

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPOKSİK ORTAMDA OTOLOG SERUMLA ELDE EDİLEN İNSAN ADİPOZ
KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE KRİYOPREZERVASYON
ETKİSİ, PROLİFERATİF VE KONDROJENİK FARKLANMA KAPASİTESİNİN
İNCELENMESİ

Doktora Tezi

HAZIRLAYAN

Senem TEKELİ

İZMİR

2019

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPOKSİK ORTAMDA OTOLOG SERUMLA ELDE EDİLEN İNSAN ADİPOZ
KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE KRİYOPREZERVASYON
ETKİSİ, PROLİFERATİF VE KONDROJENİK FARKLANMA KAPASİTESİNİN
İNCELENMESİ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

Doktora Tezi

HAZIRLAYAN

Senem TEKELİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

İZMİR

2019

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan: Prof.Dr. Yiğit UYANIKGİL

(Danışman)

Üye: Prof.Dr. Hüseyin AKTUĞ

Üye: Prof.Dr. Dilek TAŞKIRAN

Üye: Prof.Dr. Güven ERBİL

Üye: Prof.Dr. Meltem KURUŞ

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖZET

HİPOKSİK ORTAMDA OTOLOG SERUMLA ELDE EDİLEN İNSAN ADİPOZ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE KRİYOPREZERVASYON ETKİSİ, PROLİFERATİF VE KONDROJENİK FARKLANMA KAPASİTESİNİN İNCELENMESİ

İnsan kaynaklı adipoz (yağ) dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, ekspansiyonu, kriyoprezervasyonu ve izole edilen kök hücrelerin diferansiyasyon kapasiteleri araştırılmıştır. Bu konuda ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılmış çalışmalarda farklı izolasyon, ekspansiyon, kriyoprezervasyon ve diferansiyasyon yöntemleri kullanılmış olmasına rağmen hayvan kaynaklı serum içermeyen olog serum ve hipoksik kültür koşullarında yapılmış bir çalışma yoktur.

Cerrahi koşullarda daha önce belirlenen protokoller çerçevesinde 10 adet 25-52 yaş arası kadından alınan abdominal yağ örneklerinden mezenkimal kök hücre eldesi sağlanmıştır. Aynı hastaya ait kök hücreler hipoksik ve normansi koşullarda kültüre edilmiş 1., 3., ve 5. pasajlarda hücre canlılığı, mezenkimal kök hücre karakterizasyonu, dondurup/çözme ve kıkırdak yönüne doğru farklanma bu çalışmada gözlemlenmiştir.

Bu çalışmayla birlikte bugüne kadar hipoksik kültür ortamında yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle ilgili mevcut bilgilere olog serum uygulaması eklenerek konuda genişleme, yenileme ve iyileştirme oluşturulacağı aynı zamanda standart bir protokol geliştirilip ileride *in vivo* çalışmalarla desteklenerek klinikte kullanıma ışık tutacağı düşünülmektedir. Bu kapsamda çalışmanın rejeneratif tıp uygulaması ve metodolojik açıdan oldukça önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre; Olog serum; Dondurma/çözme; Kıkırdak farklılaşması; Trehaloz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CRYOPRESERVATION, PROLIFERATIVE AND CHONDROGENIC DIFFERENTIATION CAPACITY ON HUMAN ADIPOCYTE-DERIVED MESENCYMAL STEM CELLS OBTAINED IN HYPOXIA WITH AUTOLOGOUS SERUM

Isolation, expansion, cryopreservation of mesenchymal stem cells obtained from human fat tissue and investigation of differentiation capacities of isolated stem cells. Although there is different isolation, expansion, cryopreservation and differentiation methods used in studies in our country and in other countries, there is no study on animal derived serum free autologous serum and hypoxic culture conditions.

Mesenchymal stem cells were obtained from 10 abdominal fat samples taken from 10, 25 to 52-years-old females within the framework of previously defined protocols in surgical conditions.

Cell viability, mesenchymal stem cell characterization, freezing / thawing and chondrogenic differentiation in the hypoxic and normal cultured of 1-3-5 passages of the same patient were observed in this study.

With this study, it is thought that in the hypoxic culture medium, expansion, renewal and improvement in the subject will be made by adding autologous serum application to existing information about mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, and at the same time a standard protocol will be developed and supported by in vivo studies in the future. Working within this context is very important in terms of regenerative medicine application and methodology.

Key Words: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, Autologous serum, Freezing/thawing, Chondrogenic differentiation, Trehalose

İÇİNDEKİLER

ÖZET	II
ABSTRACT	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
KISALTMALAR DİZİNİ	IX
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
1.1. Kök Hücreler.....	4
1.2. Kök Hücrenin Genel Özellikleri.....	4
1.2.1. Self-renewal (Kendini yenileyebilme).....	5
1.2.2. Plastisite (Farklılaşma).....	5
1.2.3. Pluripotensi (Köklülük).....	7
1.3. Kök Hücrelerin Türlerine Göre Sınıflandırılması.....	7
1.4. Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynağa Göre Sınıflandırılması.....	9
1.4.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH).....	9
1.4.2. Erişkin Kök Hücreler (Embriyonik olmayan kök hücreler).....	10
1.5. Kriyoprezervasyon.....	22
1.6. Cerrahi Olarak Adipoz Dokunun Eldesi (Lipoaspirasyon).....	23
1.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı.....	25
1.7.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı İle İlgili Güncel Çalışmalar.....	27
GEREÇ VE YÖNTEM	35
2.1. Materyaller.....	35
2.2. Cihazlar.....	35
2.3. Kimyasallar.....	36
2.4. Metodlar.....	37
2.4.1. İnsan Adipoz Dokunun Örneklenmesi (Cerrahi).....	37
2.4.2. Periferik Kandan Serum Eldesi.....	39

2.4.3.	Lipoaspirattan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Ekspansiyonu	39
2.4.4.	Deney Grupları	42
2.4.5.	Hipoksi Modeli Oluşturma	42
2.4.6.	Normansi Modeli Oluşturma	42
2.5.	<i>İn Vitro</i> Hücre Kültürü	43
2.5.1.	Hücrelerin Ekspansiyonu	43
2.5.2.	Hücrelerin Pasajlanması	44
2.5.3.	Canlılık Tayini	45
2.5.4.	Akım Sitometri İle İmmunfenotipleme	46
2.5.5.	Apotoz/Nekroz Tayini	48
2.5.6.	Hücrelerin Çoğalma Karakterlerinin Tespitleri	49
2.5.7.	Kriyoprezervasyon Yöntemi	50
2.5.8.	Hücrelerin Çözdürülmesi	51
2.6.	Hücrelerin <i>İn Vitro</i> Farklılaştırılması	51
2.6.1.	Kondrojenik Farklılaşmanın Alcian Mavisi ile Histolojik Tayini	52
2.6.2.	Kondrojenik Farklılaşmanın Anti-Kollojen II ile İmmunohistokimyasal Tayini	54
2.6.3.	Kondrojenik Farklılaşmanın RT-PCR İle Aggreccan Tespiti	56
2.7.	İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi	61
BULGULAR		62
3.1.	Canlılık Analizleri	62
3.2.	Pasajlara Göre Hücrelerin Morfolojik Yapısının Değerlendirilmesi	68
3.3.	Akım Sitometrik Bulgular	73
3.4.	Doubling Time (Katlanma süresi) Analizi	75
3.5.	MKH'lerin Kıkırdağa Farklanma Bulguları	76
3.6.	Real Time PCR ile Agreccan Tayini	79
TARTIŞMA		80
SONUÇ VE ÖNERİLER		87
KAYNAKÇA		88
TEŞEKKÜR		101
ÖZGEÇMİŞ		102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Telomerlerin her hücre bölünmesinde kısılır.....	4
Şekil 2: Kök Hücre Tipleri	8
Şekil 3: Kök hücre tipleri ve germ yaprakları	9
Şekil 4: Mezenkimal kök hücrenin birinci pasaj görüntüsü	13
Şekil 5: Mezenkimal kök hücre olarak tanımlanma kriterleri	14
Şekil 6: Mezenkimal kök hücre izolasyonu	20
Şekil 7: Adipoz dokunun elde edilebileceği alanlar	25
Şekil 8: (a) Kök hücre bazlı toplam klinik çalışma verileri. (b) Mezenkimal kök hücre çalışma verileri. MKH: Mezenkimal kök hücre	28
Şekil 9: Mezenkimal kök hücre ile tedavi edilen yaygın hastalık yüzdeleri. GVHD: Graft versus host hastalığı	34
Şekil 10: Lipoaspirasyon uygulaması.....	38
Şekil 11: Ameliyathane şartlarında lipoaspirasyonla elde edilen yağ dokusu örnekleri	40
Şekil 12: Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı laminar kabin, elde edilen SVF görüntüsü.....	40
Şekil 13: Yağ dokudan MKH eldesi için kullanılan tip I kollojenaz enzimi.....	41
Şekil 14: Ekimden 6 saat sonraki MKH görüntüsü	43
Şekil 15: Hücre kültürü için gerekli besiyerleri.....	44
Şekil 16: İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki mikroskop görünümü.	45
Şekil 17: Nanotek Arthur™ Cihazının Dış Görünümü	46
Şekil 18: Akım sitometri analizinde kullanılan markırlar	47
Şekil 19: BD Accuri™ C6 Akım sitometri cihazı.....	48
Şekil 20: Hücre ölümü analizleri için kullanılan boya ve solüsyonlar	49
Şekil 21: Hücre sayısı belirlenip kriyoviyalde saklanan MKH'ler.....	51
Şekil 22: 24 well plate içerisinde farklılık gösteren yapıları ve farklılık gösteren medyumları.....	52
Şekil 23: RNA izolasyon prosedürü	57
Şekil 24: PCR çalışma koşulları	59
Şekil 25: ACTB geni	60
Şekil 26: Aggreccan Geni.....	61
Şekil 27: Nanotek Arthur™ analiz sonucu örneği.....	62
Şekil 28: Canlı hücre sayısının deney gruplarında dağılımı.....	63

Şekil 29: Canlı hücre sayısının deney gruplarında logaritmik 10 tabanına göre dağılımı.	63
Şekil 30: Ölü hücre sayısının deney gruplarında dağılımı.....	64
Şekil 31: Ölü hücre sayısının deney gruplarında logaritmik 10 tabanına göre dağılımı	64
Şekil 32: Pasaj 0 Hipoksi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme.....	68
Şekil 33: Pasaj 0 Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme.....	68
Şekil 34: Pasaj 1 Hipoksi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme.....	69
Şekil 35: Pasaj 1 Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme.....	69
Şekil 36: Pasaj 3 Hipoksi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme.....	70
Şekil 37: Pasaj 3 Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme	70
Şekil 38: Pasaj 5 Hipoksi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme	71
Şekil 39: Pasaj 5 Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme	71
Şekil 40: Pasaj 4 Dondurulup çözülen hipoksik fotoğrafları. X4-10-40 büyütme.....	72
Şekil 41: Pasaj 4 Dondurulup çözülen Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme	72
Şekil 42: Pasaj 3 Hipoksik grubu akım sitometrik grafikler.....	73
Şekil 43: Pasaj 3 Normansi grubu akım sitometrik grafikler	73
Şekil 44: Dondurulmuş çözülmüş Hipoksi grubu akım sitometrik grafikler.....	74
Şekil 45: Dondurulmuş çözülmüş Normansi grubu akım sitometrik grafikler.....	74
Şekil 46: Deneyde kullanılan MKH'lerin katlanma süreleri	75
Şekil 47: Yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kıkırdak yapıya diferansiyasyonu. A. Hipoksi grubu B. Normansi grubu C. Dondurulmuş- Çözülmüş hipoksi grubu D. Dondurulmuş- Çözülmüş normansi grubu. Kıkırdak yönünde diferansiye olmuş MKH hücreleri Şekil 35'de gösterilmiştir.	76
Şekil 48: Alcian blue ve anti-Tip II kollojen boyama. A. Hipoksi grubu B. Normansi grubu C. Dondurulmuş- Çözülmüş hipoksi grubu D. Dondurulmuş- Çözülmüş normansi grubu.	77
Şekil 49: Agreccan Real-TİME PCR tayin Grafiği	79

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: MKH'ler tarafından salgılanan faktörler	18
Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar	36
Tablo 3: Çalışmada kullanılan lipoaspirasyon materyallerin elde edildiği hastaların demografik bilgileri.....	38
Tablo 4: Deney gruplarına uygulanan istatistiksel analiz	65



KISALTMALAR DİZİNİ

- CD:** Clusters of Differentiation
- Oct-4:** Octamer-binding Transcription Factor
- Sox:** Sry-box Containing Gene
- Factor HLA:** İnsan Lökosit Antijeni
- SVF:** Stromal Vascular Fraction
- CFU-F:** Fibroblast kolonisi oluşturan birim
- EKH:** Embriyonik kök hücre
- HKH:** Hematopoetik kök Hücre
- MKH:** Mezenkimal kök hücre
- Kİ-MKH:** Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal kök hücre
- AK-MKH:** Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal kök hücre
- YKH:** Yetişkin kök hücre
- EGF:** Epidermal Growth Factor
- VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor
- BMP:** Kemik morfojenik protein
- Shh:** Sonic Hedgehog
- bFGF:** basic Fibroblast Growth Factor
- HGF:** Hepatocyte Growth Factor
- TGF-β:** Transforming Growth Factor Beta
- G-CSF:** Granulocyte Colony Stimulating Factor
- AGM:** Aort gonad çıkıntısı mezonefroz
- GM-CSF:** Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
- IL:** İnterlökin
- RA:** Retinoik asit
- LIF:** Leukemia Inhibitory Factor
- TNF-α:** Tumor Necrosis Factor Alfa
- NK:** Naturel Killer
- MHC:** Major Histocompatibility Complex
- IGN-γ:** Interferon Gama
- STAT5:** Signal transducer and activator of transcription 5
- Ig:** İmmunoglobulin
- RTK:** Reseptör tirozin kinaz
- PI3K:** Fosfatidilinositol-3 kinaz

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-fosfat
MAP: Mitojenle active protein
GVHD: Graft Versus Host Hastalığı
aGVHD: Akut Graft Versus Host Hastalığı
F: Fosfat
LH: Lüteinleştirici Hormon
AKH: Adipoz Kökenli Kök Hücre
DMSO: Dimetilsülfoksit
FBS: Fetal Bovine Serum
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
PS: Phosphatidylserine
PBS: Phosphate buffered saline
D: Dilüsyon Faktörü
iPSC: İndüklenebilir Pluripotent
ALS: Amiyotrofik Lateral Skleroz
MS: Multiple Skleroz
OI: Osteogenesis Imperfecta

GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler, vücudumuzda bulunan tüm hücre, doku ve organların temelini oluşturmaktadır. Özelleşmemiş olan kök hücreler çok sayıda bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Bu hücreler özelleşmiş olan hücelere kaynak olabilir ve hasarlanmış olan dokuyu onarma yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Günümüzde kök hücrelerin kullanıldığı yeni tedavi yöntemlerini düzenlemeye yönelik çok sayıda araştırma dünyanın önde gelen pek çok araştırma kuruluşunda yürütülmektedir. Transplantasyon işleminde alıcının kendine nakledilen dokuları yabancı saymasını önlemek amacıyla immüsupresifler uygulanmaktadır. İmmüsupresyon, bağışıklık sisteminin çeşitli yöntemlerle baskılanması işlemidir. İmmüsupresyonda, antijen tanınarak T hücrelerinin antijeni tanınması, çoğalması, farklılaşması ve antikör yapımı işlevi baskılanmaktadır (1,2).

Kök hücre tabanlı tedaviler hastalara büyük umut vadetmektedir. Klinikte hematopoetik ve mezenkimal kök hücre uygulaması mevcutken embriyonik kök hücre uygulamasının yeri yoktur. Embriyonik kök hücreler immun redde neden olan HLA ekspresyonundan yoksun olmalarına rağmen etik ve politik nedenlerin yanı sıra in vivo teratom oluşturma riskinden dolayı kullanılmamaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) farklılaşma potansiyeli, embriyonik kök hücreler (ESC) ve indüklenebilir pluripotent kök hücreler (iPSC) gibi pluripotent kök hücelere kıyasla nispeten kısıtlı olmasına rağmen, nakledilen kök hücrenin in vivo teratom oluşturma riski açısından hücre tabanlı tedavide daha güvenilir bir kaynaktır (1). MKH'ler düşük immunreaktivite ve tümorojenite özellikleri yanında yüksek immüsupresif ve immunregülatör özellikler göstermeleri onları otolog ve allojenik tedavide kullanım için uygun birer kaynak haline getirmektedir (3,4,5).

Multipotent mezenkimal kök izolasyonunda asıl kaynak kemik iliği olmasına rağmen aspirasyon prosedürünün oldukça invaziv oluşu, farklılaşma ve dayanıklılık potansiyellerinin yaşla birlikte azalması alternatif kaynaklar geliştirmeyi gündeme getirmiştir (1). Otolog hücre tabanlı tedavilerde en fazla kullanılan mezenkimal kök hücre kaynakları; kemik iliği ve yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerdir. Benzer morfoloji ve immun fenotiplere sahip olmalarına rağmen, yağ dokusu daha yüksek konsantrasyonda MKH içermektedir (1,3,4).

İnsan adipoz dokusunun 1 gramı yaklaşık 1×10^6 adipoz kaynaklı MKH barındırmaktadır. 1 ml yağ dokusu aynı miktardaki kemik iliği ile karşılaştırıldığında 500 kat daha fazla kök hücre içerir (6). Kemik iliği aspirasyonu ile karşılaştırıldığında, yağ kaynaklı MKH'lerin lipoaspirasyon ve abdominoplasti gibi daha kolay yollarla elde edilebilmesi ve operasyon sonrası atık materyali olması düşünüldüğünde etik ve pratik anlamda daha uygun bir kaynaktır (4). Kriyoprezervasyon amacıyla en çok kullanılan hidroskopik polar bir bileşik olan DMSO'dır. Son yıllarda kullanılan trehaloz ise membran stabilizasyonunu sağlayarak dondurma sırasında koruyucu rol oynayan görece daha yeni bir kriyoprotektandır. Kimyasal ve doğal yapısı, dondurma esnasında koruyucusu camsı bir form almasını sağlar. Hücrede camsı matriks oluşumu, letal buz kristalleri potansiyelini inhibe ederek hücre hasarını minimal düzeye indirir (7).

Yapılan bu deneysel çalışmada; insan kaynaklı yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, ekspansiyonu, kriyoprezervasyonu ve izole edilen kök hücrelerin diferansiyasyon kapasiteleri araştırılmıştır. Bu konuda ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılmış çalışmalarda farklı izolasyon, ekspansiyon, kriyoprezervasyon ve diferansiyasyon yöntemleri kullanılmış olmasına rağmen hayvan kaynaklı serum içermeyen otolog serum ve hipoksik kültür koşullarında yapılmış bir çalışmanın olmaması araştırmanın özgünlüğüdür.

