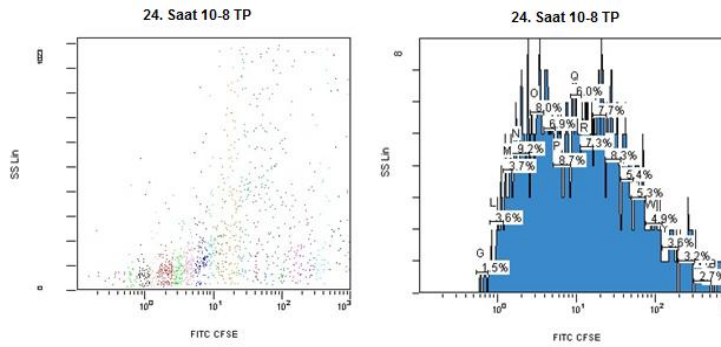
Ek 1: CFSE Akan Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri - 3



Bölünme Sayısı	%	x- median
15	0,89	0,611
14	3,16	0,99
13	5,62	1,77
12	7,95	3,35
11	7,07	5,64
10	9,11	14,9
9	10,56	25,9
8	14,01	47,2
7	6,04	8,86
6	6,55	79,9
5	6,38	128
4	4,64	220
3	3,56	324
2	4,27	494
1	2,16	787

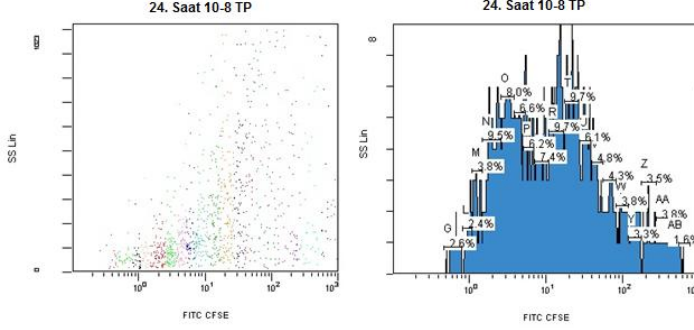


Bölünme Sayısı	%	x- median
15	1,09	0,681
14	3,78	1,14
13	3,92	1,87
12	3,92	2,71
11	6,94	4,18
10	9,57	13,2
9	10,64	23,8
8	8,83	38,4
7	9,32	6,99
6	9,4	59,4
5	8,54	104
4	4,07	171
3	3,43	252
2	4,15	392
1	3,76	635

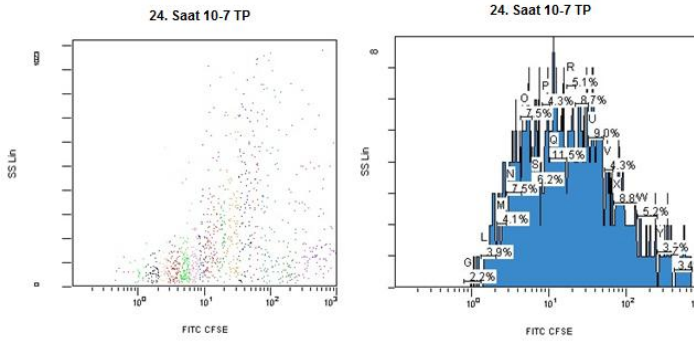


Bölünme Sayısı	%	x- median
18	1,46	0,634
17	3,55	0,998
16	3,68	1,37
15	9,2	2,01
14	8,02	3,17
13	8,73	6,61
12	6,04	9,72
11	7,33	13,4
10	6,91	4,5
9	7,7	19,7
8	8,27	28,9
7	5,4	43,3
6	4,89	95,6
5	5,26	61
4	3,6	157
3	3,16	251
2	2,74	398
1	2,12	625

Ek 1: CFSE Akan Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri - 4

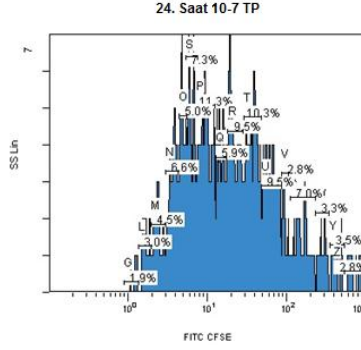
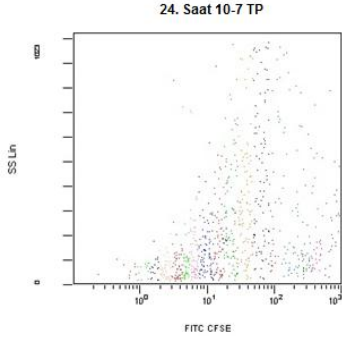


Bölünme Sayısı	%	x- median
18	1,46	0,634
17	3,55	0,998
16	3,68	1,37
15	9,2	2,01
14	8,02	3,17
13	8,73	6,61
12	6,04	9,72
11	7,33	13,4
10	6,91	4,5
9	7,7	19,7
8	8,27	28,9
7	5,4	43,3
6	4,89	95,6
5	5,26	61
4	3,6	157
3	3,16	251
2	2,74	398
1	2,12	625

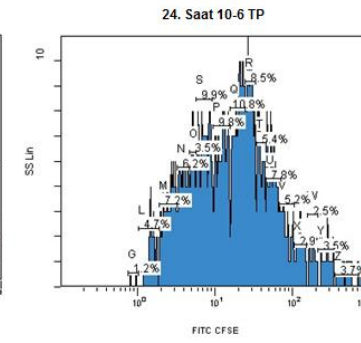
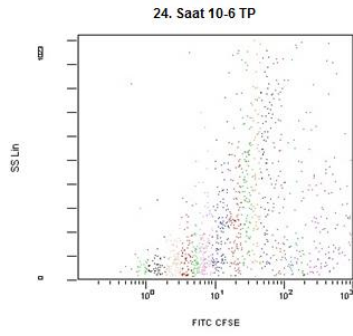


Bölünme Sayısı	%	x- median
18	2,63	0,643
17	2,45	0,967
16	3,83	1,27
15	9,25	2,04
14	7,95	3,16
13	6,2	5,88
12	7,4	8,77
11	9,71	13,8
10	6,62	4,54
9	9,74	21,8
8	6,15	32,8
7	4,76	45,9
6	3,8	99,7
5	4,28	67,6
4	3,33	145
3	3,51	221
2	3,38	388
1	1,6	617

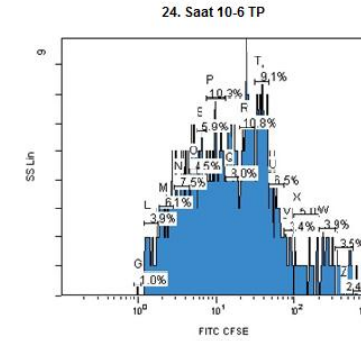
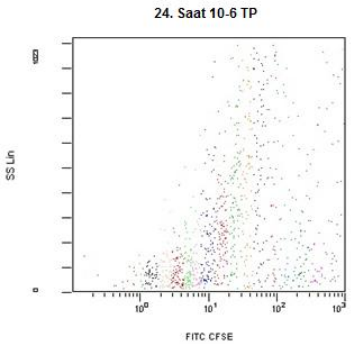
Ek 1: CFSE Akan Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri – 5



Bölünme Sayısı	%	x- median
16	1,88	1,16
15	3,02	1,69
14	4,55	2,4
13	6,55	3,64
12	4,96	4,89
11	11,29	9,63
10	5,88	14,9
9	9,51	22,2
8	7,25	6,33
7	10,31	37,6
6	9,48	65
5	2,8	94,5
4	3,28	286
3	7	160
2	3,47	431
1	2,77	732

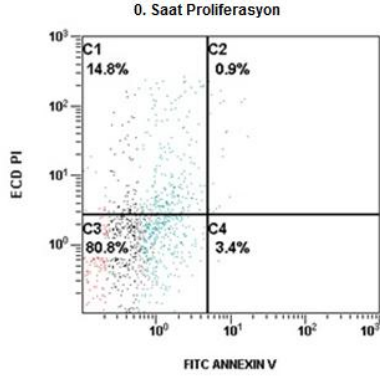


Bölünme Sayısı	%	x- median
16	1,18	0,882
15	4,72	1,49
14	7,19	2,55
13	6,23	3,92
12	3,47	5,17
11	9,82	12,3
10	10,8	20,3
9	8,49	28,5
8	9,94	7,26
7	5,53	39
6	7,75	56,1
5	5,15	83,3
4	2,49	183
3	2,9	129
2	3,49	281
1	3,74	503

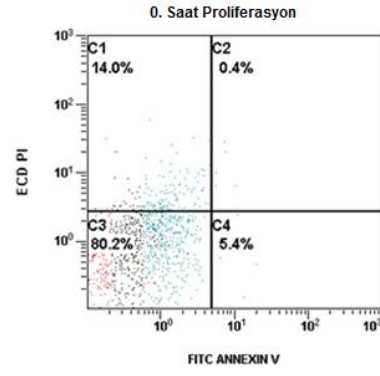


Bölünme Sayısı	%	x- median
16	0,96	0,989
15	3,89	1,46
14	6,08	2,32
13	7,5	3,6
12	4,49	4,95
11	10,35	9,85
10	7,99	15,6
9	10,79	25,1
8	5,91	6,47
7	9,06	37,6
6	6,54	55,4
5	3,42	82,9
4	3,94	260
3	5,01	144
2	3,53	440
1	2,38	739