Güncel literatürler incelendiğinde yağ dokunun yumuşak doku defektlerinin tamirinde otolog kullanım potansiyelinin yüksek olduğu, bununla beraber dokunun ve içerdiği kök hücrelerin farklı izolasyon, çoğaltma, saklama koşulları üzerine yöntemleri kullanarak etkinliği incelenmiş olsa da çalışma sayısının azlığı, birbirine zıt sonuçların elde edilmesi ve henüz dünya genelinde bu konuda kliniğe uygun etkin ve verimli bir standardın oluşturulamamış olması çalışmanın diğer gerekçesini oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; yağ doku kaynaklı MKH'de otolog serum kullanılması, bununla ilgili protokollerin geliştirilmesi, hipoksik ortam ve otolog serum etkilerinin proliferasyon, kriyoprezervasyon ve farklılaşma üzerine etkilerinin incelenmesidir. Bu şekilde standardize edilmiş MKH'lerin; dondurma çözme sonrası verilerin de inceleneceği çalışma; her basamakta hastanın kendi kanından elde edilen serum kullanılarak insan yağ dokusu hücreleri fizyolojisine uygun olan hipoksik kültür tekniği standardizasyonun yapılacak olması hücre bankacılığı açısından ele

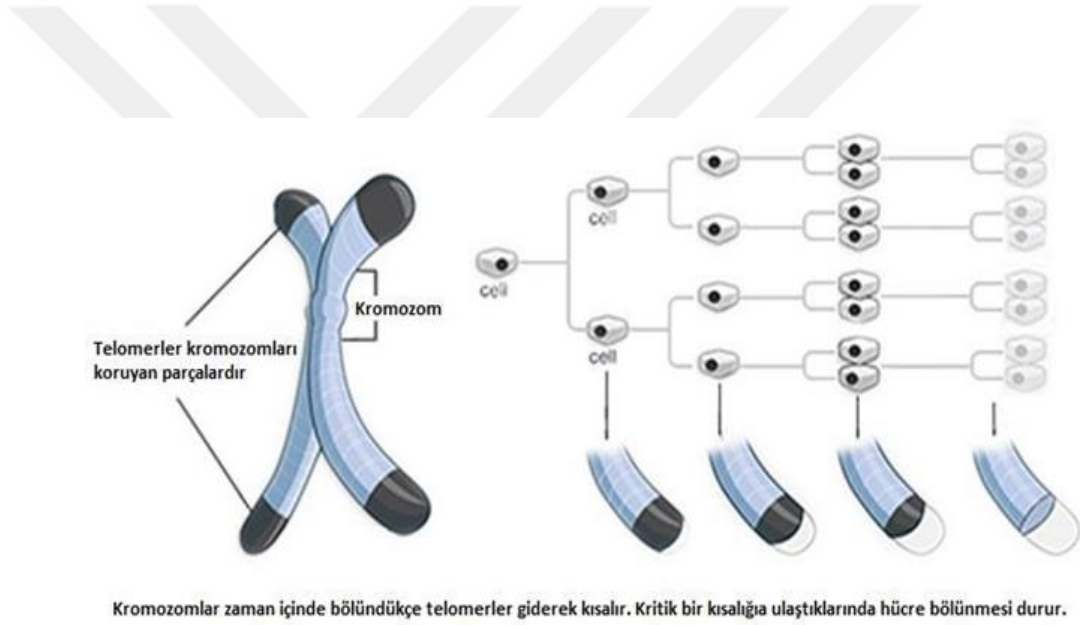
alındığında alternatif bir kaynak olarak düşünölmektedir. Bu çalışmayla birlikte bugüne kadar hipoksik kültür ortamında yağ doku kaynaklı MKH ile ilgili mevcut bilgilere otolog serum uygulaması eklenerek konuda genişleme, yenileme ve iyileştirme oluşturulacağı aynı zamanda standart bir protokol geliştirilip ileride *in vivo* çalışmalarla desteklenerek klinikte kullanıma ışık tutacağı düşünölmektedir.



GENEL BİLGİLER

1.1. Kök Hücreler

Vücudumuzdaki tüm hücelere ana kaynak olan kök hücreler; çok sayıda bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme özelliğine sahip, özelleşmemiş ancak özelleşmiş hücelere kaynaklık edebilen ve hasarlanmış olan dokuyu tekrar oluşturup eski fonksiyonunu kazanmasını sağlayan hücrelerdir. Günümüzde kök hücrelerin kullanıldığı yeni tedavi yöntemlerini düzenlemeye yönelik çok sayıda araştırma dünyanın önde gelen pek çok araştırma kuruluşunda yürütülmektedir (3).



Şekil 1: Telomerlerin her hücre bölünmesinde kısalır

1.2. Kök Hücrenin Genel Özellikleri

İşlevsel olarak diferansiye olmamış, köken olarak değişik karakterlere dönüşebilmeye hazır olan kök hücreler temelde üç özellik ile tanımlanabilir.

1.2.1. Self-renewal (Kendini yenileyebilme)

Kök hücreler köklülük yeteneklerini koruyacak şekilde diferansiye olmadan çoğalarak kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Bölünen hücreler iki adet farklılaşacak hücreyi oluşturabileceği gibi iki adet kök hücreyi de meydana getirebilir ki buna “simetrik bölünme” denir. Biri kök hücre olarak devam ederken diğeri progenitor hücre olabilir, bu durumda “asimetrik hücre bölünmesi” olarak tanımlanır. Hücrelerin kaderi iç ve dış faktörlerle belirlenir. Hücrenin ne olacağını belirleyen bu faktörler; hücre dışı matris bileşenleri, hücre- hücre teması, adezyon molekülleri, niş (mikroçevre), sinyal yolları, sitokinler, çeşitli büyüme faktörleri, simetrik ve asimetrik hücre bölünmesi olarak sıralanabilir (8).

Hücre kaderinin (cell-fate) belirlenmesinde en önemli mekanizma asimetrik hücre bölünmesidir. İç ve dış faktörlerle belirlenen asimetrik hücre bölünmesinin gerçekleşebilmesi için ilk şart hücre kutuplaşmasıdır. Dış sinyaller; kök hücre ve niş arasındaki iletişim sayesinde gerçekleşir. Yapısal proteinler ve moleküller hücrede eşit olmayan şekilde konumlanmıştırlar (8,9).

Sitoplazmada protein dağılımı da homojen değildir, hücrenin bazal ve apikali farklı proteinleri ihtiva edebilir. Kök hücrelerde asimetrik hücre bölünmesi “spektozom” olarak isimlendirilen cisimcik tarafından sağlanır. Bölünme mekiği bu özgül proteinlerin olduğu tarafa doğru hareket eder ve bu yönlendirmede zonula adherens bağlantı kompleksinin ilişki kurduğu aktinlere bağlanan E-kaderin etkilidir. İç sinyallerde ise hücreler başka bir hücreyle temas halinde ya da bağlantılı değildir. Bu durumda sitoplazmik kutuplaşma pek beklenemez. Bölünme mekiği kutuplaşmasını bir önceki bölünmeye göre yapar, mekiği bir önceki nişin neden olduğu bilgiye göre konumlanır (8,9,10,11).

1.2.2. Plastisite (Farklılaşma)

Kendisine özgü programlar ya da gen ifadesinin yönlendirilmesiyle gerçekleşen fonksiyonel olarak erişkin bir hücre olana kadar gerçekleşen biyokimyasal ve fenotipik aşamaların tamamı farklılaşma olarak tanımlanır. Farklılaşmayı kontrol eden birçok etken vardır. Asimetrik hücre bölünmesi, büyüme ve farklılaşma faktörleri, hücrenin

kararlanma aşamaları, sitoplazmik farklılıklar, morfogenerler, gen metilasyonları, histonlar, homeotik genler, hücreler arası bağlantı kompleksleri, hücre dışı matriks proteinleri, sinyal yolları ve epigenetik faktörlerin tümünün toplu olarak etkisiyle meydana gelir (8).

Farklılaşmanın belirlendiği ilk yer, hücrenin blastosist döneminde geçirdiği trofoblast ya da iç hücre kitlesini oluşturduğu kararlanma aşamadır. Bu kararda niş, sitoplazmik özgün proteinlerin kutuplaşma bölgeleri ve asimetrik bölünme etkili iken ikinci kararlanma aşaması, 16-32 blastomerli evrede iç hücre kitlesinin epiblast ya da hipoblast olma kararıdır. Bu karar aşamasında Oct4, Sox2, Nanog gibi transkripsiyon faktörleri etkilidir. Hücre epiblast olarak ileride ektoderm, mezoderm ve endoderm olan üç germ yaprağını, trofoblast olarak plasentaya ait kısımları ve hipoblast olarak vitellus kesesini oluşturabilme yeteneğine sahiptir (8,9,10,11).

Eşey hücreleri dışındaki tüm hücrelerin genomu aynıdır. Hücreler birbirinden gen ifadesi mekanizmasıyla ayrılır. Epigenetik kontrol sistemi, farklılaşma üzerindeki en belirleyici noktadır. DNA ve histon metilasyonu, kök hücrenin progenitor ya da özelleşmiş hücre seçimini etkiler. DNA metiltransferazlar aracılığıyla Oct4 ve Sox2 gibi genler metillenerek promotor kısımları bağlanır ve hücre farklılaşma periyoduna girer. DNA metilasyonu ile köklüğünün devamını sağlayan genlerin ifadesi azalarak hücrede heterokromatin bölgeler artarken ökromatin alanlar azalır. Sinyal yollarının da farklılaşma üzerine etkileri vardır. JAK/STAT, Wnt, β -Katenin, Mapk-ERK, Delta/Notch yolları, TGF- β , Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Retinoik Asit (RA), Lösemi inhibitör faktör (LIF), Kemik morfogenetik protein (BMP) büyüme faktörleri ve sitokinler, Sonic Hedgehog (SHH) gibi morfogenerler etkilidir. TGF- β ve FGF gibi büyüme faktörleri bir ligand gibi reseptöre bağlanarak onun tirozin kinaz etkinliği kazanmasına neden olur. Reseptör tirozin kinaz aracılığı ile fosforile olan bazı sitoplazmik proteinlere transkripsiyon faktörleri bağlanarak hücre farklılaşmaya gider (12).

1.2.3. Pluripotensi (Köklülük)

Kök hücrelerin diğer hücrelerden ayırt edilmesini sağlayan hücresel ve moleküler özelliklerini tanımlamak için pluripotensi kavramı kullanılmaktadır. Hücrelerin yüzeyinde yer alan belirteçler veya hücre- hücre yapışma molekülleri kullanılarak kök hücre tipi belirlenebilmektedir. Bu belirteçlerden birçoğu farklılaşma kümeleri (clusters of differentiation, CD) olarak bir başlık altında toplanmıştır. Ektoderm, endoderm ve mezoderm tabakalarına ve bu üç germ yaprağının türevlerine farklılaşabilme kabiliyetine köklülük denir. Pluripotensi; transkripsiyon faktörleri, kromatin düzenleyiciler, bazı proteinler ve epigenetik mekanizmalar gibi iç faktörler ile hücre - hücre teması, reseptör - ligand etkileşimleri, sitokinler, büyüme faktörleri ve çok sayıda sinyal iletim mekanizmaları gibi dış faktörlerin dengesiyle sağlanır ve korunur (13,14).

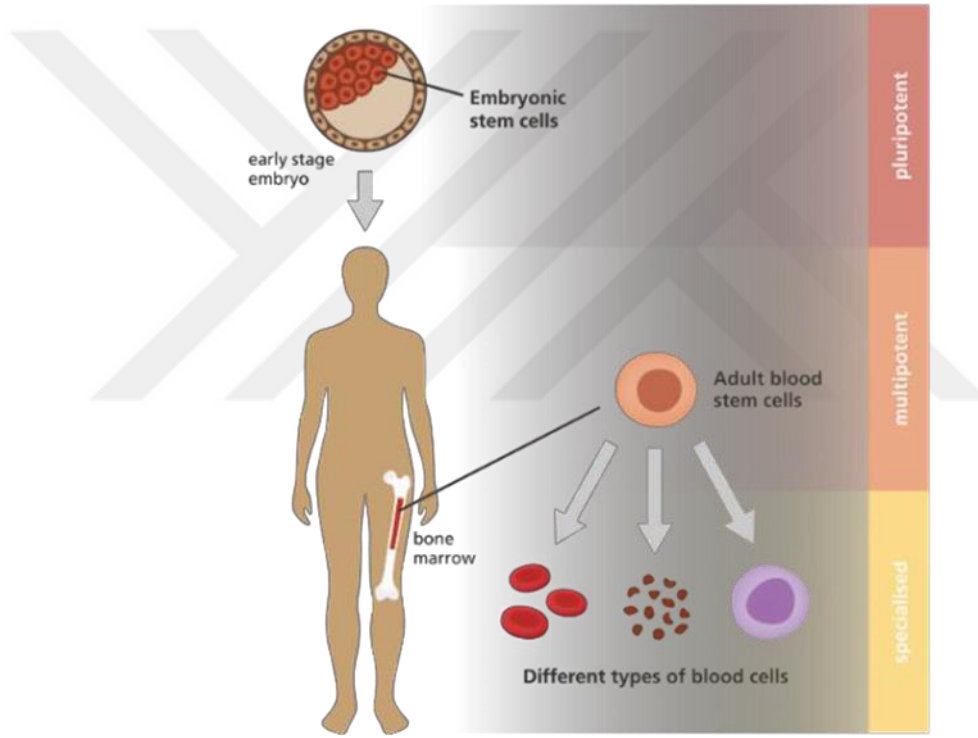
1.3. Kök Hücrelerin Türlerine Göre Sınıflandırılması

Kök hücreler türlerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılırlar.

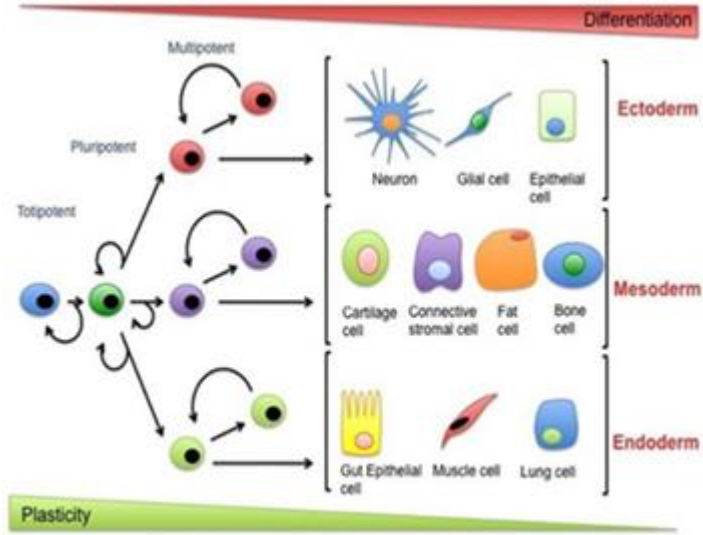
Totipotent kök hücreler; ovosit ve spermin birleşip kaynaşması anlamına gelen fertilizasyondan sonra 4- 8 blastomerli evreye kadar olan bütün blastomerler totipotent özelliktedir. Totus - Tam, bölünmemiş; Potentia - Güç; Totipotent hücre ise her şeyi yapabilen anlamına gelir, bir birey oluşturabilir. Erken embriyonik dönemdeki bu blastomerler, embriyo ve embriyo dışı tüm yapıları oluşturabilir, embriyo dışı membran ve organlara kaynaklık edebilirler (8,10).

Pluripotent kök hücreler; Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Pre-implantasyonun 5. gününde totipotent hücreler içi sıvı dolu bir kitleye “Blastosist” farklılaşırlar. Blastosist; blastosöl boşluğu, trofoblast ve iç hücre kitlesini yani embriyoblastı içerir. Trofoblast vitellus kesesini, embriyoblasttan ise doku ve organlara kaynaklık eden ektoderm, mezoderm ve endodermi meydana getirecek yaklaşık 250 çeşit hücre gelişir. Bu hücrelere **embriyonik kök hücre (EKH)** denir. Fakat totipotent kök hücre gibi kendi başına bir birey oluşturamaz (8,10).

Multipotent kök hücreler; Erişkin tip kök hücrelerdir, farklılaşma yetileri daha az olan bu kök hücre tipi bulunduğu dokunun özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebilir. Üst üste farklılaşma geçiren pluripotent kök hücreler zamanla özelleşmiş erişkin hücrelere dönüşürler. Farklanmamış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış erişkin kök hücreler aldıkları sinyallerle özelleşmiş hücrelere dönüşebilirler **oligopotent kök hücreler** olarak, tek bir hücre tipine farklılaşabilen kök hücreler **unipotent kök hücre** olarak sınıflandırılır (10).



Şekil 2: Kök Hücre Tipleri



Şekil 3: Kök hücre tipleri ve germ yaprakları

1.4. Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynağa Göre Sınıflandırılması

Kök hücreler temelde elde edildikleri kaynağa göre embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak ikiye ayrılırlar. Embriyonik kök hücreler, embriyonun erken gelişim sürecinde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir. Embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler ise; erişkin kök hücreler, fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, göbek kordonu ve plasenta kök hücreleridir (9).

1.4.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Blastokist aşamasındaki embriyonun (4-5 günlük) iç hücre kitlesinde yer alan, pluripotent karakterde yani gelişim sırasında embriyoya ait 3 germ tabakasına (endoderm, mezoderm, ektoderm) ve bu tabakalardan köken alan farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetkinliğinde olan farklılaşmadan çoğalabilme özelliğine sahip olan hücrelerdir (9,15). Kendini yenileme, hayatta kalma ve farklılaşmada farklı sinyal yolları, proteinler ve transkripsiyon faktörleri, hücre- hücre etkileşimleri, parakrin

ve otokrin faktörler, epigenetik mekanizmalar ve reseptör ligand etkileşimleri gibi iç ve dış etkenler rol oynar.

EKH kendini yenilerken diferansiye olmaması için farklılaşma inhibisyonu gereklidir. Farklılaşmadan çoğalmadaki en önemli mekanizma protein glukoprotein 130 (gp130) üzerinden gerçekleşen LIF / JAK / STAT3 yolaklarının mekanizmasıdır.

EKH'ler farklılaşmadan sınırsız bölünebilme kapasitesindedir ancak in vitro koşullarda farklılaşmadan çoğalmaları için uygun kültür ortamının sağlanması gereklidir. EKH'lerin tedavide kullanımında en son nokta uygun besi ortamı ve kültür şartları sağlandığında, indüklenerek farklılaşmasının istenilen yönde kontrol edilebiliyor olmasıdır. Fakat klinik açıdan bakıldığında EKH'lerin kullanımı, tümör oluşturma riskini akla getirir (9,16).

EKH'lerin yüzey belirteçleri; telomeraz aktivitesi çok yüksek olan alkalen fosfataz, hücre yüzeyinde bulunan glukoprotein SSEA 3 ve 4, hücre dışı matriks proteini TRA-1-60 ve 81, CD 81, hücre göçünde etkili osteopontin, CD 30, CD 9, CD 29, E-kaderindir. Oct-4, Sox-2, STAT3, Nanog ve c-Myc gibi transkripsiyon faktörlerine sahiptir. Telomeraz enzim aktivitesi yüksek olan EKH'lerin kontrolsüz çoğalmayla tümör oluşturma riskinden dolayı. Birçok ülkede etik, dinsel ve politik sorunlar nedeniyle kullanımı sınırlandırılmıştır. Ülkemizde, 2005 yılı Eylül ayında sağlık bakanlığı genelgesiyle insan EKH'leri ile yapılan her türlü uygulama ve araştırma durdurulmuştur (17).

1.4.2. Erişkin Kök Hücreler (Embriyonik olmayan kök hücreler)

Hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler üzerinde en çok çalışılan kök hücreleri tipleri olup multipotent özellikte olan yetişkin kök hücreler sınıfına girerler. Kas ve iskelet sistemi, kalp ve damar sistemi, sinir sistemi, sindirim sistemi, epitel doku, testis ve ovaryum kök hücreleri unipotent özellikteki diğer yetişkin kök hücrelerdir (9).