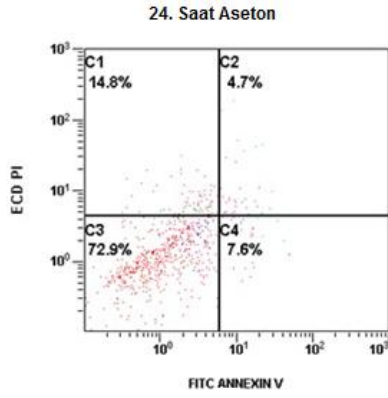
Ek 2: Annexin V-PI Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri – 1



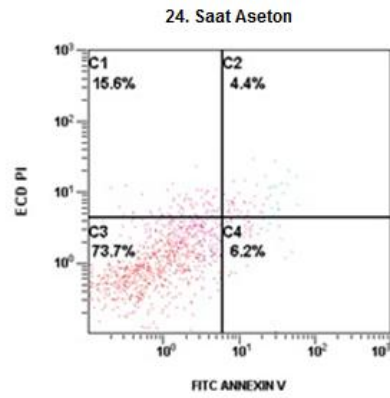
	%	x-mean
Nekroz	14,82	1,12
Apoptoz	0,94	7,88
Canlı Hücreler	80,82	0,801
Erken Apoptoz	3,43	8,3



	%	x-mean
Nekroz	14	0,626
Apoptoz	0,41	7,34
Canlı Hücreler	80,17	0,851
Erken Apoptoz	5,42	9,36

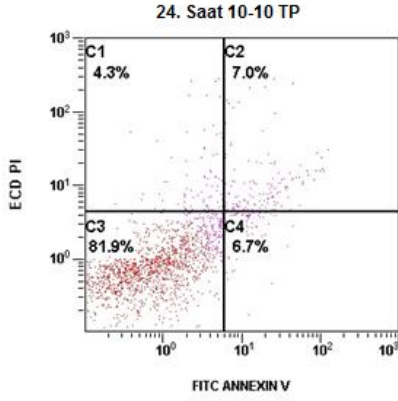


	%	x-mean
Nekroz	14,82	1,99
Apoptoz	4,67	13,6
Canlı Hücreler	72,9	1,42
Erken Apoptoz	7,61	12,6

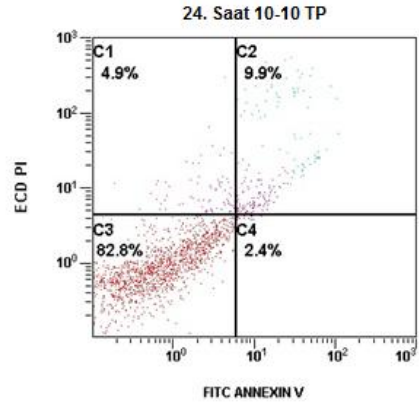


	%	x-mean
Nekroz	15,64	1,03
Apoptoz	4,43	19,1
Canlı Hücreler	73,73	1,22
Erken Apoptoz	6,2	12,3

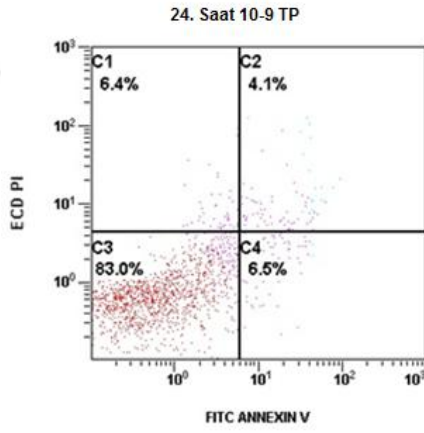
Ek 2: Annexin V-PI Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri – 2



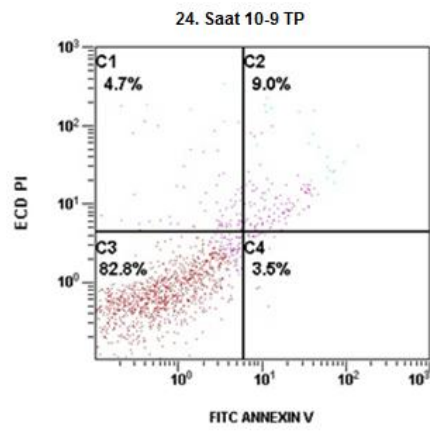
	%	x-mean
Nekroz	4.28	2.94
Apoptoz	7.05	22.2
Canlı Hücreler	81.94	1.16
Erken Apoptoz	6.74	11



	%	x-mean
Nekroz	4.86	3.1
Apoptoz	9.90	19.9
Canlı Hücreler	82.79	1.05
Erken Apoptoz	2.45	8.69

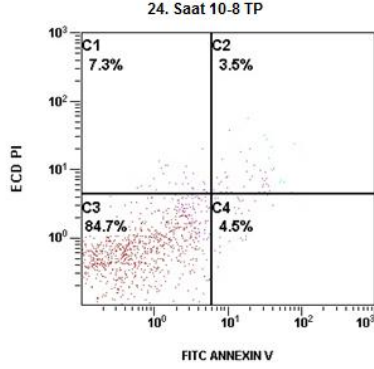


	%	x-mean
Nekroz	6.37	1.68
Apoptoz	4.12	24.7
Canlı Hücreler	83.03	1.05
Erken Apoptoz	6.48	13

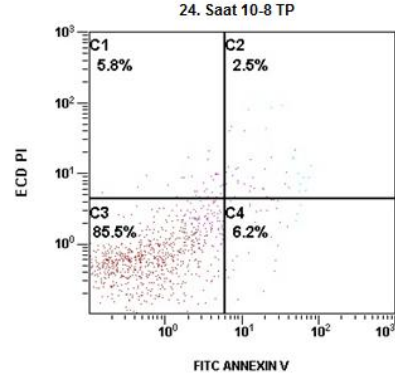


	%	x-mean
Nekroz	4.74	3.05
Apoptoz	8.98	19.8
Canlı Hücreler	82.76	1.07
Erken Apoptoz	3.52	8.41

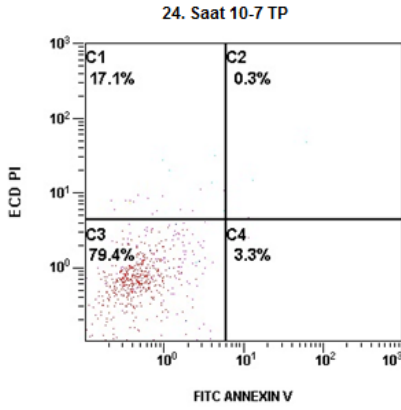
Ek 2: Annexin V-PI Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri – 3



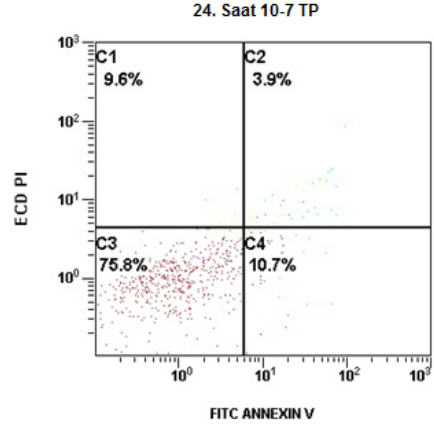
	%	x-mean
Nekroz	7.29	0.931
Apoptoz	3.52	24
Canlı Hücreler	84.70	0.847
Erken Apoptoz	4.49	13.2



	%	x-mean
Nekroz	5.77	1.14
Apoptoz	2.49	26
Canlı Hücreler	85.53	0.856
Erken Apoptoz	6.21	16

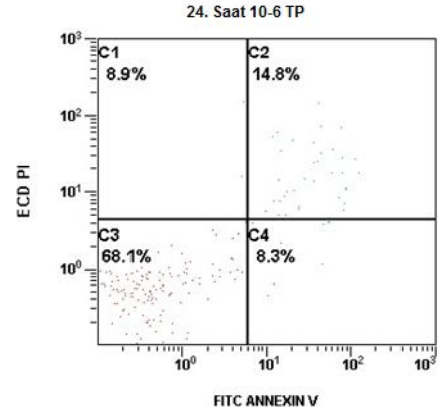
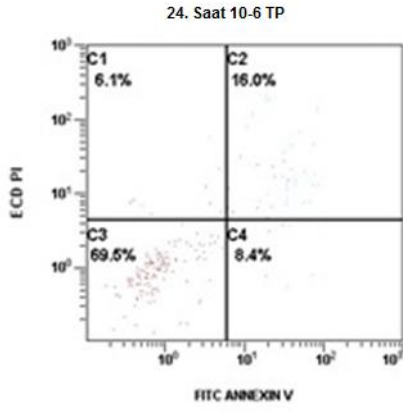