1.4.2.1. Hematopoetik Kök Hücreler

HKH'ler nişi çeşitli ve karmaşık olan, rejeneratif ve reperatif tıpta kullanımı olan multipotent kök hücrelerdir. Asimetrik hücre bölünmesi geçirecek yeni bir kök hücre üretebilecek self-renewal özelliğine sahip olduğu gibi türlerine de farklılaşabilirler. Yanı sıra plastisite, homing ve mobilizasyon özellikleri vardır. Hematopoetik kök hücreler hematopoezle oluşurlar. İlk olarak vitellus kesesinde, aort gonad çıkıntısı mezonefroz (AGM) bölgesinde hemingiosblastlardan köken alırlar. Hemingiosblastlar; HKH ya da anjiyopoetik (endoteliyal) progenitörleridir. 5. haftanın ortalarında fetüs karaciğer ve dalağına gelen hücreler lenfoid ve miyoloid hücre serilerine dönüşerek çoğalırlar. 12. haftada kemik iliğine mobilizasyonla dokuya yerleşirler. HKH'lerin karaciğerden kemik iliğine yerleşmesinde CXCL12, c-kit, integrin α , E- kadherin ve angiopoetin etkilidir. HKH mikroçevresi tanımlanması ile gelişmenin kök hücre ile çevresi arasındaki etkileşim ile dengede olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Wnt, Notch, kemik morfojenik protein, sonic hedgehog ve fibroblast büyüme faktörü'nün HKH hücre farklılaşmasını kontrol ettiği gösterilmiştir (18,19).

İnsan hematopoetik kök hücreleri belirteçleri; Lin, CD34, CD38, CD43, CD45, CD59, CD90, CD109, CD117, CD133, CD166 ve HLA-DR' dir. Klinikte temel olarak CD34 pozitif CD90 pozitif kombinasyonu kullanılmaktadır (20,21).

HKH kaynakları; Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetal karaciğerdir. Her bir kaynağın kendi içinde avantajları ve dezavantajları olduğu gibi, birbirlerine göre de avantaj ve dezavantajları vardır. Bu kapsamda kaynak olarak birine diğerinden daha iyi dir demek doğru değildir. Fakat günümüze kadar yapılmış çalışma sayısı ve nakil deneyimleri dikkate alınacak olursa kemik iliği HKK'leri daha öndedir (8,9,22). Çoğunluğu kemik iliğinde bulunan HKH'lerin sitokinler aracılığıyla periferik kana mobilizasyonlarının sağlanabiliyor olması daha non invaziv oluşundan ötürü mobilize periferik kan kök hücreleri olarak kullanılmaktadır. Günümüzde hematopoetik kök hücre nakli malignensi, kemik iliği ve immün rahatsızlıklar gibi hastalıkların tedavisinde başarı ile uygulanmaktadır (23).

HKH kaynağı olarak diğer seçenek kordon kanıdır. Kordon kanı içerisinde eritrosit, lenfosit, lökosit ve trombosit gibi kan hücrelerinin yanında yüksek yoğunlukta kök

hücreler bulunmaktadır (24). Kordon kanı kök hücreleri, kemik iliği ve periferik kandan izole edilen kök hücrelerle kıyaslandığında daha uzun telomerlere ve daha yüksek çoğalma kapasitesine sahip ve daha naif hücrelerdir. Bununla birlikte CD34 pozitif eksprese eden hücre sayıları kemik iliğine kıyasla üç kat daha fazladır. Kordon kanı CD34+ hücreleri yetişkin progenitör hücrelere göre daha fazla migratör aktivite göstermektedir (23,25,26).

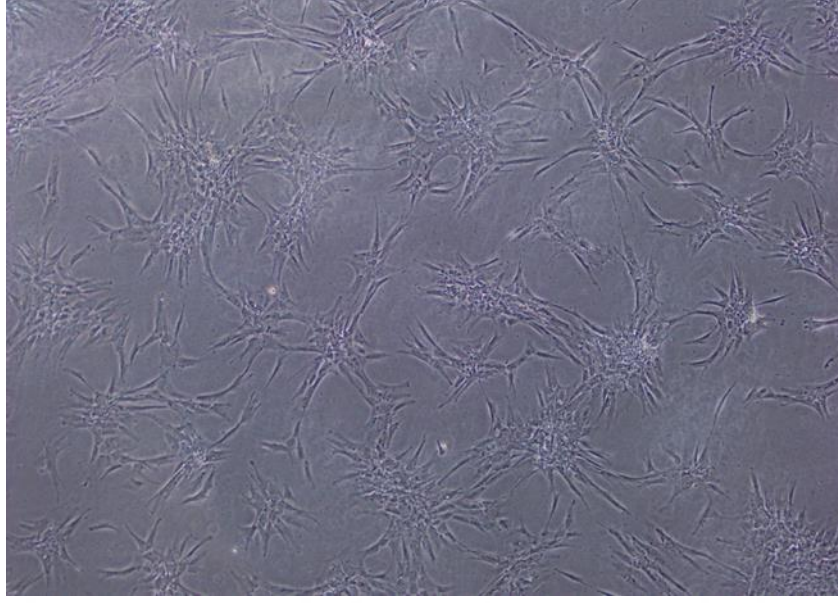
1.4.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tarihçesi ve Tanımı

Hematopoietik olmayan kök hücrelerin varlığı ileri Alman patolog Cohnheim tarafından ilk kez 130 yıl önce ileri sürülmüştür. Cohnheim'in gözlemleri, bu hücrelerin fibroblast-benzeri morfolojiye sahip olduğunu göstermiş ve kemik iliğinin yara iyileşmesi sürecinde rol alan fibroblastların kaynağı olabileceğini gündeme getirmiştir (27).

Friedenstein ve arkadaşları, 60'lı yılların sonunda bu hücreleri kemik iliğinden elde edilen fibroblast-benzeri hücreler olması ve kültür ortamında iğ şeklinde olup koloni oluşturma özelliğine sahip olması nedeniyle fibroblast kolonisi oluşturan birim (CFU-F) olarak tanımlanmıştır. *In vivo* ve *in vitro* da hızla çoğalmaya başlayan bu hücrelerin diğer mezenkimal hücrelere dönüşebildiği ve plastik kültür kabına yapıştıkları rapor edilmiştir. Friedenstein ve ark., 1972 yılında bu hücrelerin sadece kemik iliğinde olmayıp, timus ve diğer limfoid organlarda da var olduğunu göstermişlerdir (27,28,29).

Arnold Caplan, 90' lı yılların başında bu hücrelerin adiposit, kondrosit ve osteosit gibi mezenşim kökenli diğer hücre tiplerine dönüşebilme özelliği nedeniyle ilk kez 'mezenkimal kök hücre' terimini kullanmıştır (30).

Mezenkimal kök hücreler; Kemik iliği, adipoz doku, kordon, kordon kanı, karaciğer, beyin, diş pulpası, deri ve fetal dokularda bulunan farklılaşmamış, yüksek proliferatif kapasitede kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip, mezodermal farklılaşma yetisi çok yüksek olan kök hücrelerdir (1,2).

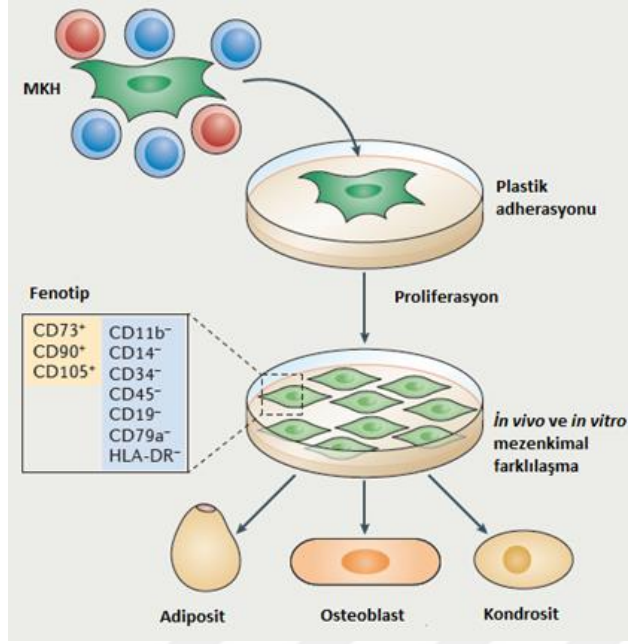


Şekil 4: Mezenkimal kök hücrenin birinci pasaj görüntüsü

2006 yılında ISCT (Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği) MKH tanımlanmasında standardizasyon sağlamak amacıyla minimal kriterler belirlemiştir.

Buna göre MKH'ler;

1. Standart kültür koşullarında plastik kültür kabı yüzeyine yapışmalıdır (adezyon).
2. CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerini yüksek düzeyde (>%95) ifade ederken, CD45, CD34, CD14 / CD11b, CD79a / CD19 ve HLA-DR gibi diğer hücrelere ait olabilecek yüzey belirteçlerini (<%2) ifade etmemelidir.
3. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine dönüşebilmelidir (31).



Şekil 5: Mezenkimal kök hücre olarak tanımlanma kriterleri (32)

Mezenkimal kök hücrelerin nitelikleri ve fenotipleri hakkında son yirmi yılda çok sayıda araştırma yapılmıştır. 2019 yılında yapılan bir araştırma itibariyle “Mezenkimal kök hücre” terimi için 3790000 internet araması kaydı bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin biyolojik özellikleri konusunda daha fazla detay keşfedilip incelendiğinde, bu hücrelerin gerçek bir kök hücre ölçütünü karşılayıp karşılamadığı sorusu ortaya çıkmıştır (34).

Bir hücrenin kök hücre olarak nitelendirilebilmesi için, bu hücrelerin, simetrik hücre bölünmesiyle, kendisiyle aynı kök hücre özelliklerine sahip iki yavru hücre üretmesi için kendini yenilemesi gerekir. Aynı zamanda, asimetrik hücre bölünmesi veya spesifik aktivasyondan sonra, olgun progenitör hücreler ya da farklılaşmış efektör hücreler oluşturabilmelidir. MKH’ler bu farklılaşma kapasitelerini sergilerler ve bu sebeple multipotent progenitör hücreler olarak nitelendirilirler. Günümüzde uzmanlar, MKH’lerin uygun stimülasyonla osteoblast, kondrosit, tendinosit, adiposit, düz kas hücresi ve kemik iliğinin stromal hücresi de dâhil olmak üzere oldukça farklı olgun hücreleri üretebileceği konusunda fikir birliğine ulaşmışlardır (35,36).

MKH’ler, buldukları dokuları oluşturan hücrelere farklılaşabilme ve onlara spesifik olan kendilerini yenileyebilme kapasiteleri bakımından hücre tabanlı tedaviler için

potansiyel birer hücre kaynağı olarak umut vaat etmektedirler. Bu hücreler, hastanın kendisinden elde edilebildiği için allojenik nakillerde oluşabilen dokunun immün reddiyle ilgili komplikasyonları ortadan kaldırmaktadırlar. Farklılaşmamış hücreler olan MKH' ler, mezodermal farklılaşabilme potansiyeline ve hızlı çoğalma kapasitesine sahip olduklarından dolayı yetişkin dokularda bulunan MKH' ler klinik uygulamalarda doku hasarlarının rejenerasyonu için tercih edilen bir kök hücre kaynağı olmaktadır. Yetişkin dokularda bulunan bu hücreler kök hücre popülasyonu olarak izole edilebilip uygun kültür şartlarında çoğaltılabilmektedir. Adiposit, osteosit ve kondrositlere kolayca farklılaşabilmekle birlikte kültür ortamında embriyonik veya hematopoetik hücreleri destekleyebilmektedirler. Bununla birlikte endotel, nöral, düz kas, iskelet miyoblastları ve kardiyak miyosit hücrelerinin de fenotipik özelliklerini ifade edebildiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (37,38).

1.4.2.3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Mezenkimal kök hücreler; Kemik iliği, adipoz doku, kordon, kordon kanı, karaciğer, beyin, diş pulpası, deri ve fetal dokularda bulunan farklılaşmamış, yüksek proliferatif kapasitede kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip mezodermal farklılaşma yetisi çok yüksek olan kök hücrelerdir. Multipotent mezenkimal kök hücrelerin asıl kaynağı kemik iliği olmasıyla birlikte kemik iliği aspirasyonunun oldukça invaziv oluşu, farklılaşma ve dayanıklılık potansiyellerinin yaşla birlikte azalması alternatif kaynaklar geliştirmeyi gündeme getirmiştir (1,2).

Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, kas gibi farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanında ürettikleri birçok büyüme faktörü ve sitokinler nedeni ile immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline sahiptir. Bu özellikleriyle 1990 yılından beri klinikte kullanılabilirlikleriyle ilgili pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Literatür taraması yapıldığında bu amaçla kullanılan mezenkimal kök hücre kaynaklarının yoğunluklu olarak kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı olduğu görülmektedir. Kordon kanı, kemik iliği ve adipoz doku mezenkimal kök hücrelerinin karşılaştırmalı olarak çalışıldığı yayınlar mevcuttur. Koloni oluşturma kapasitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada en yüksek kapasite adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler, onu takiben kemik iliği ve en düşük kapasite de kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinde

bulunmuştur. İzolasyon başarı oranlarına bakılan aynı çalışmada kemik iliği ve yağ kaynaklı olanlar %100' e yakın iken, kordon kanından izole edilen MKH' ler de başarı oranları maksimum %30-38 olarak gösterilmiştir (1,39).

Mezenkimal stromal hücreler, kemik iliği, yağ dokusu, iç organlar ve kan damarları ve amniyotik sıvı, amniyon zarı, göbek kordonu veya plasenta gibi “genç kaynaklar” dâhil olmak üzere birçok farklı yetişkin dokulardan da izole edilmiş ve tanımlanmıştır (33). Kemik iliği dışındaki dokulardan izole edilen MKH'lerin de aynı özellikleri paylaştığı ve *in vitro* uyarımla osteoblastlar, kondrositler ve adipositlere dönüşebildiğini gösteren çok sayıda deneysel kanıt vardır. Bununla birlikte, şimdiye kadar, herhangi bir kaynaktan alınan MKH preparatlarının, ektopik bölgelere transplantasyondan sonra kendiliğinden yağ veya kıkırdak üreten progenitör hücreleri içerdiği konusunda deneysel bir kanıt yoktur (40,41,42,43).

Bu çalışmada kullanılan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler memeli türlerinde embriyonik gelişim evresinde mezoderm tabakasından kökenlenmektedir (15). Yağ dokusunun damarlı bölgesinin stromasından (stromal vascular fraction, SVF) yağ hücrelerinin uzaklaştırılmasıyla elde edilmektedirler. Yağ dokusu kaynaklı MKH'ler *in vitro* ortamda sayılarını iki katına çıkarma süreleri kültür ortamına ve pasaj sayılarına bağlı olarak 2 ile 4 gün arasında değişmektedir. İzole edilen yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çoğalabilme kapasitelerine vericinin yaşı, cinsiyeti, yağ dokusunun alındığı bölge, alınma şekline göre farklılıklar gösterebilmektedir (44). Dondurma- çözdürme işlemi uygulanan adipoz dokudan izole edilen MKH'ler bu işlemlere rağmen multipotensi özelliğini kaybetmezler. Yapılan çalışmalarda adiposit, osteoblast, kondrosit serisi dışında hepatosit, iskelet, kalp ve düz kas, endotel, hematopoetik, nöral ve epitel hücrelere de farklılaşabildiği gösterilmiştir (45). Sayıca fazla olmaları, izolasyonlarının, kültürasyonlarının ve çoğalmalarının kolay oluşuyla birlikte mezodermden köken alan diğer doku tiplerine farklılaşabilmeleri nedeniyle çeşitli klinik uygulamalarda kullanılabilirler (46).

1.4.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerden Salınan Faktörler ve Fenotipleri

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu genellikle yüzey belirteçleri ile karakterize edilir. MKH'ler için pozitif yüzey belirteçlerinden bazıları CD44, CD71, CD90 ve CD105'tir. Karakterizasyon için sık kullanılan negatif yüzey belirteçleri ise CD34, CD45, CD104 ve CD106'dır. Yüzey belirteçlerin iki farklı metot ile belirlenir (47). Fakat MKH'leri türevlerinden ayırmak için hücre yüzey belirteçlerini tek başına kullanılmak doğru olmaz, bunu desteklemek için mutlaka tek bir kök hücrenin çok sayıda kök hücre oluşturma potansiyeli (klonite) ve *in vitro* farklı hücrelere dönüşebilme potansiyelinin de değerlendirilmesi gereklidir. MKH'ler elde edildiği kaynağa göre farklı çoğalma ve farklılaşma kapasitesi gösterirler. Bu durum hücrelerin heterojen bir popülasyondan oluştuğunu göstermektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler karakterize edilirken spesifik hücre yüzey belirteçlerinin ifadesine bakılmaktadır. İnsan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin (Kİ-MKH) belirlenmesinde CD29, CD73 (SH-3 ve SH-4), CD90, CD105, CD44, CD106 (VCAM-1), CD166, CD117 (zayıf), STRO-1, Sca-1, L-selektin, ICAM-1 pozitif belirteç olarak kullanılırken, hematopoietik ve endotelial hücreler için spesifik olan CD14, CD31, CD34, CD45, CD144, E-selektin negatif belirteç olarak kullanılmaktadır Yağ dokusu ve kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücrelere bakıldığında ise bu hücrelerin Kİ-MKH'lerine oldukça benzer yüzey belirteçleri (pozitif olarak CD73, CD90, CD105, CD29, CD166, CD44 ve negatif olarak CD14, CD31, CD34, CD45) ile karakterize edildiği ancak bazı yüzey belirteçleri açısından farklılıklar içerdiği belirtilmiştir (39,48). Kendini yenileyen, çoğalan ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip olan MKH'ler çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve hücre dışı matris proteinlerini salgılamaktadır. İşlevlerini yerine getirebilmek için bu faktörlerin sentezlenmesine ve regüle edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yağ doku kaynaklı kök hücreler yüksek oranda epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) salgılamaktadırlar. Aynı zamanda Flt-3 (Fms benzeri tirozin kinaz 3) ligand, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), granülosit/makrofaj koloni stimüle edici faktör

(GM-CSF), interlökin-6 (IL-6), interlökin-7 (IL-7), interlökin-8 (IL-8), interlökin-11 (IL-11), interlökin-12 (IL-12), lökemia inhibitör faktörü (LIF) ve tümör nekrozis faktörü alfa (TNF- α) gibi sitokinleri salgırlar. Tablo-1 de MKH'ler tarafından salgılanan faktörleri ve kısaca işlevlerini göstermektedir.

Tablo 1: MKH'ler tarafından salgılanan faktörler (15)

	Salgılanan faktörler	İşlevleri
Proanjyogenezi uyarıcılar	Fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2)	Düz kas ve endotel hücrelerin çoğalmasını uyarır.
	Fibroblast büyüme faktörü-7 (FGF-7)	Endotel hücrelerin çoğalmasını uyarır.
	Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)	Anjiyogenezi uyarır, monositleri çağırır.
	Kan plaketi kökenli büyüme faktörü (PDGF)	Düz kas hücrelerinin çoğalmasını uyarır.
	Plasenta kaynaklı büyüme faktörü (PGF)	Anjiyogenezi uyarır.
	Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF β)	Damarların büyüme ve olgunlaşmasını uyarır.
	Vasküler endotel büyüme faktörü- A/B (VEGF)	Endotel hücrelerin çoğalmasını uyarır.
Hücre dışı matriksi şekillendiriciler	Metalloproteinaz-1 (MMP1)	Matriksi gevşetir, tübül oluşumunu uyarır.
	Metalloproteinaz-2 (MMP2)	Matriksi gevşetir, tübül oluşumunu uyarır.
	Metalloproteinaz-9 (MMP9)	Matriksi gevşetir.
	Plazminojen aktivatörü (PA)	Matriks moleküllerini parçalar.
	Tümör nekroze edici faktör- α (TNF α)	Matriks moleküllerini parçalar, hücre çoğalmasını uyarır.
Kök hücreleri çoğaltıcılar	Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	Düz kas ve endotel hücrelerinin çoğalmasını artırır.
	Granülosit kolonisi uyandıran faktör (G-CSF)	Nötrofillerin çoğalmasını ve farklılaşmasını artırır.
	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF1)	Hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenler, apoptozisi engeller.
	Makrofaj kolonisi uyandıran faktör (M-CSF)	Monositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını artırır.
	Timosin- β 4 (T β 4)	Hücre göçünü uyarır.
	Stroma kökenli faktör (SDF)	Öncü hücrelerin yerleşmesini artırır.
İmmüdüzenleyiciler	Hem oksijenaz (HO1)	T hücreleri çoğalmasını engeller.
	Hepatosit büyüme faktörü (HGF)	CD4+ T hücreleri çoğalmasını engeller.
	İndolamin 2,3-dioksijenaz (IDO)	Doğal ve kazanılmış immün hücrelerin çoğalmasını engeller.
	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS)	İnflamasyonu engeller.
	İnterlökin-6 (IL-6)	İnflamasyonu düzenler, VEGF'ı uyarır.

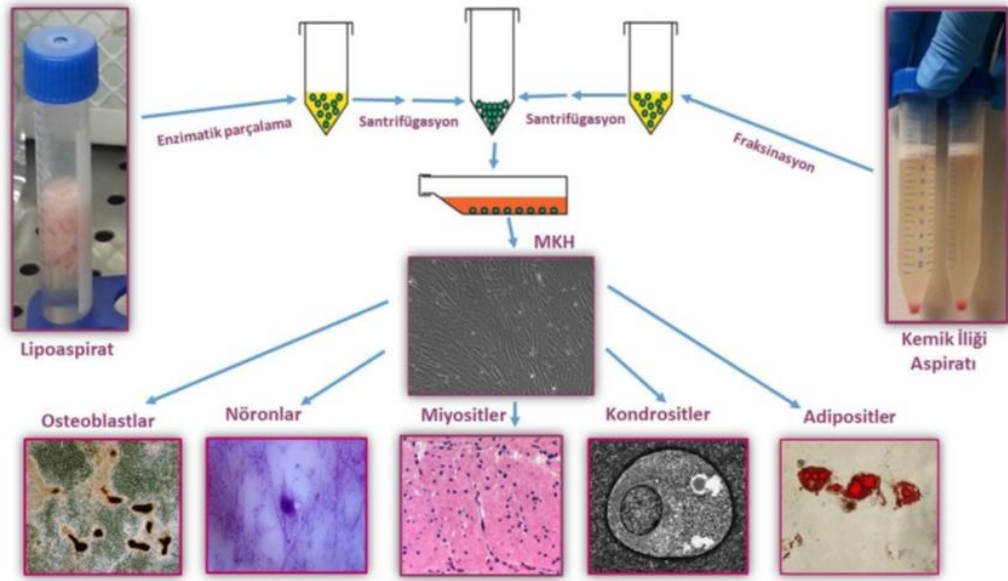
1.4.2.5. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Mikroçevresi

MKH'ler son zamanlarda rejeneratif tıp ve hücre tabanlı tedavi aracı olarak kullanılmaktadır. Fakat *ex vivo* transplantasyon sırasında mikroçevreden kaynaklanan hücresel dejenerasyonlar nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. Tranfer edilen MKH ölümlerine ve terapötik hatalara; besin, oksijen kaynağı gibi iskemik koşulların yol

açmakta olduğu düşünülmektedir. Diğer bir taraftan mezenkimal kök hücrelerin düşük oksijen basıncındaki mikroçevrede karakterize olduklarının bilinmesi onları oksijen yetersizliğine karşı dirençli kılar (49). Hipoksinin, hipoksi indüklenebilir α ve β alt biriminden oluşan heterodimer HIF1 transkripsiyon faktörü ekspresyonu aracılığıyla birçok hücresel uzantı ve sinyal aktarımlarını regüle ettiği bilinmektedir. HIF1- α dokulardaki oksijen konsantrasyonu ile regüle edilir ve transkripsiyonel aktivitesi bu şekilde belirlenir. İskemik durumlarda artan ekspresyonuyla hücre proliferasyonunu indüklemesi yanı sıra hücre siklusu ve apoptozis üzerine etki yapar (50). Bu çalışmada apoptotik hücre ölümleri minimale indirilmiş kök hücrelerin multipotensileri ve proliferatif kapasiteleri kaybedilmeden istenilen sayılara ulaştırmak için hipoksik ortam kullanılmıştır (49, 50).

Mezenkimal kök hücrelerle ilgili yapılan araştırmalar çoğunlukta in vitro çalışmalar olduğu için, hücrelerin dokularda yerleşimi, niş bölgeleri detaylı incelenmemiştir. Fakat son yıllarda sunulan çalışmalarda, bu hücrelerin dokularda perisitler gibi perivasküler yerleşimde olduğu, komşu hücrelerin olgunlaşma, farklılaşma ya da sessiz kalma gibi hücresel fonksiyonlarını koordine ettikleri bildirilmiştir. Bununla birlikte in vitro hipoksik mikroçevrenin mezenkimal kök hücrelerin davranışları üzerine etkileri yoğun bir biçimde çalışılmaktadır. Hipoksik ortam deneysel protokolu oluşturma konusunda pek çok varyasyon olmasıyla birlikte hipoksiye maruz kalma süresi üzerinden kalıcı maruziyet ve kısa süreli maruziyet (72 saate kadar) olarak temel iki grupta toplanmaktadır. Kalıcı hipoksik ortamda kültüre edilen hücrelerle kısa süreli hipoksiye maruz kalan mezenkimal kök hücreler karşılaştırıldığında; anaerobik glikoliz, anjiyojenik aktiviteleri eşitken canlılık, proliferasyon, koloni oluşturma yeteneği, köklülük ve kondrojenik farklılaşmanın kalıcı hipoksidede daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Akut süreli hipoksik kültürün hücrelerin apoptotik sürece girmelerine neden olduğu gösterilmiştir. Kök hücrelerin hipoksik ortama maruz kalma süreleri arttırıldıkça mikroçevreye hızlı bir şekilde adapte olup metabolizmalarını anerobik glikolize çevirerek multipotent özelliklerini sürdürdükleri ve mitokondri sayılarını arttırdıkları bilinmektedir. Artan mitokondriyal aktivite MKH'leri hücre ölümlerine neden olan indükleyicilere karşı güçlü kılar (49).

1.4.2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültür Şartları



Şekil 6: Mezenkimal kök hücre izolasyonu (51)

MKH'ler ürettikleri birçok büyüme faktörü ve sitokinler aracılığıyla immun sistemi baskılayıcı ve trofik etki potensiyeline sahiptirler. Mezenkimal kök hücrelerin tedavide kullanılabilirliğiyle ilgili en büyük avantajlarından biri hastaların kendisinden otolog olarak alınabilmesiyle allojenik nakillerden kaynaklanabilecek olası immün redlerin ve enfeksiyoların ortadan kalkmasını olanak tanımalarıdır (1,52).

MKH'lerin tedavide kullanılabilmesi için hücrelerin belirli bir sayıya ulaşmaları gerekmektedir. Yapılan literatür taramalarında kullanılan mezenkimal kök hücre kaynaklarının yoğunluklu olarak kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı hücreler olduğu görülmektedir. Kordon kanı, kemik iliği ve adipoz doku mezenkimal kök hücrelerinin karşılaştırmalı olarak çalışıldığı yayınlar mevcuttur (3).

Kordon kanı, kemik iliği ve adipoz dokusundan kaynaklanan MKH'lerin koloni oluşturma kapasitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada (1) en yüksek oran adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler, onu takiben kemik iliği ve en düşük kapasite de kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinde bulunmuştur. İzolasyon oranı başarılarına da bakılan çalışmada kemik iliği ve yağ kaynaklı olanlar %100'e yakınken, kordon

kanı MKH'lerinde maksimum %30-38 oranlarda olduğu gösterilmiştir(1,39). Aynı çalışmadaki 2. pasaj senesens yüzdeleri arasında kordon kanı MKH ile adipoz MKH leri arasında belirgin farklılık saptanmıştır. Erken pasajlarda senesense ulaşan koloni sayısı en fazla olmasına rağmen en uzun süreli kültürün kordon kanı MKH'lerinde, takiben adipoz MKH'ler ve kemik iliği MKH'lerinin çok kısa kültür süreleri olduğu gözlenmiştir (39). Adipojenik farklanma kapasitelerinin çalışıldığı bir başka çalışmada adipoz MKH'lerinde farklılaştırma için indüklemeye 2 gün sonra dönüşüm başlayıp farklılaşma en fazla 2 hafta sonunda tamamlanırken, kordon kanı MKH'lerinde dönüşüm 5 günde belirip 3 haftada tamamlanmıştır (2). Bu çalışmada literatür taramaları sonucu ulaşılan bilgiler ışığında en yüksek verimin alınabileceği adipoz doku seçilmiştir.

Mezenkimal kök izolasyonunda asıl kaynağın kemik iliği olması, bu kaynaktan elde edilen kök hücrelerle yapılan deneysel çalışmaların ve uygulamaların sayıca daha fazla olmasından kaynaklanan güvenilirliğe rağmen aspirasyon prosedürünün oldukça invaziv oluşu, farklılaşma ve dayanıklılık potansiyellerinin yaşla birlikte azalması alternatif kaynaklar geliştirmeyi gündeme getirmiştir. Alternatif kaynaklardan biri olan dipoz doku stromal vasküler fraksiyon (SVF) içeriğinde multipotent mezenkimal kök hücre popülasyonu bulundurmaktadır. Yağ doku kaynaklı kök hücreler dokudan lipoaspirasyon ya da abdominoplasti yöntemi uygulanarak elde edilebilmektedir. Elde edilen dokudan MKH içeren fraksiyon izolasyonunda; enzimatik yöntem, homojenizasyon ve diferansiyel santrifügasyon yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Kök hücre kaynağı olarak adipoz dokunun avantajlarından biri de izolasyon sırasında morbiditenin minimal, erişebilirliğin kolay olmasıdır. İnsan adipoz dokusunun 1 gramından izole edilen MKH sayısı yaklaşık 1×10^6 kadardır. 1 ml yağ dokusu aynı miktardaki kemik iliği ile karşılaştırıldığında 500 kat daha fazla kök hücre içerir (3,6,45,53,54,55).

MKH izolasyonunda farklı teknikler ve kültür ortamları kullanılmakla birlikte standar olarak; izolasyonu öncesinde, izolasyonu yapılacak olan dokunun eritrositlerden uzaklaştırılması gerekmektedir. Kemik iliğinden izolasyon yapmak için dansite gradient yöntemi ile mononükleer hücre süspansiyonu hazırlanırken diğer dokulara çoğunlukla tip1 kollajenaz ve dispaz enzimlerinin kullanıldığı enzimatik ayrıştırma uygulanmaktadır. Bu yöntemlerle süspansiyon edilen hücreler kültür ortamı içinde, T25 veya T75' lik kültür kaplarına konularak % 5 CO₂ içeren 37 °C'lik ve %95 nemli

inkübatörde inkübasyona bırakılmaktadır. Flasklara ekim yapılan heterojen hücre topluluğu içinde çok az sayıdaki mevcut olan MKH'lerin çoğaltılması için herhangi bir büyüme faktörleri veya diğer uyarıların eklenmesi gerekmemektedir. Ancak MKH'lerin çoğaltılması için kültür ortamına serum ilave etmek gerekmektedir. Bu amaçla en fazla kullanılan serum kaynakları %10- 15 oranlarında fetal bovine serum (FBS) ve fetal calf serum (FCS) olmakla birlikte plastik flask tabanına yapışma (adezyon) özelliği gösteren hücreler, fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedirler. Standart şartlarda kültüre edilen hücre topluluğu içinden küçük bir kısmı, saatler içerisinde flask tabanına adezyon göstermeye başlamaktadır. 24- 48 saat sonra yapışmayan hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması ardından yapışan hücreler tripsin- EDTA ile kaldırılarak tekrar kültür kaplarına ekilmektedir. Fakat klinik uygulamalarda kullanılacak olan durumlarda FCS ve FBS alerjik reaksiyon gibi yan etkilerinden dolayı tercih edilmemektedir. Çözüm olarak otolog serum kullanılması üzerine çalışmalar yapılmıştır (45,56,57,58). Bu çalışmada izolasyon, pasaj, kriyoprezervasyon ve indükleme sürecini içine alan tüm aşamalarında otolog serum kullanarak MKH kullanımının kliniğe uygun hale getirilmesi hedeflenmiştir.

1.5. Kriyoprezervasyon

Dokuların ve hücrelerin canlılıklarını kaybetmeden, çeşitli kriyoprotektanlar kullanılarak düşük sıcaklıklarda dondurulup saklanması işlemine kriyoprezervasyon denir (59). Kriyoprotektanlar dondurma- çözme işlemlerinde hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılırken toksik etkileri de olabilen kimyasal maddelerdir. Hücreye nüfuz etme kapasitelerine göre hücre membranından geçebilen intrasellüler kriyoprotektanlar (permeabl) ve hücre membranından geçemeyen (non-permeabl) ekstrasellüler kriyoprotektanlar olarak iki grupturlar (60).

İntrasellüler kriyoprotektanlar, hücre içindeki su ile yer değiştirerek dehidrasyonu sağlarlar. Dondurma solüsyonlarının içerisinde en az bir tane bulunması gereken intrasellüler kriyoprotektanlar, dondurma ve çözme işlemleri esnasında hücre içi buz kristallerinin meydana gelmesini engelleyerek hücre yapısının devamlılığını sağlarlar. Ekstrasellüler kriyoprotektanlar ise tek başlarına kullanılmazlar diğer kriyoprotektanlarla birlikte kullanılmaları durumunda hücre membranındaki fosfolipidlerin stabilizasyonunu ve kontrollü dehidrasyon oluşumunu sağlarlar. Ayrıca

ozmotik değişikliğe bağlı sıvı geçişinde etkili olup, çözüme esnasında hücrel şişmeyi engelleyerek hücrede oluşabilecek zararın minimize edilmesini sağlarlar (61).

Adipoz dokudan izole edilen insan stromal vasküler fraksiyondaki adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin dondurulup çözdürülmesiyle ilgili yayınlanmış az sayıda bilgi olmasıyla birlikte, hipoksik ortamda kültüre edilmesi sonrası dondurma ortamında DMSO ve trehaloz kriyoprotektanları ile otolog serum içeren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Kriyoprezervasyon amacıyla en çok kullanılan hidroskobik polar bileşik DMSO iken, trehaloz membran stabilizasyonunu sağlar ve dondurma sırasında koruyucudur. Kimyasal ve doğal yapısı, dondurma esnasında koruyucusu camsı bir form almasını sağlar. Hücrede camsı matriks oluşumu, lethal buz kristalleri potansiyelini inhibe eder ve hücre hasarını minimize eder. Dehidratasyon esnasında hücre membranını koruyan trehalozun zar ve proteinler için çok iyi bir koruyucu olduğu bilinmektedir. Trehalozun stabilize etme etkisi, son zamanlarda aşı ve nakil için organ solüsyonlarında, biyomedikalde, kozmetikte ve farmakolojik uygulamalarda da yer almasını sağlamaktadır (7). Bu sebeple bu çalışmada yüksek konsantrasyon trehaloz düşük konsantrasyonda DMSO kriyoprotektanı kullanılmıştır.

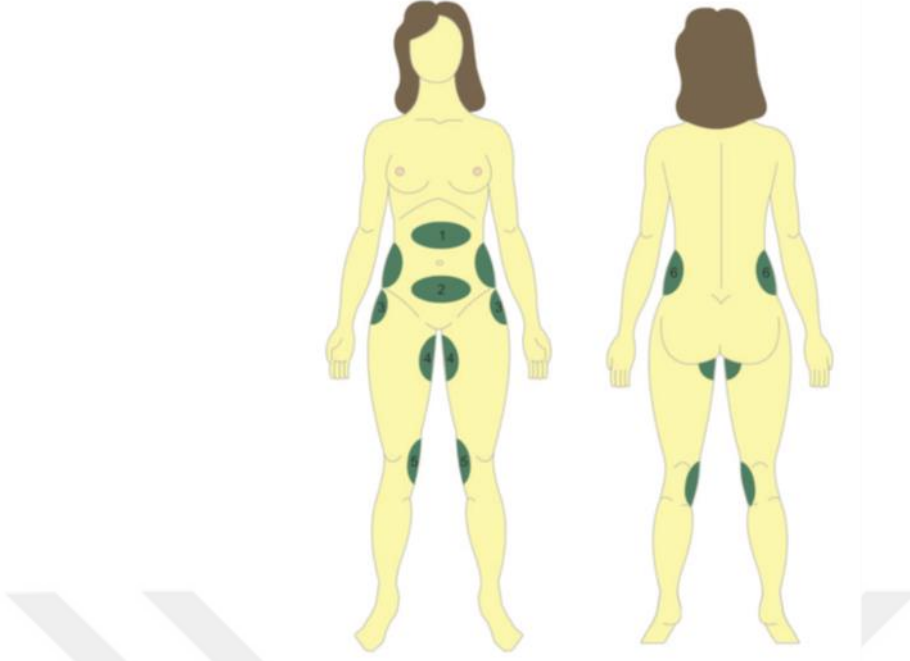
Birçok hastalık ya da bozuluk kişinin kendi hücreleri kullanılarak tedavi edilebilir. MKH açısından zengin olan adipoz doku, otolog nakiller için bu kullanıma olanak tanır. Fakat hastaların fayda görebileceği bu hücreler her zaman elde edilemez. Bu yüzden hücrelerin tedavi noktasında hazır bulunmaları için saklanmaları önemlidir. Kriyoprezervasyon, ileride hasar görmüş doku veya organ fonksiyonlarının kurtarılması ya da iyileştirilmesi için hücre ya da dokuların saklanması iyi bir yoldur. Mezenkimal kök hücreler multipotent özelliklerini kaybetmeden uzun süreli kültüre uygun ve dondurma çözdürme işlemlerine dayanıklıdır (7,62,63).

1.6. Cerrahi Olarak Adipoz Dokunun Eldesi (Lipoaspirasyon)

Uluslararası Plastik Cerrahi Derneği tarafından yayınlanan 2011 yılı istatistiklerine göre dünya genelinde en sık gerçekleştirilen rekonstrüktif/kozmetik cerrahi operasyonlar arasında lipoaspirasyon %20'lik bir oranla başı çekmektedir. Bu işlem hacmi göz önüne alınırsa lipoaspirasyon sırasında alınan otolog yağ dokuların etkin olarak hücre-doku merkezlerinde saklanabilmesi ve ihtiyaç durumunda

kullanılabilmesinin klinik tedavilerde önemli ölçüde tıbbi ve ekonomik avantaj yaratacağı aşikârdır. Özellikle son 15 yıldır bazı araştırmacılar adipoz dokunun bu amaçlar doğrultusunda farklı yöntemler kullanılarak kriyoprezervasyonu ve dokunun çözme sonrasındaki yapısal ve fonksiyonel etkinliğini incelemektedir (64, 65).