	%	x-mean
Nekroz	17.05	0.32
Apoptoz	0.28	15.8
Canlı Hücreler	79.37	0.791
Erken Apoptoz	3.30	15



	%	x-mean
Nekroz	9.61	0.339
Apoptoz	3.89	31.8
Canlı Hücreler	75.82	1.32
Erken Apoptoz	10.68	17.6

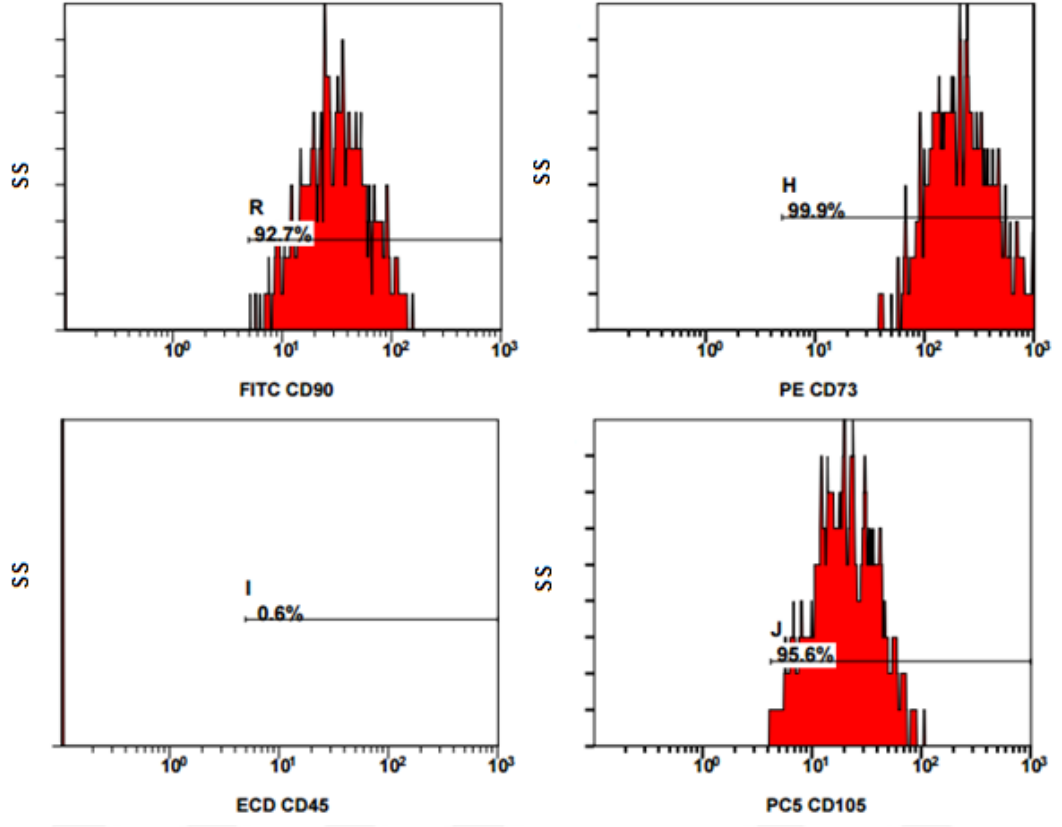
Ek 2: Annexin V-PI Hücre Ölçer Grafikleri ve Verileri – 4



	%	x-mean
Nekroz	6.15	2.14
Apoptoz	15.96	33.9
Canlı Hücreler	69.50	1.08
Erken Apoptoz	8.39	28.8

	%	x-mean
Nekroz	8,87	0,615
Apoptoz	14,78	47,3
Canlı Hücreler	68,09	0,873
Erken Apoptoz	8,27	37

Ek 3: Hücre Yüzey Belirteçleri Akan Hücre Ölçer Analizinin Histogram Grafikleri



8- CV

Kişisel Bilgiler

Adı	Başak	Soyadı	Aru
Doğum Yeri	Beyoğlu	Doğum Tarihi	1991
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	12628216312
E-mail	basak.aru@hotmail.com	Tel	5352534307

Öğrenim Bilgileri

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Üniversite	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	2013
Lise		Kartal Anadolu Lisesi	2009

Bildiği Yabancı Diller	Yabancı Dil Sınav Notu
İngilizce	YDS – 91,25
Almanca	Sprachdiplom Stufe II - C1