Literatürde lipoaspirasyon tekniği, kullanılan kanül, vakum basıncı, yağın alındığı vücut bölgesi, hastanın yaşı, beden kitle indeksi, kök hücrenin işlenmesi sırasında kullanılan santrifüj hızı gibi bir çok faktörün kök hücrenin kalitatif ve kantitatif değerleri üzerinde etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte lipoaspirasyon sonrası alınan ve farklı metotlarla izole edilip işlenen dokuların işlem sırasında ve sonrasındaki biyolojik özellikleri ve nakil öncesi/sonrası biyolojik/klinik etkinlikleri konusunda dünya genelinde halen standardize edilebilmiş bir yöntem mevcut değildir. Dahası günümüze kadar gerçekleştirilen sınırlı sayıdaki çalışmalar birbirine zıt ve farklı sonuçlar vermiştir (64). Beden kitle indeksi ve donörün yaşıyla ilgili yapılan bazı çalışmalarda proliferatif kapasite ve hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı etkilenmediği (66,67) gösterilirken diğer çalışmalarda artan yaşla birlikte canlılık, hücresel yaşlanma, proliferasyon hızı, farklılaşma potansiyeli, ikilenme zamanlarının etkilendiği belirtilmiştir (68,69,70). Beden kitle indeksinin artışıyla mezenkimal kök sayısının azaldığını konusunda fikir birliği fazladır. Bu konuda yapılan ayrıntılı bir çalışmada 50 yaş üstü gruplarda p16 ve p21 yaşlılık genleri seviyesi yüksek, genç bireylerde de süperoksit dismutaz aktivitesi fazla bulunmuştur. Yaş artışıyla birlikte hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi, canlılıkları, adipojenik/kondrojenik/osteojenik farklılaşma kapasiteleri düşük bulunmuştur (68). Yağın alındığı bölgenin kök hücre sayısını etkilediğini gösteren birkaç çalışmada mezenkimal kök hücre yoğunluğunun en fazla alt karında olduğu daha sonra hemen hemen eşit sayıda üst karın ve alt iç bacaklarda, bunu takiben bel ve üst iç bacaklarda, en az ise basenlerde olduğu gösterilmiş ve uygulanan tekniğinde izole edilen hücre sayısını etkilediği gösterilmiştir (70,71).



Şekil 7: Adipoz dokunun elde edilebileceği alanlar. 1, üst karın; 2, alt karın; 3, trokanterik bölge; 4, iç uyluk; 5, diz; 6, yan bölge (70).

Ameliyat sırasında kullanılan yüksek vakum basıncının kök hücre sayısı verimini azalttığı düşük basınçla yapılan vakumda daha yüksek sayılarda canlı mezenkimal kök hücre elde edildiği belirtilen çalışmalar mevcuttur (72).

Standardizasyonun sağlanabilmesindeki en büyük zorluklardan biri bireylerden alınan örneklerdeki adipoz kaynaklı kök hücrelerinin kalitatif/kantitatif özelliklerinde farklılıklar olmasının yanı sıra aynı bireyin farklı bölgelerinden alınan örneklerde bile varyasyonlar görülmesidir (73). Bu çalışmada; klasik lipoaspirasyon tekniği, tek bir vücut bölgesi (alt karın), standart ölçülü kanül, sabit-düşük vakum basıncı, sabit santrifüj hızı, sabit BMI'ne sahip genç/yaşlı kadın bireyler kullanılarak sonuçların sapması elemine edilmeye ve standarda ulaşılmaya çalışıldı.

1.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı

MKH'ler son zamanlarda rejeneratif tıp ve hücre tabanlı tedavi aracı olarak kullanılmaktadır. MKH ölümlerine ve terapötik hatalara; besin, oksijen kaynağı gibi

iskemik koşulların yol açmakta olduğu düşünülmektedir. Diğer bir taraftan mezenkimal kök hücrelerin düşük oksijen basıncındaki mikroçevrede karakterize olduklarının bilinmesi onları oksijen yetersizliğine karşı dirençli kılar (49). Son yıllarda pek çok araştırmacı tarafından kök hücrelerin uzun süre bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahip olması; kas, sinir, kemik, kırık gibi birçok hücrelere farklılaşabilme ve hasarlı dokulara nakil edilmesi sonrasında işlevsel olabilme özellikleri nedeniyle, kök hücreler yeni tedavi yöntemi olarak düşünülmekte ve bu konularda araştırmalar yapılmaktadır. Vücutta doku hasarlarına karşı oluşan ilk tepki fizyolojik doku tamiri mekanizmasının devreye girmesidir. Fakat bu doğal mekanizma her zaman yeterli ve etkin bir şekilde restorasyonu sağlayamayabilir. Bunun için doku tamiri sürecinde alternatif tedavi edici yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Hasarlanmış yada dejenere olmuş kırıkdağın kendi kendini yenileyebilme potansiyeli sınırlıdır. Tamamen iyileşme sağlanamaması ortopedik hastaların primer şikâyetlerindedir. Eklem kırıkdağı lezyonları onarımı bugüne kadar hep önemli bir klinik sorun olmuştur. Geleneksel tedaviler doğal hiyalin kırıkdağın restorasyonunu sağlayamamıştır. Bu durum uzun vadede kırıkdağın esnekliğini kaybetmesine yol açmaktadır. Yumuşak doku hasarlarının tamirinde günümüzde en çok tercih edilen yöntemler hasarlı dokunun flap yöntemiyle cerrahi olarak tamiri, biyolojik ya da sentetik greftler kullanarak onarılmaya çalışılması ve otolog adipoz doku nakli yaklaşımlarıdır. Otojen osteokondral greft ya da kondrosit transplantasyonunun etkili olduğu görülürken, fazla invaziv olması yanı sıra ve in vitro hücre kültürü sırasında yaşlanma ve hücre ölümleri gibi sonuçlarda meydana gelebilmektedir. Adipoz doku nakli yapay doku maddelerine kıyasla daha ucuz, kolay elde edilebilir ve alerjik olmamasından dolayı rekonstrüktif cerrahide sıklıkla uygulanır. Otolog olarak nakledilen adipoz dokunun doku tamirinde sağladığı pek çok avantaj yanında nakledilen bölgede kalış süresi ve yarı akışkan bir dokunun nakil sonrası canlılığının ne kadarını koruduğu sorusunun cevabı tartışmalıdır. Geri emilme gibi sonuçlardan kaynaklı tekrarlayan yağ transplantasyonları hastaya hem maddi hem manevi zorluklar oluşturmaktadır (74,75,76,77,78).

Yağ dokusu mezenkimal kök hücreleri gibi erişkin multipotent kök hücreleri izole edip, çoğaltıp, kondrosit hatta farklılaştırmak; osteoartrit, eklem yaralanmaları tedavilerinde rekonstrüktif ve plastik cerrahi uygulamalarında önemli bir adımdır (79). Hücre tabanlı doku mühendisliği son yıllarda, kırıkdağın hasarından kaynaklı ortopedik

defektlerin onarımı için hücreleri agaroz, kollajen, fibrin, hyaluronik asit, sentetik polimerler ve alginat gibi uygun bir taşıyıcı maddeye gömerek üç boyutlu yapıda farklılaştırma yöntemi geliştirmiştir. Literatürde bu tür ortamlara gömülerek farklılaştırılan hücrelerde kondrojenik markırların, proteoglikanların, tip II kollajen gibi kıkırdak dokuya spesifik belirteç ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (80).

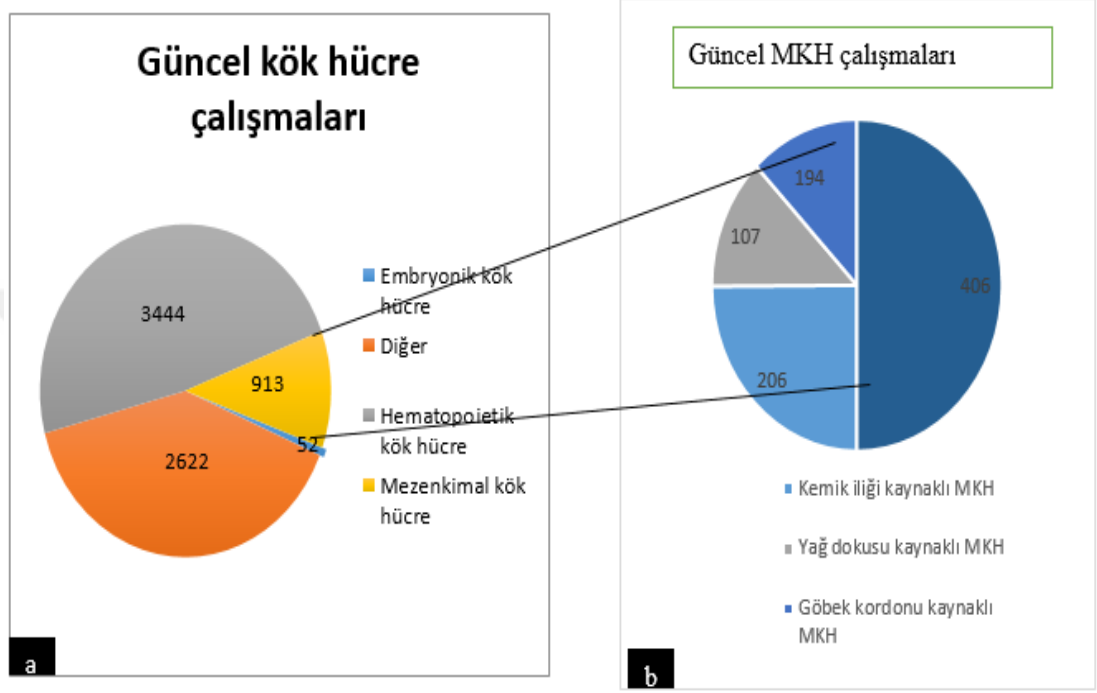
Yağ doku mezenkimal kök hücrelerinin; tip 1 ve tip 2 diabetes mellitus, karaciğer sirozu, kron hastalığı, GVHD, miyokard infarktüsü, lipodistrofi, alzheimer, parkinson, inme, vitiligo, böbrek ve kalp yetmezliği, fekal inkontinans, osteoartrit, osteoporoz, menisküs gibi ortopedik hastalıklar, kanser ve immun hastalıklarda bağışıklık sistemini baskılayıcı ve düzenleyici, multipl skleroz, sekonder progresif multipl skleroz nörodejeneratif hastalıklar, omurilik yaralanmaları ve travmatik sinir kesileri gibi sinir sistemi hastalıkları, diş hekimliğinde implantlar, plastik cerrahide yanık tedavisi gibi rejeneratif amaçlı, osteogenesis imperfekta gibi kalıtsal hastalıklarda kullanıma ait deneysel ve klinik çalışmalar mevcuttur. Yağ kaynaklı mezenkimal kök hücreler düşük immünjenitesi, yüksek modülatör ve immünespresif özelliklere sahip olduğu için klinikte kullanılmaktadır. Bununla birlikte belli bazı hastalıkların tedavisi için klinik çalışmalar halen devam etmektedir (81).

Güncel literatür incelendiğinde adipoz dokunun yumuşak doku defeklerinin tamirinde otolog kullanım potansiyelinin yüksek olduğu bununla beraber dokunun ve içerdiği kök hücrelerin farklı izolasyon, çoğaltma, saklama koşulları, yöntemleri kullanarak etkinliği incelenmiş olsa da çalışma sayısının azlığı, birbirine zıt sonuçların elde edilmiş olması ve henüz dünya genelinde bu konuda kliniğe uygun etkin ve verimli bir standardın oluşturulamamış olması çalışmanın gerekçesini oluşturmaktadır.

1.7.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı İle İlgili Güncel Çalışmalar

Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, kas gibi farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanında salgıladıkları pek çok büyüme faktörü ve sitokinler ile immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline sahiptirler. 1990'lı yıllardan bu yana klinik kullanıma uygunluğuyla ilgili birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (82).

2019 yılı itibarı ile Uluslararası Sağlık Örgütü tarafından desteklenen www.clinicaltrials.gov sitesinde kayıtlı 7031 kök hücre çalışması varlığı ve bu çalışmalardan 913'ü MKH'lerin etkinliğini göstermeye yönelik olduğu gösterilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8: (a) Kök hücre bazlı toplam klinik çalışma verileri. (b) Mezenkimal kök hücre çalışma verileri. MKH: Mezenkimal kök hücre (9)

Graft versus host hastalığı (GVHD), kemik iliği nakillerinde donörden alınıp hastaya kök hücrelerle birlikte verilen sağlıklı T-lenfositlerin aracılık ettiği şiddetli immünolojik reaksiyon sonucu organ fonksiyon bozukluğu ile seyreden kompleks bir klinik tablo olup allojenik kök hücre naklinden sonra en önemli mortalite ve morbidite nedeni olarak bilinir. Mezenkimal kök hücreler immünmodülatör etkileri ve immün cevabı düzenleme etkileriyle son zamanlarda GVHD tedavisinde alternatif bir yaklaşım olarak kullanılmaya başlamışlardır. Mezenkimal kök hücreler, T hücrelerinin çoğalmalarını, temel doku uyumluluğu kompleksi (MHC) gözetmeden baskırlar. MKH 'lerin immünsüpresif ve immünmodülatör etkileri ifade ettiği ve içerdiği yüzey molekülleriyle ilintilidir. Donörden gelen protein parçaları alıcının T hücreleri

tarafından ayırt edilir ve tüm çekirdekli hücreler, antijeni MHC I sınıfı aracılığıyla T hücrelerine iletilir. Mezenkimal kök hücreler insan lökosit antijeni (HLA) tarafından kodlanan MHC I sınıfına yüzey moleküllerini az seviyede bulundurduğu için immün yanıtı neden olmamakla birlikte genellikle lenfosit ve antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunan MHC II yüzey moleküllerini içermedikleri için doku uyumu aranmamaktadır (83,84).

GVHD, allogeneik hematopoietik kök hücre nakillerinden sonra alıcının farklı dokularına karşı saldırıya geçen donör T-lenfositlerine bağlı olarak gelişen morbidite ve mortalitesi yüksek, yaygın bir komplikasyondur. Görülme oranı tedavi dozuna, HLA uyumuna, alıcının yaşına ve hastalığın evresine göre %20-70 arasında görülmektedir. Akut GVHD (aGVHD) için standart olarak ilk tedavi kortikosteroidlerdir. Sıklıkla hastaların %30-50'sinde iyileşme görülmemekle birlikte 3. ve 4. evre GVHD gelişebilmekte, toksisite ve enfeksiyon riski artabilmektedir. Literatüre bakıldığında steroidlere dirençli GVHD olgularında sağkalım %10 ve altındadır (85,86). Multipotent progenitor hücreler olan MKH'ler ekstsansif immünmodulatör etkilerinden dolayı GVHD'de kullanılmaktadır. GVHD'de ilk başarılı deneme 2004 yılında LeBlanc ve ark. (87) tarafından yapılmış olup, çalışmada 4. evre steroide dirençli GVHD' li dokuz yaş olguda uygulanan MKH tedavisinin iyileştirici etkisi görülmüştür. Bir süre sonra relaps yapan olguya yinelenen MKH uygulaması sonrası kalıcı bir yanıt alınmıştır (88).

2016 yılında Erbey ve ark., ortalama yaşları 7 olan 33 adet pediatrik hastaya, toplamda 68 doz Kİ-MKH uygulamışlardır. Ortalama 1.18×10^6 /kg hücre infüze edilmiş ve uygulama sırası ve sonrasında hastalardan hiçbirinde komplikasyon görülmemiştir. Hastalardan 8'inde tedaviye yanıt alınmazken, 18' inde tam ve 7'sinde kısmi cevap alınmıştır. Tam ve kısmi yanıt alınan hastalarda iki yıllık sağkalım yüzdesi %63.8 iken tedaviye yanıt alınamayan hastalarda bu yüzde %29.4 olarak raporlanmıştır. İlk doz uygulamasından 100 gün sonra bakılan kümülatif insidanslara göre tam ve kısmi cevap alınan olgularda mortalite görülmemekle birlikte tedaviye yanıt alınamayan grupta nakile bağlı mortalite %46.6 olarak bildirilmiştir. Kronik GVHD gelişen MKH infüzyonuna tam ve kısmi yanıt veren 20 pediatrik olgudan 8'inin yaşadığını raporlanmıştır. Yapılan çalışmaların sonucu olarak steroid rezistanslı akut GVHD hastalarda MKH uygulamasının güvenilir ve etkili bir tedavi olduğunu belirtilirken kronik GVHD gelişmiş akut GVHD olgularında kısıtlı etki göstermiştir (89).

Crohn hastalığı sonucu oluşan fistül onarımında mezenkimal kök hücre faz I ve faz II klinik çalışmaları mevcuttur (90). Garcia-Olmo ve ark., tarafından yapılan Faz I çalışmasında, MKH'ye özgü olan ekspresyonları gösterilmiş ve büyüme hızları üzerine çalışılmış otolog adipoz doku kaynaklı MKH infüzyonu yaparak güvenilirlik ve uygulanabilirlik üzerine araştırma yapılmıştır. Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin kültürü yapıp üçüncü pasajından sonra dört hastada toplamda sekiz fistül üzerine tedavi uygulanmıştır. Haftalık kontrollerle sekiz hafta sürecine tedaviye devam edilmiştir. Süreç sonucunda fistüllerinin altısında dış kısım epitelizasyonu ile kapandığı gözlenirken iki fistülde kısmi iyileşme izlenmiştir. Bir yıllık kontrolde yan etki saptanmamıştır (91). Garcia-Olmo ve ark., MKH ve fibrin yapıştırıcı uygulayarak yaptıkları karşılaştırmalı faz II çalışması sonucunda MKH'nin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (90). 2012 yılında aynı grup allojenik AK-MKH uygulamasını denemişler, uygulamadan 24 hafta sonra %69.2 olguda fistül akıntısı indirgenirken, %56.3 olguda tedavi edilen fistüllerde tam kapanma, %30'unda ise var olan tüm fistüllerin tamamen kapandığı gösterilmiş ve 6 aylık kontrollerde herhangi bir yan etki saptanmamıştır. Sonuç olarak MKH lokal enjeksiyonunun tedaviye yanıtının yüksek oluşu ve uygulamadaki kolaylığı nedeniyle preanal fistül üzerine uygulanmanın efektif olduğunu belirtilmiştir (92).

MKH'ler otolog ve allojenik olarak olarak plastik cerrahide, rekonstrüktif ve estetik amaçlı olarak kullanılan bir uygulamadır. 2007 yılında Rigotti ve ark. radyasyondan hasar görmüş dokular üzerine adipoz kökenli MKH uygulamışlar ve yara iyileşmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda radyoterapi kaynaklı yara hasarlı dokularda nakledilen kök hücre kaynaklı iyileşme olduğunu raporlamışlardır (93). Keratokist nedeniyle hemimaksillektomi uygulanan bir hastada GMP şartları altında elde edilmiş yağ doku kaynaklı MKH ile trikalsiyum fosfat granüllerini titanyum mesh içinde prefabrike edilerek elde edilen doku mikrovasküler flep olarak maksillaya nakledilmiştir. Biyopsi verilerine bakıldığında kemiğin yeniden şekillendiği görülmüştür (94). Tanikawa ve ark., 2013 yılında tarafından yapılan bir klinik çalışmada; 14 adet kraniyofasiyal mikrozomili hastada hücre sayısı bilenen ve karakterizasyonu yapılmış olan otolog yağ dokusu kaynaklı MKH ve kök hücre içermeyen kontrol gruplarına greft uygulanmıştır (44). Kök hücre uygulanan gruptaki hastalarda CD73 ve CD105 ifadeleri %95 olarak tespit edilmiş ve sağkalım %88 olarak

kaydedilmiştir. MKH içermeyen kontrol grubunda ise %54 oranında bulunmuştur (95).

Mezenkimal kök hücre uygulamaları, sistemik yolla infüzyonu sonrası in vivo düzenleyici parakrin etkileri, hedef bölgeye yönelimi ve engrafmanı sağlamayabilme özellikleri nedeniyle osteoartrit tedavisinde de kullanılmaktadır. Koh ve ark. 2016 yılında kırık defektleri üzerine bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmada metotreksat (MTX) tedavisi ile fibrin yapıştırıcıyla birlikte verilen AK-MKH tedavisini karşılaştırmışlardır. AK-MKH ile fibrin yapıştırıcı verilen gruplarda 3., 12. ve 24. ay artroskopilerinde alınan biyopsi sonuçları ve günlük aktivite, yaşam kalitesi gibi diğer alt skorlara bakıldığında artan bir iyileşme kaydedilmiş ve gruplar arası anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (96). COL1A1 ya COL1A2 genlerinde 1500 farklı dominant mutasyondan kaynaklanan kollajen sentezi bozukluğuyla tanımlanan ve genetik bir hastalık olan Osteogenesis imperfecta (OI) tedavisinde de prenatal ve postnatal olarak MKH uygulamaları üzerine klinik çalışmalar mevcuttur. 2014 yılında Götherström ve ark.(97) prenatal ve postnatal olmak üzere ortak donörden elde edilen MKH retransplantasyonu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 2.8×10^6 hücre/kg doz uygulanmış ve kırık ve mobilite iyileşmesi, az seviyede kemik yamalanması ve linner büyüme izlenmiştir. Fetusa 31. haftasındaki verilen 30×10^6 hücre/kg sonuçlarına göre hamilelik ve infantil evrede yeni bir kırık gelişmemiş olduğu gösterilmiştir. Olgunun 13 aylık olana kadar takibinde normal gelişim ve uzama kaydedilmiştir. Postnatal olguda ise 19. ayına kadar normal gelişim seyretmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler ışığında allojenik MKH retransplantasyonunun hem prenatal hem de postnatal hastalarda OI için güvenilir ve efektif bir tedavi biçimi olduğu raporlanmıştır (97).

MKH'lerin bilinen en eski kullanım alanlarından birisi kardiyak hastalıklardır. Kardiyak olgularda MKH uygulamasıyla ilgili yapılan çalışmalarda infüze edilen kök hücrelerin fonksiyonel miyosite diferansiyasyonu, yerleşik hücrelerin hasarlı alana yönelimi ve kök hücrelerden salınan faktörlerle inflamatuvarın baskılanması amaçlanmıştır. İskemik kalp hastalıklarında umut verici bir kaynak olan MKH'ler üzerine randomize ve uzun dönemli klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (15).

MKH'lerin nörolojik hastalıklardan özellikle omurilik yaralanmaları, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), multipl skleroz (MS) ve parkinson gibi hastalıkların tedavisinde

çalışılmıştır. Çalışmaların uzun dönem sonuçları beklenmektedir. 2010 yılında multipl skleroz üzerine Yamout ve ark.'ın yaptıkları bir çalışmada 10 hastaya otolog kemik iliği kaynaklı MKH infüzyonu yapıp 3 ve 6 aylık takip sonrası olgulardan yarısında iyileşme kaydedilmiştir (98). 2010 yılında yapılan bir başka çalışmada Karussis ve ark. 15 MS ve 19 ALS olgusunda damar içi ve intratekal kombinasyonu ile otolog MKH uygulamışlar ve 6 ile 28 ay süresince takip ettikleri bu olgularda herhangi bir yan etki görmediklerini belirtmişlerdir (99). 2012 yılında Connick ve ark. sekonder progresif MS'li 10 olguya kg başına $1-6 \times 10^6$ hücre şeklinde MKH infüzyonu yapmışlardır. Olguların 10 aylık takibinde hastalardan birinde tedaviden sonra döküntü, ikisinde de bakteriyel enfeksiyon raporlanmıştır (100). Görme yetilerinde iyileşme izlenen çalışmada MKH'lerin yapısal, fonksiyonel, fizyolojik olarak tedaviyi ve sinir hücrelerinin korunmasını desteklediğini raporlanmıştır. Lufriu ve ark. 2014 yılında randomize, plasebo kontrollü faz II çalışmasında dokuz MS olgusuna $1-2 \times 10^6$ /kg damar içi MKH infüze etmişler ve hastalarda IFN-c oranında azalmayla birlikte proinflamatuvar T hücre profilinde düşüş gibi anlamlı immünolojik farklılıklar gözlemlenmişlerdir (101). Sonuç olarak hastalara verilen MKH'ler immünomodülatör özellikleri ile inflamatuvar parametrelerde tutarlı düşüşe neden olmuştur.

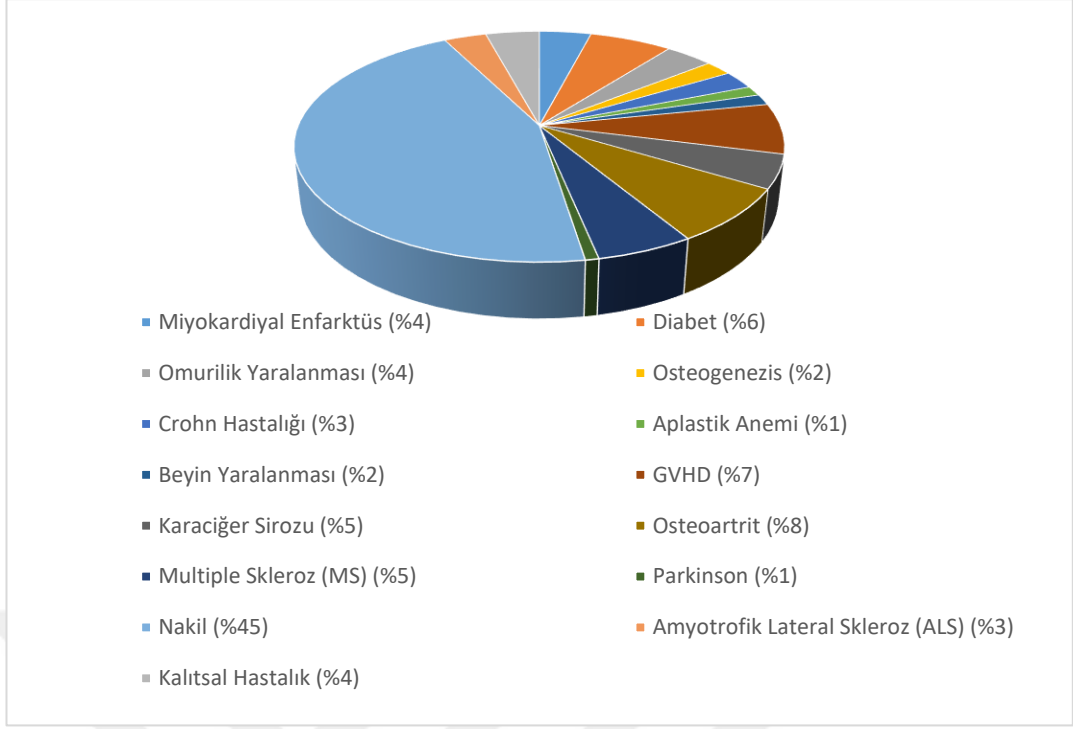
Park ve ark. 2012 yılında kök hücrenin omurilik yaralanması üzerine etkilerini araştırdıkları yaptıkları çalışmalarında; 10 olguda intramedüller yolla verdikleri MKH uzun dönem sonuçlarını değerlendirmişlerdir (102). Olgulara verilen MKH kemik iliğinden izole edilip dört hafta kültüre edilmiştir. Doğrudan omiliğe infüze edilen hücre sayısı kg başına 8×10^6 iken intradural boşluğa 4×10^7 /kg enjekte edilmekle birlikte 4 ve 8 hafta sonunda 5×10^7 /kg ilave doz verilmiştir. Hastalarda MKH nakline bağlı hiçbir yan etki gözlenmezken 6 aylık takipte, MRG ve elektrofizyolojik kayıt sonuçlarına göre 10 hastadan altısında üst ekstremitenin motor gücünde iyileşme, 3 hastada ise anlamlı olarak günlük yaşam kalitesinde ilerleme kaydedilmiştir. Olguların MRG sonuçlarına bakıldığında boşluk alan boyutunda azalma izlenmiştir. MKH'nin omurilik yaralanmaları üzerine tedavisi henüz yeni bir uygulamakla olmakla birlikte hastaların bu tedavi yanısıra fizyoterapi de alıyor olmalarından dolayı klinik başarı altında yatan mekanizmanın tam olarak ortaya çıkarılmasına engeldir.

Mohamadnejad ve ark., dekompanse karaciğer sirozlu 4 adet olguda periferden kg başına 31.73×10^6 otolog MKH infüze ettikleri faz I çalışmasında karaciğer hastalığı

skoru 1'den itibaren 3-4 puan artarak iyileşme göstermiş ve takibin sonunda dört hastanın da yaşam kalitesi artış izlenmiştir (103).

Günümüzde diyabet üzerine MKH nakli uygulaması henüz deneysel aşamadadır. Çeşitli kök hücre tiplerinde yapılan araştırmalara göre CD34+ kemik iliği ve kordon kanı kök hücreleri, diğer kaynaklardan elde edilen mezenkimal hücrelere oranla daha iyi sonuçlar vermiştir (104,105). 1999 yılında uygulanan tip 1 diyabet tedavisinde kullanılan ilk hücresel tedavi "Edmonton yöntemi" donörün pankreas dokusundan enzimatik işlemler sonrasında elde edilen hücrelerin, farklı kemoterapötiklerle immün sistemi baskılanan olan alıcıya nakledilmesi (106,107) olup efektif bir sonuç alınmamıştır (108). Yöntem geliştirilmesine rağmen donör sayısı ve izole edilen hücre sayısı yetersizliğiyle birlikte alıcının uzun süre immün sisteminin baskılanması, bu yöntemin uygulanabilirliğini azaltmıştır (109,110,111) Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, metabolik işleyişi çok yönlü olan diyabet için tam anlamıyla yeterli görülmemekte, çeşitli fizyolojik unsurlar değerlendirilerek daha fazla veri ile karşılaştırılması gerekmektedir (112).

Literatür ışığı altında ilk olarak kanser olgularında kemik iliği destek amaçlı daha sonra GVHD, miyokard enfarktüsü, Crohn hastalığı, organ nakilleri, akut ve kronik böbrek yetmezliği, diyabet, osteoartrit, MS gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde yapılan klinik uygulamalar konu ile ilgili deneyimler arttıkça tedavi üzerine etkileri aydınlanacak bununla birlikte rejeneratif tıp alanında yeni ufuklar açacaktır. Günümüz itibariyle klinik olarak denenilen 7031 kök hücre çalışması vardır. Bu çalışmalardan 913 tanesi mezenkimal kök hücrelerle ilgilidir. MKH çalışmalarından yalnızca 8 tanesi ülkemizde yapılmaktadır (Şekil 9).



Şekil 9: Mezenkimal kök hücre ile tedavi edilen yaygın hastalık yüzdeleri. GVHD: Graft versus host hastalığı (9)

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

- 10, 50, 100, 1000 µl 'lik mikropipetler (Thermo Pippetman)
- 1-10, 10-100, 100-1000 µl 'lik tek kullanımlık pipet uçları
- Serolojik Pipet Tabancası (Thermo)
- 5, 10, 25 ml serolojik pipetler
- Şırınga ucu filtre 0.22- 0.45 µm steril (Sartorius- syringe filter)
- Flask 25cm², 75cm² 'lik kültür kabı (Orange scientific- 4410200N)
- 4, 8 kuyucuklu kültür kabı (Nest)
- 6, 24, 96 well-plate (Nest)
- Kriyotüp (V7634 Sigma Nunc® CryoTubes® cryogenic vial, 1.8 mL)
- 15, 50 ml steril tüp (Isolab)
- 1-2, 5-5, 10-50 cc' lik enjektör (Ayset)
- Steril örnek toplama kabı
- 1,5 luk Eppendorf tüp

2.2. Cihazlar

- Hipoksik İnkübatör (New Brunswick Galaxy 170 R)
- Normansi İnkübatör (New Brunswick Galaxy 170 R)
- Santrifüj
- Su banyosu (Nüve)
- Akım Sitometri (BD Accuri C6)
- Işık Mikroskobu (Olympus BX51)

- İverted Mikroskop (Olympus CKX41)
- Olympus C5050 Kamera
- Nanotek Arthur™ hücre analiz cihazı
- -196 °C Azot tankı

2.3. Kimyasallar

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

Madde	Firma	Katalog Numarası
PBS-1X w/o Ca, Mg 500 ml	Lonza	BE17-516F
Collagenase type IA 100 mg	Sigma	C2674
Kristal Violet	Millipore	1014080025
Trehalose dehydrate 10 mg	Sigma	T9531
DME/F-12 (1:1) (1X)	Gibco	11320033
Hücre Canlılığı Solüsyonu	BD Biosciences	555816
DMSO (Hybrimax)	Sigma	D2650
Alcian Mavisi Solüsyonu (%1)	Sigma	B8438
Paraformaldehit	Sigma	P6148
Etilen Glikol	Sigma	102466
Tripsin/EDTA Solüsyonu 100 ml	Lonza	CC-5012
Tripsin-EDTA	Sigma	T4049
Tripan Mavisi 100 ml	Biocompare	03-102-1B
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Amresco	N182
Penisilin / Streptomisin	Gibco	15140-122
L- Glutamin 100 ml	Gibco	25030024
Alizarin Kırmızısı S 25 gr	Sigma	A5533
DAPI 10 mg	Appllichem	A1001
Kollojen II Antibody 50 UG	Genetex	GTX26579
PE labeled anti-human CD73	Becton Dickinson	550257
HU CD90 PERCP-CY5.5 İşaretli	Becton Dickinson	561557
HU CD105 APC İşaretli	Becton Dickinson	562408
PE İşaretli CD34	Becton Dickinson	555822
FITC İşaretli CD 45	Becton Dickinson	555482

Annexin V FITC	Becton Dickinson	556547
BD CellWASH	Becton Dickinson	349524
StemPro [®] Kıkırdak Farklanma Kiti	Invitrogen	A1007101

2.4. Metodlar

2.4.1. İnsan Adipoz Dokunun Örneklenmesi (Cerrahi)

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapılan İlaç Dışı Araştırmalar kategorisinde başvuru yapılmış ve 02.04.2015 tarih ve 15-3.2/19 nolu kararı ile etik izin alınarak çalışmaya başlanmıştır.

Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri içeren stromal vasküler fraksiyon eldesi için; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği' ne lipoaspirasyon ameliyatı için başvuran, 20–55 yaş aralığında rutin serolojik ve biyokimya testleri yapılmış ciddi bir sistemik ve genetik hastalığı olmayan gönüllü 10 sağlıklı kadından; genel anestezi ve/veya lokal anestezi altında steril koşullarda, alt abdominal alandan “klasik vakumlu mekanik lipoaspirasyon” yöntemi, tumescent tekniğiyle 250- 350 mm/hg düşük vakum basıncında, standart 4 mm kanül kullanılarak 50 ml lipoaspirat elde edildi. Her hastada aynı teknik ve değerler kullanıldı. İşlemler plastik cerrahi ekibi tarafından hastalardan bilgilendirilmiş onam formları alınarak gerçekleştirildi.

Elde edilen lipoaspirat örnekleri ameliyathane ortamında steril olarak süzülme suretiyle lipoaspiratı çevreleyen sıvı ve kan hücrelerinden uzaklaştırıldı. Aynı hastalardan alınan 100 ml periferik kan; klasik yöntemle damardan elde edilerek serum tüplerine aktarıldı. Serum tüplerine alınan kan ve lipoaspirasyon materyali %1'lik penisilin streptomisinli PBS içeren steril taşıma kaplarında steril koşullarda laboratuvara getirildi. En fazla 4 saat içinde izolasyon işlemine başlandı.



Şekil 10: Lipoaspirasyon uygulaması

Tablo 3: Çalışmada kullanılan lipoaspirasyon materyallerin elde edildiği hastaların demografik bilgileri

Donör No.	Donör Cinsiyeti	Donör Yaşı	Lipoaspirat Miktarı (cc)	Örnek Alma Tekniği
1	Kadın	36	30	Lipoaspirasyon
2	Kadın	28	25	Lipoaspirasyon
3	Kadın	37	25	Lipoaspirasyon
4	Kadın	35	25	Lipoaspirasyon
5	Kadın	33	25	Lipoaspirasyon
6	Kadın	45	40	Lipoaspirasyon
7	Kadın	40	30	Lipoaspirasyon
8	Kadın	24	30	Lipoaspirasyon
9	Kadın	52	35	Lipoaspirasyon
10	Kadın	40	30	Lipoaspirasyon

2.4.2. Periferik Kandan Serum Eldesi

Otolog serumun hazırlanması; Toplanan 50 ml kan 1 saat oda sıcaklığında pıhtılaşmaya bırakıldı. Serum tüpleri içindeki kanlar 1 saat 1200 rpm devirde 15 dk. santrifüj edildi. Serum hava akışlı laminar içinde steril enjektör ile toplanarak 0.2 µm' lik steril enjektör ucu filtrelerden geçirilerek küçük volümler halinde steril 1,5 ml 'lik ependorflar içinde -20 °C' de saklamaya alındı.

2.4.3. Lipoaspirattan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Ekspansiyonu

Ege Üniversitesi Kordon Kanı Hücre- Doku UAM laboratuvarında tüm hücresel tabanlı işlemler gerçekleştirildi. Uygulanacak olan klasik enzimatik izolasyon metodu; literatürdeki 3 farklı makaleden modifiye edilerek kullanıldı (56,113,114).

Lipoaspiratın yıkanması;

Eritrosit ve lökositlerin büyük çoğunluğunun uzaklaştırılması için aseptik koşullarda yıkama prosedürü gerçekleştirildi.

- % 1'lik penisilin streptomisinli PBS içeren steril taşıma kabı içindeki lipoaspiratın, kan fraksiyonlarının spontan olarak ayrılması beklendi. Ayrılan kan dikkatlice 25'lik steril pipetle alındı.
- Eşit volümde antibiyotikli PBS eklenerek 5-10 dk hafifçe çalkalanan lipoaspirat 1-2 dk bekletilerek ayrılan PBS, 50'lik pipetle dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Yıkama protokolüne materyalin temizliği sağlanana kadar en az 3 tekrar olmak üzere devam edildi.

Enzimle manuel parçalama;

- Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri içeren stromal vasküler fraksiyon eldesi için; yıkanan lipoaspirat ekstrasellüler matriks ile ayrılması için önceden hazırlanan %0,075 tip 1 kollojenaz enzimi ile 1- 3 saat 37 °C' de 15 dk aralıklarla hafif çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Süspansiyon homojen hale ulaşınca enzimatik parçalanma sonlandırıldı.



Şekil 11: Ameliyathane şartlarında lipoaspirasyonla elde edilen yağ dokusu örnekleri



Şekil 12: Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı laminar kabin, elde edilen SVF görüntüsü.



Şekil 13: Yağ dokudan MKH eldesi için kullanılan tip I kollojenaz enzimi

- Enzim aktivitesi DMEM F12 besiyeri (%8 otolog serum, %1 penisilin streptomisin ve %1 L- Glutamin içeren) ile nötralize edildi.
- Stromal vasküler fraksiyon pelleti, bağ doku ve matur adipositlerden ayırmak için 1000 rpm, 7 dk santrifüj edildi.
- Elde edilen pellet 15 ml lik falkon tüp içinde 1000 ml lik besiyeri ile pipetaj yapılarak homojenize edildi. İçinden 50 mikrolitre örnek alınarak Nanotek ArthurTM cihazında ilk canlılık ve hücre sayısı hesabı yapıldı.

Geriye kalan SVF pellet; DMEM F12, %1' lik L-Glutamin, %1' lik penisilin / streptomisin, %8'lik otolog serum dan oluşan taze hücre kültürü medyumuyla süspansiyon edilerek ikiye ayıldı ve her bir flaskta en fazla 1×10^6 hücre olacak şekilde 75 cm² 'lik hücre kültürü flasklarına ekildi.

- Hücreler önceden sterilizasyonu sağlanmış ve hipoksik koşullar % 2 O₂, % 5 CO₂, 37 °C' de, normansi koşullar % 21 O₂, % 5 CO₂, 37 °C' de olarak şekilde ayarlanan inkübatörde 2 gün inkübasyona bırakıldı.
- 2 gün sonra flaska yapışmayan hücreler PBS ile uzaklaştırılarak, aynı taze hücre kültürü medyumuyla besiyerleri tazelenildi. 10 gün boyunca %8'lik oranda kullanılan otolog serum, 10 gün sonrasında %5'e düşürüldü. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında Tripsin -EDTA ile kaldırılarak pasajlama yapıldı.

2.4.4. Deney Grupları

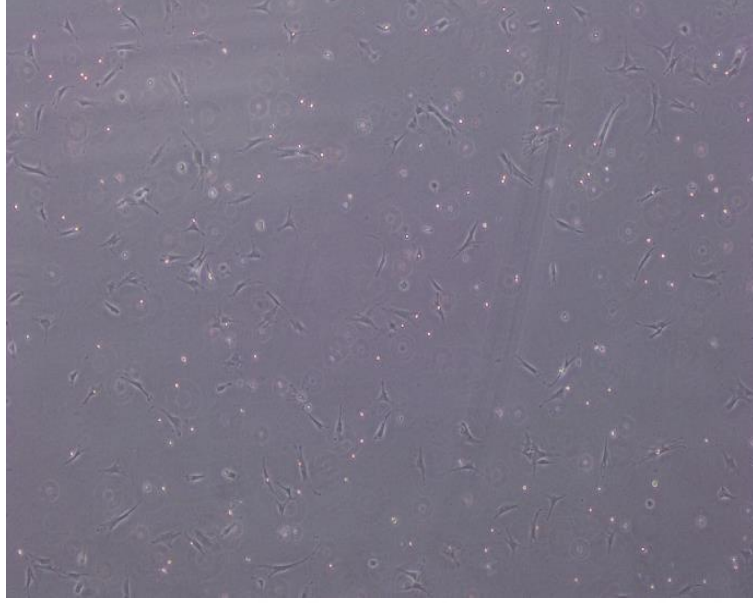
- 1. Grup:** Hipoksik ortamda otolog serum kullanılarak kültüre edilen kök hücreler
- 2. Grup:** Normansik ortamda otolog serum kullanılarak kültüre edilen kök hücreler
- 3. Grup:** Pasaj 3 de otolog serumla 3 hafta dondurulan hipoksik kök hücreler
- 4. Grup:** Pasaj 3 de otolog serumla 3 hafta dondurulan normansi kök hücreleri olarak seçildi.

2.4.5. Hipoksi Modeli Oluşturma

İzole edilen yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden 1. ve 3. gruptaki hücreler; ekspansiyon ve diferansiyasyonu da içine alan her basamakta kalıcı hipoksik koşullarda tutuldu. Hücreler oksijen kontrollü (Galaxy 170 R, New Brunswick) inkübatörde %2 O₂, %5 CO₂ ve % 93 N₂ oranlarından oluşan ortamda kültürü sağlandı (46).

2.4.6. Normansi Modeli Oluşturma

2. ve 4. gruptaki hücreler ise %21 O₂, %5 CO₂ ve %74 N₂ oranlarından oluşan ortamda kültüre edildi.



Şekil 14: Ekimden 6 saat sonraki MKH görüntüsü

2.5. *In Vitro* Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin *in vitro* ortamda gerekli koşullar sağlanarak çoğaltılması işlemidir. Hücre kültürü çalışmalarının ortamın kontrol altında tutulabilmesi, hücrelerin üzerindeki etkilerin doğrudan doğruya gözlenebilmesi ve organizmada karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmaların *in vitro* ortamda yapılabilmesi gibi avantajları vardır.

2.5.1. Hücrelerin Ekspansiyonu

İzole edilen primer hücre kültürü örneklerinin çoğaltılması için ilk 10 gün boyunca % 8 otolog serum, %1 Penisilin-Streptomisin (Lonza 10K/10K 100 ml 17-602E), %1 L-Glutamin (Lonza 200 mM 500 ml-17-605F) içeren DMEM F12 (Gibco) kültür mediumu kullanılarak hazırlanmıştır. 10 gün sonrasında serum yüzdesi %5'e düşürülerek devam edilmiştir.



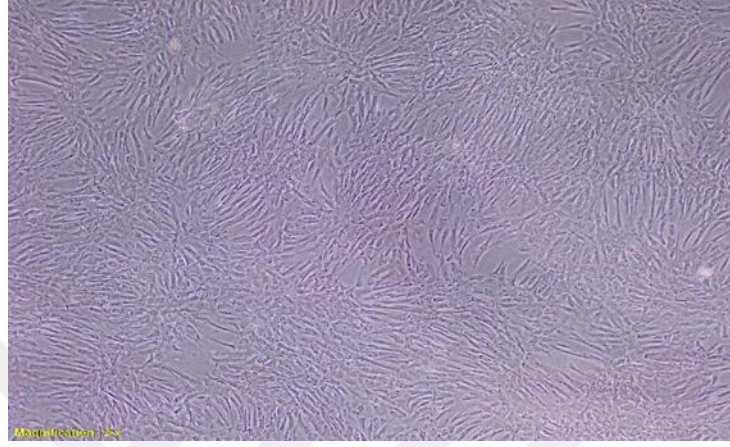
Şekil 15: Hücre kültürü için gerekli besiyerleri

Hücreler yatay konumdaki 25 ve 75 cm²'lik filtreli kapaklı flasklar (Orange scientific-4410200N) içerisinde kültür edilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşana kadar geçen süreçte hipoksik grubu (Galaxy 170 R, New Brunswick) inkübatörde %2 O₂, %5 CO₂ ve % 93 N₂; Normansi grubu ise %21 O₂, %5 CO₂ ve % 74 N₂ inkübatörde kültüre edilmiştir. Dondurma işlemi için ayrılan hücreler daha sonraki basamaklarda kullanılmak üzere dondurularak -196 °C'de sıvı azot tankında buhar fazda saklanmışlardır. Hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarını gözlemek amacıyla Olympus CH30 inverted mikroskobu kullanılmıştır. Hücrelerin ortam değişimi, pasajlama, dondurma ve çözündürme işlemleri laminar akım kabininde (ESCO Class II, Biological Safety Cabinets) gerçekleştirilmiştir.

2.5.2. Hücrelerin Pasajlanması

Ekspansiyonu sağlanan, yoğunluğu %80-90 oranlara ulaşan primer hücre kültürü örneklerinin pasajlanma işlemi hücreleri yüzeyden kaldırmak için % 0.25'lik tripsin (BI, Trypsin EDTA Solution B, Cat. No: 03-052-1B) hücre yüzeyini kaplayacak şekilde flaska eklenmiş ve 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerine besiyeri eklenmiş ve santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda supernatant

uzaklaştırılmış milimetredeki sayıları 10^5 - 10^6 aralığında kalacak şekilde pasajlanmış 2 günde bir besiyeri değişimleri yapılmıştır.



Şekil 16: İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki mikroskop görünümü.

2.5.3. Canlılık Tayini

Tripan mavisi ile canlılık tayini;

Tripan mavisi (Biological industries Cat. No:03-102-1B) negatif yüklü bir boya olup hücre canlı ise, boyanın hücre içine girmesine izin vermeyeceğinden hücreler şeffaf renkte görünürken canlı olmayan hücreler boyayı absorbe ederek mikroskop altında mavi renkte görülürler. Canlılık tayini 50 μ l hücre ve 50 μ l tripan mavisi boyası karıştırılarak Neubauer lamına pipetlenip 4x4'lük karelerden oluşan 4 adet alanda bulunan hücreler ışık mikroskobu altında bakılarak sayılmış ve ortalamaları hesaplanmıştır. Hücrelerin canlılık yüzdelerini bulmak için canlı hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanmıştır. Canlı hücre sayısını dilüsyon faktörü ve 2×10^4 ile çarparak milimetredeki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{Viabilite (\%)} = (\text{canlı hücre sayısı} / \text{toplam hücre sayısı}) \times 100$$

Nanotek Arthur™ cihazıyla canlılık tayini;

Çalışmada elde edilen taze pellet, çözündürme sonrası ve pasaj aralarında total hücre, canlı ve ölü hücre sayısına/yüzdesine ulaşmak için Arthur™ (Nanotek) cihazı kullanılmıştır. Hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak ve içerisine 1 µl Propidyum iyodür (PI) boyası konulmuş ve pipetajı yapılmıştır. 15 dk karanlıkta inkübasyon sonrası içerisinden 25 µl alınarak cihaza özel lama pipetlenerek okutturulmuştur. 3 ayrı kanala (parlak zemin, kırmızı ve yeşil floresan) sahip olan Arthur™ cihazı sayesinde kısa sürede hücre sayımı, canlılığı, Anneksin V apoptoz ve hücre döngüsü analizleri yapılabilmekte ve sonuç grafiği elde kaydedilebilmektedir.



Şekil 17: Nanotek Arthur™ Cihazının Dış Görünümü

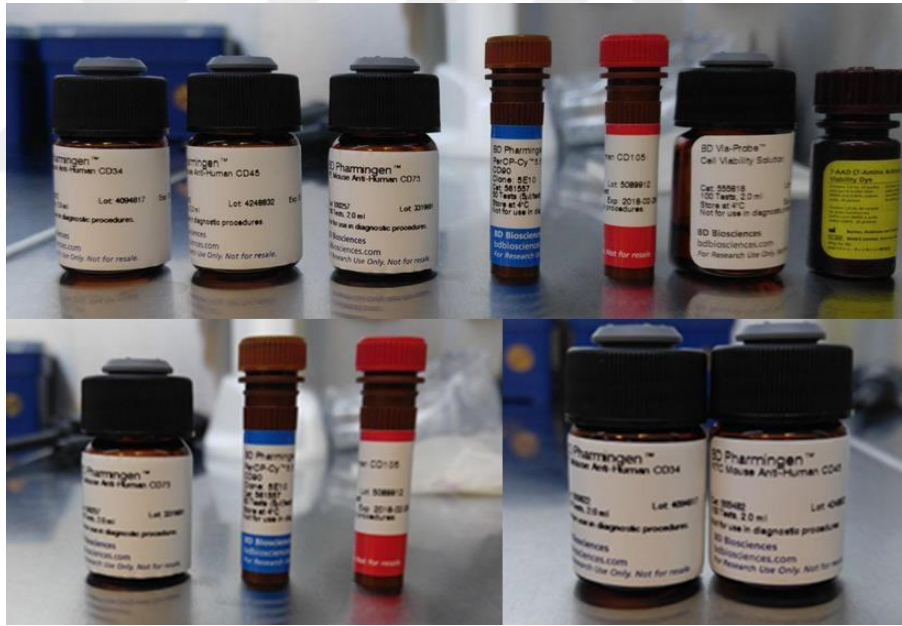
2.5.4. Akım Sitometri İle İmmunfenotipleme

Akım sitometrik analizler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D da gerçekleştirilmiştir. Kültürü devam eden hücreler 1., 2. ve 3. pasajda, dondurma çözündürme basamağı sonrasında PE-anti-human CD73, Hu CD90 Percp-cy5.5, Hu CD105 APC, PE-Anti-Human CD34 ve FITC-Anti-Human CD45 primer antibodileri

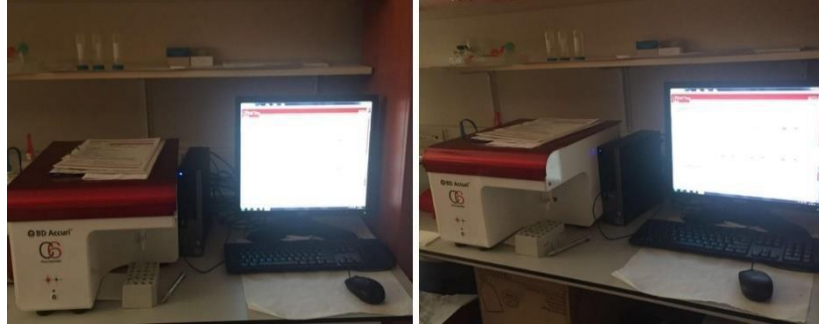
ile üretici firma talimatlarına göre işaretlendi. PBS ile yıkayıp, kalibrasyonu önceden yapılmış olan BD Accuri™ C6 Akım sitometri cihazı ile analizi yapıldı.

Prosedür şu şekildedir;

- Trucount tüplere 20 µl CD 73, 5 µl CD 90, 5 µl CD 105, 5 µl CD 34 ve 20 µl CD 45 antibody leri pipetle aktarılır.
- 1x10⁶ hücre içeren 100 µl kök hücre ilave edilir, vortekslendikten sonra 20 dk karanlıkta inkübasyona bırakılır.
- 1:9 oranında dilue edilen Lysing Buffer solüsyonundan 2 ml eklenerek vortekslenir, 10 dk karanlıkta inkübe edildikten sonra BD Accuri™ C6 Akım sitometri cihazı ile analizi yapılır.



Şekil 18: Akım sitometri analizinde kullanılan markırlar



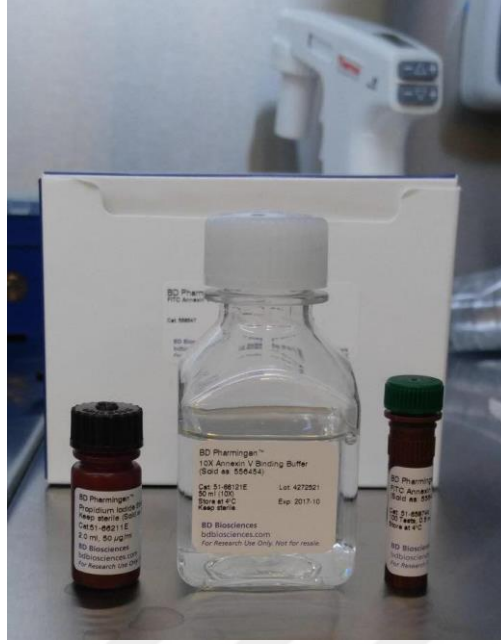
Şekil 19: BD Accuri™ C6 Akım sitometri cihazı

2.5.5. Apoptoz/Nekroz Tayini

Çözdürülmüş ve kültürü devam eden hücreler 1., 2. ve 3. pasajda; Annexin V- FITC (BD Pharmingen Cat no: 556547) apoptoz belirleme kitiyle hücrelerin apoptotik/nekrotik yüzdelерinin eldesi yapıldı. Kontrol grubu olarak taze hücreler kullanıldı (7,47) .

Genel popülasyonun apoptoz / nekroz oranı tespiti için;

- Hücreler 2 defa soğuk PBS ile yıkandı. 1x Binding Buffer ile konsantrasyon 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı
- Elde edilen hücre solüsyonundan 100 μ l (1×10^5 hücre) 5 ml'lik kültür tüpüne alındı (12x75 mm'lik falcon tüpü de kullanılabilir).
- 5 μ l Annexin V ve 5 μ l PI pipetlenir. 15 dk, oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi.
- 400 μ l 1x Binding Buffer eklenir. 1 saat içinde akım sitometrisinde okutuldu.



Şekil 20: Hücre ölümü analizleri için kullanılan boya ve solüsyonlar

2.5.6. Hücrelerin Çoğalma Karakterlerinin Tespitleri

Her 2 grubunda plating efficiency, max PDs, DT ve saturasyon densisiteleri ölçüldü (63,115).

Plating Efficiency;

- Her 2 gruptaki hücreler, 1. Pasajda; cm^2 de 20 hücre olacak şekilde 25 cm^2 lik kültür flasklarına ekildi.
- %8 (ya da %5) otolog serum destekli ekspansiyon medyumunda yayıldı,
- Kültürden 2 hafta sonra oluşan koloniler metanol ve (%0,1) kristal viole boyasıyla fikse edildi.
- 30 hücreden fazla hücre içeren koloniler direk mikroskopik gözlemlerle manuel sayıldı.
- Skor koloniler için, her MKH örneği 3 tekrarlı ve bağımsız 2 gözlemci tarafından skorlandı.

Plating Efficiency; formülle hesaplandı: $\text{Kolonisi sayısı} / \text{Başlangıç hücre sayısı} \times 100$.

PDs (Population doubling) ve DT (Doubling time)

Gruplara ayrılan hücrelerin proliferasyon potansiyellerinin belirlenmeleri için populasyon katlama seviyesi (population doubling level=PDL) ve ikilenme süresi (doubling time=DT) hesaplandı. Bu verilerin hesaplanması için hücreler, başlangıçta belirli sayıda hücre (1×10^6) 25 cm^2 lik flasklara ekilip ve gruplara göre belirlenen büyüme koşullarında inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin ekimi başlangıç kabul edilip 7 gün boyunca her gün hücreler tripsinizasyonla kaldırılıp ve tripan mavisi boyası ile neubaer lamında sayımları yapıldı. Sayımlar, güvenilir olabilmesi için iki farklı kişi tarafından üç tekrarlı olarak yapıldı. Elde edilen sayıların doğrultusunda, aşağıdaki formüller yardımıyla PDL ve DT verileri hesaplandı.

$$DT = T \ln 2 / \ln(X_e / X_b)$$

DT: Doubling time

T: İnkübasyon süresi (gün ya da saat)

X_b: Başlangıç hücre sayısı X_e: Son hücre sayısı $PDL = 3.32(\log X_e - \log X_b) + S$

PDL: Population doubling level

X_b: Başlangıç hücre sayısı X_e: Son hücre sayısı

Saturasyon Yoğunluğu;

- 1. pasajda hücrelere tripsin uygulandı, sayımı yapıldı ve son konsantrasyon cm^2 de 1000 hücre olunca 25 cm^2 'lik flasklara alındı,
- Konfluent oluncaya kadar kültürler her gün mikroskopta gözlemlendi,
- Hücreler hemositometreye ilave bir artış oluncaya kadar 2 günde bir sayıldı.

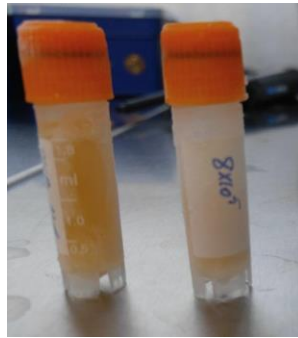
2.5.7. Kriyoprezervasyon Yöntemi

Elde edilen primer kültürünün üçüncü pasajı sonrasında hem hipoksi hemde normansi grubundan hücreler; Kriyotüplerde %4 DMSO, %6 Trehaloz, %20 otolog serum, %70 DMEM F12 varlığında $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ de 30 dk, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ de 1 saat bekletildikten sonra $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ sıvı azota alındı. Dondurmanın kademeli yavaş oluşu buz kristalleri oluşumundan korur. DMSO, intrasellüler buz oluşumlarından kaynaklı hücre hasarını azaltmak için

kullanılan permeabl bir kriyoprotektandır. Trehaloz, hücre membranını koruyabilen nonpermeabl bir kriyoprotektandır.

2.5.8. Hücrelerin Çözdürülmesi

Üçüncü pasaj sonrası dondurulmuş olan hücrelerin bulunduğu kriyo vialler buz üzerine alınarak, %5 lik otolog serum içeren kültür medyumunda su banyosu kullanmadan çözdürüldü. Steril pipet ile yavaş yavaş besiyeri ile beslenen hücreler 15 lik falkon tüplere alındı hemen 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj cihazında (Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400) santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet süspansiyon edilmiş üzerine taze besiyeri damla damla bırakılmıştır. Aynı şartlarda bir santrifüj işlemi daha gerçekleştirildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp pellet süspansiyon edilmiş ve üzerine taze besiyeri eklenen hücrelerin flasklara ekim işlemi uygulanmıştır. Hipoksi grubu (%2 O₂, %5 CO₂, 37°C'de) ve Normansi grubu ise (%21 O₂, %5 CO₂, 37°C'de) ortamlarda haftada 2 kere besiyeri değiştirilerek kültüre edilmiştir.

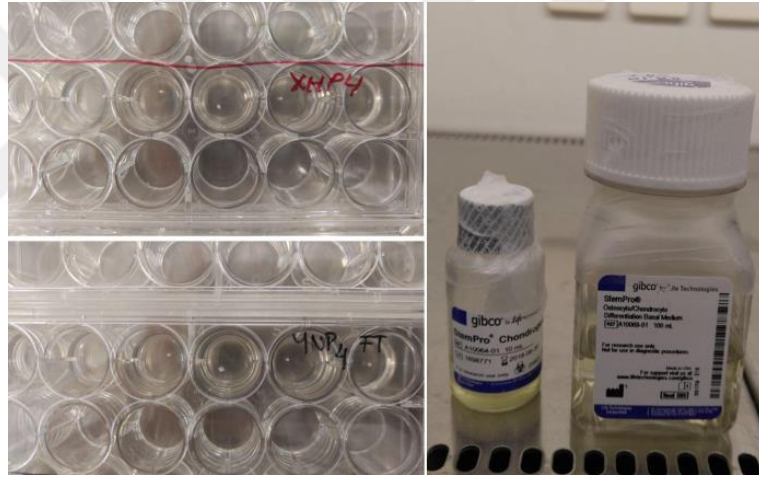


Şekil 21: Hücre sayısı belirlenip kriyoviyalde saklanan MKH'ler

2.6. Hücrelerin *In Vitro* Farklılaştırılması

Her 4 gruptaki hücrelerde StemPro[®] Chondrogenesis Differentiation Kit kullanılarak Ahrens ve ark ile Malladi ve ark çalışmalarından modifiye edilerek mikro kütle tekniği

ile kondrojenik yönde otolog serum kullanarak diferansiye edildi. İn vitro farklılaşma uygulanacak 4 deney grubundaki hücrelerde 25 cm² lik kültür kaplarında hipoksi ve normansi ortamda çoğaltılırlar. Hücreler kabı yüzeyini %70-90 oranında kapladığı zaman tripsinle ayrılmaları sağlanır. 1x10⁷ konsantrasyonundaki hücrelerin büyüme medyumuyla tripsin blokajı sağlanır. 10 µl' lık damlacıklar halinde mikromass tekniği ile kültür kaplarına alınan hücreler hipoksi ve normansi olarak 37°C' de 2 saat inkübe edildi. StemPro® kondrojenik indükleme medyum kültür kabına dikkatlice eklendi. Bir kültür kabı ise kontrol grubu olarak hazırlandı. Farklılaşma ortamı 3 günde bir değiştirilip, kültür kapları her gün kontrol edildi. Kondrojenik farklılaşmanın beklendiği hücrelerin farklı yöntemlerle tayini yapıldı (63,116,117).



Şekil 22: 24 well plate içerisinde farklılaşan kıkırdak yapısı ve farklılaşma medyumunu

2.6.1. Kondrojenik Farklılaşmanın Alcian Mavisi ile Histolojik Tayini

Doku Takibi, Gömme ve bloklama

- Parçalar % 4 paraformaldahit (Sigma-Aldrich-158127 Paraformaldehyde powder (95%)) (veya % 10 formalin) çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle bekletilerek fikse edildi (Parça boyutuna göre farklılık gösterir).

- 30 dakika PBS- Bioshop PBS (Phosphate buffered saline tablets) tamponunda bekletilerek yıkandı.
- 1,5 saat % 80 Etanol,
- 1 saat % 95 Etanol I,
- 1 saat % 95 Etanol II,
- 1 saat % 100 Etanol I (107017 - Merck Ethanol absolute),
- 1 saat % 100 Etanol III'de bekletilerek dehidretasyon işlemi gerçekleştirildi.
- Ksilol ile şeffaflandırma aşamasına geçildi (Ksilol I 30 dakika, Ksilol II 30 dakika).
- Şeffaflandırma aşamasını sonrası 60°C etüvde erimiş parafin (Tek Path 10 KG boncuk Paraffin) içerisine alınan parçalar Parafin- I 30 dakika, Parafin -II 30 dakika bekletildi.
- Ertesi gün etüvden çıkarılan parçalar bloklandı (118).

% 10 Nötral Buffer Formalin

- Formalin (%37 Formaldahit) 100 ml
- PBS 900 ml

% 4 Paraformaldahit

8 gr paraformaldehit hassas terazide tartılarak 100 ml distile suya konulur. Sıcaklığı 58°C'yi geçmeyecek şekilde ısıtıcı üzerinde sürekli karıştırılarak renginin saydamlaşması beklenir. Rengi saydamlaştıktan sonra soğuması beklenerek süzülür. Elde edilen %8'lik paraformaldehit (Stok solüsyon) kullanıma hazır hale getirilmesi için aynı miktarda fosfat tamponuyla karıştırılması ve %4'lük hale getirilmesi gerekmektedir. Daha sonra pH 7.2 olacak şekilde ayarlanır.

Kesit Alma

- Işık mikroskopik incelemeler için mikrotomda (Leica RM 2145) 5 µm'lik kesitler alınarak 37°C su banyosunda kesitlerin açılması sağlandı.
- Tercihe göre rodajlı ve polilizinli lamalar üzerine doku kesitleri alındı.
- Tüm kesitler 1 gece 37°C'lik etüvde tutularak lam üzerine yapışmaları sağlandı.

- Kesitler 62°C'lik etüvde 2 saat bekletildikten sonra ksilol 1'de 1 saat, ksilol 2'de 1 saat tutularak parafinden uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi.

Alcian Blue Boyama Metodu

- Kesitler deparafinize edilir
- Yıkayıp distile suya alınır.
- Alcian Blue solüsyonunda 30 dk bekletilir.
- Distile suda yıkanır.
- %96'lık alkollerde yıkanır.
- Aseton ve ksilolden geçirilir.
- Balzamlarla kapatılır (119).

2.6.2. Kondrojenik Farklılaşmanın Anti-Kollojen II ile İmmunohistokimyasal Tayini

- Kesitler, bir gece 60°C etüvde ve soğuduktan sonra 3x30 dakika ksilolde tutuldu.
- Sırasıyla %95, %80, %70 ve %60'lık etil alkolde 2'şer dk bekletildi.
- Kesitler distile su ile 10 dk yıkandı ve çevreleri sınırlayıcı kalem (Sigma PAP pen - Z377821 - for immunostaining 5 mm) ile çizildi.
- PBS (1X) (Phosphate Buffered Saline) solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Kullanılacak antikor için önerilen "antijen retrieval" yöntemi uygulandı (0,01 M sitrat tampon (S1804 Sigma-Aldrich Trisodium citrate dehydrate) içerisinde 90° C mikrodalgada 30 dk).
- Örnekler soğutulduktan sonra 5 dakika % 0,25 Triton X-100 (X100 Sigma-aldrich Triton™ X-100 laboratory grade) PBS' de bekletildi.
- Endojen peroksit (Sigma 107209 - Hydrogen peroxide 30%) blokajı yapıldı, distile su ile seyrelterek (% 3 H₂O₂) (5 dakika).

- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandıktan sonra kesitler üzerine bloklama solüsyonu (veya % 1 BSA-PBS) (non-immun serum) damlatılarak 1 saat beklenildi.
- Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırıldı ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda bir gece 4°C'de bekletildi (Primer antikor dilüsyonları PBS ile 1/100, anti kollojen II).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor (ScyTek SHP 125 SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack) damlatılıp, kapalı nemli kutuda 30 dk oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. DAB (3,3-diaminobenzidine) (ScyTek ACK 500 DAB Chromogen/Substrate Bulk pack) solüsyonu damlatılıp, 8 dk kapalı nemli kutuda bekletildi ve tekrar PBS solüsyonu ile 3X5 dk ve distile su ile yıkandı.
- Mayers'in hematoksilin (109249- Mayer's hemalum solution) ile Nükleus boyanması kontrol edilerek 2 dk boyama yapıldı.
- Distile su ile yıkandı.
- Sırasıyla % 80, % 95 ve % 100'lük etil alkolde 1'er dk bekletildi.
- Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dk ksilolde şeffaflaştırıldı.
- Entellan ile kesitler kapatıldı (120).

Sodyum Sitrat Tamponu (10mM Sodyum sitrat, pH 6.0):

Tri-sodyum Sitrat (dihydrate) ----- 2.94 g

Distile Su----- 1000 ml

3 ay boyunca oda sıcaklığında, daha uzun saklanılacaksa +4°C' de muhafaza edildi.

2.6.3. Kondrojenik Farklılaşmanın RT-PCR İle Aggrecan Tespiti

Örnek Toplanması ve RNA izolasyonu;

1,5 ml'lik tüp içerisindeki örneklere aşağıdaki protokol uygulandı.

- Tüplere 1 ml tripure eklenir ve tüpler 45 saniye vortekslenir. Böylece tüpteki hücreler homojen bir görünüm alarak parçalanır ve tripure reagent etkisiyle de pembe bir renk görünümünü alır.

- Vortekslenen tüpler buza alınır ve 2 dakika bekletilir. Vortekste o hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak için bu işleme başvurulur.

- 5 dakika oda ısısında bekletilir.

- Tüplere 200 µl kloroform eklenir ve 5 dk beklenir. (Kloroform; homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlar. Böylece RNA, DNA ve protein elde edilir).

- 12.000 rpm' de 4°C 'de 20 dk santrifüj yapılır.

- Santrifüj sonunda 3 faz oluşur.

1.Faz (Sulu faz): RNA içerir (renksizdir)

2.Faz: DNA içerir (beyaz renklidir)

3.Faz: (Organik faz): Protein içerir. (kırmızı renktedir)

- RNA izolasyonu için renksiz olan 1.faz yeni tüpe aktarılır.

- Yeni tüpe 500 µl izopropanol eklenir. Oda ısısında 10 dakika inkube edilir.

- İzopropanol RNA' yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanılır.

- 12.000 rpm' de 4 C' de 10 dak santrifüjlenir. Süpernatant atılır.

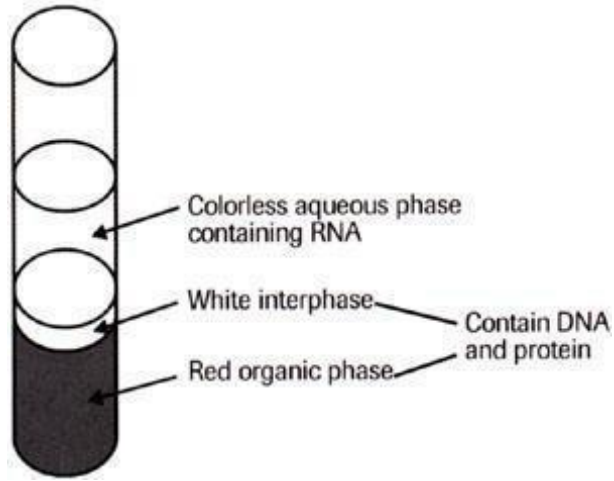
- Oluşan çökelek üzerine 1 ml %75 EtOH eklenir.

- 7.500 x g' de 4°C'de 5 dak santrifüjlenir.

- Santrifüj sonunda süpernatant atılır.

- 57°C' de EtOH uçurulur.

- Kalan çökeleğe 50-100 µl RNase free su eklenerek pipetaj yapılır.



Şekil 23: RNA izolasyon prosedürü

İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlenir. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edilir, ideal saflıktaki kaliteli RNA'nın A_{260}/A_{280} absorbans oranının 1,8- 2,0 olması beklenir. Spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA degradasyonunun kontrolü agaroz jel elektroforeziyle gerçekleştirilebilir. Genel olarak reaksiyon başına 5ng total RNA'nın ortalama düzeyde ifade edilen mRNA tespitinde yeterli olacağı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak gen ifadesi bakılacak materyalin özelliğine bağlı olarak RNA miktarı reaksiyon başına 5 ng ile 5 μ g arasında alınmalıdır.

cDNA SENTEZİ

cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Her örnek için RNA+H₂O'dan 11 μ l konur ve 2 μ l Random hexamer primer (vial 6) eklenir.

RNA örneği.....11 μ l

Random hexamer primer (vial 6)2 μ

Toplam.....13 μ l

Tüpler thermalcycler a yerleştirilir. 65 °C' de 10 dk RNA'lar denatüre edilir.

Bu arada master miks hazırlanır. (Bu miktarlar örnek sayıyla çarpılarak hazırlanır).

Tek Reaksiyon için

Reaction Buffer (vial 2)4 µl

Protector RNase Inhibitor (vial 3)0,5 µl

Deoxynucleotide Mix (vial 4) 2 µl

Transcriptor Reverse Transcriptase (vial 1) 0,5 µl

Toplam.....7 µl

Thermalcycler dan alınan örnekler soğutma kabına yerleştirilir. Her tüpe 7 µl hazırlanan karışımdan dağıtılır ve pipetle 3-4 kez karıştırılır. Tüpler thermal cycler a yerleştirilir ve aşağıdaki hazırlanmış program çalıştırılır.

25°C 'de 10 dk

50 °C'de 60 dk

85 °C'de 5 dk

4 °C'de bekleme

Real-Time PCR (Q-PCR);

Aggrecan target geninin ACTB gen ile çalışılması;

Elde edilen cDNA'lar, yukarıda belirtilen primer, probe ve catalog assay'ler kullanılarak; aşağıdaki miks ve cihaz protokolleri ile LightCycler 480II cihazı ile çalışılmıştır.

Cihaz protokolü;

Program	Denaturasyon	Amplifikasyon		
Parametre				
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu		Yok
Döngü	1	45		
Hedef [°C]	95	95	60	72
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:30	00:00:01
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20
Acquisition Mode	Yok	yok	yok	tek

Şekil 24: PCR çalışma koşulları

Miks Hazırlanması; (tek bir reaksiyon için)

Nükleaz Free su	3.8 µl
Forward Primer (20uM)	0,5 µl
Reverse Primer (20uM)	0,5 µl
Taqman Probe-UPL probe (10uM)	0,2 µl
Enzim ve dNTP miski	10 µl
Toplam	15 µl

ACTB Miks Hazırlanması; (tek bir reaksiyon için)

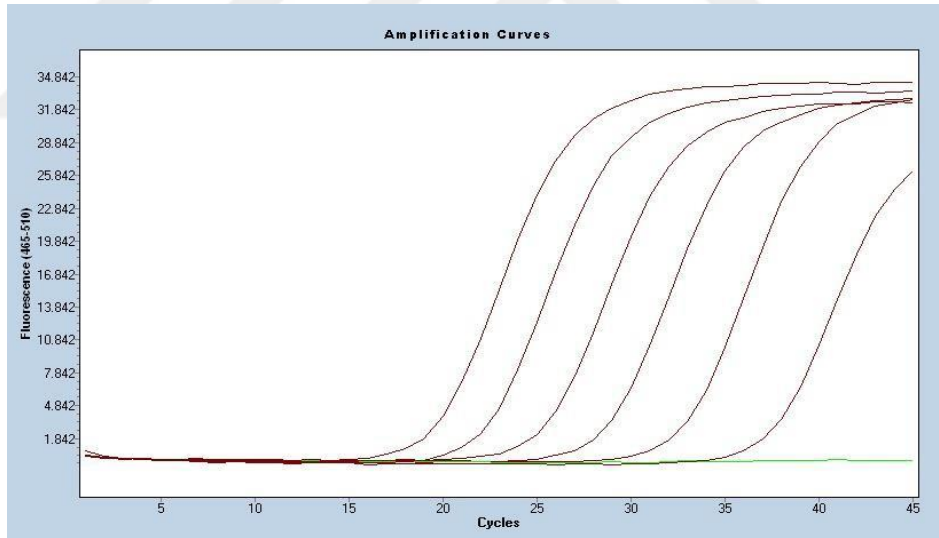
Nükleaz Free su	4.0 µl
Primer- Probe Miksi	1.0 µl
Enzim ve dNTP miski	10 µl

Toplam 15 µl

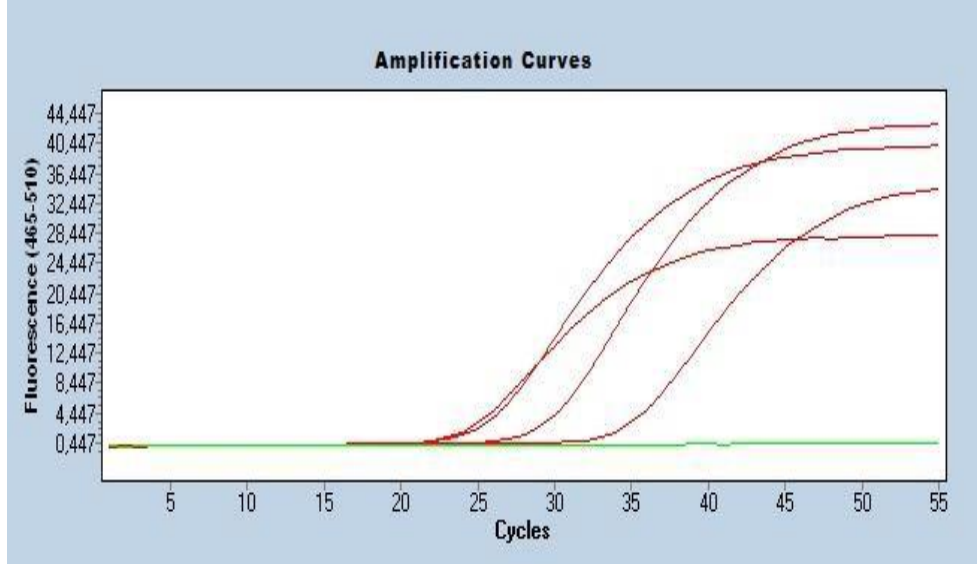
Reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden eklenir. Karışım spin ettirilir ve plate'e her bir reaksiyon için 15 µl reaksiyon karışımından transfer edilir. 5 µl örnek veya kontrol her bir kuyucuğa son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde ilave edilir. Hazırlanan plate (karışım ilave edildikten sonra) santrifüjlenir.

Analiz;

Elde edilen sonuçlar relatif kantitasyon yapılabilmek için Δ/Δ Ct metodu kullanılır. Bu metod ile aggrecaan geninin ct değerleri ACTB geni ile normalize edilir (bu değer Δ Ct olarak geçer) ve gruplar arasında oranlanarak elde edilen sonuç Δ/Δ Ct'yi verir. Pozitif değerler up regülasyonu, negatif değerler ise down regülasyonu ifade eder.



Şekil 25: ACTB geni Amplifikasyon Eğrisi



Şekil 26: Agreccan Geni Amplifikasyon Eğrisi

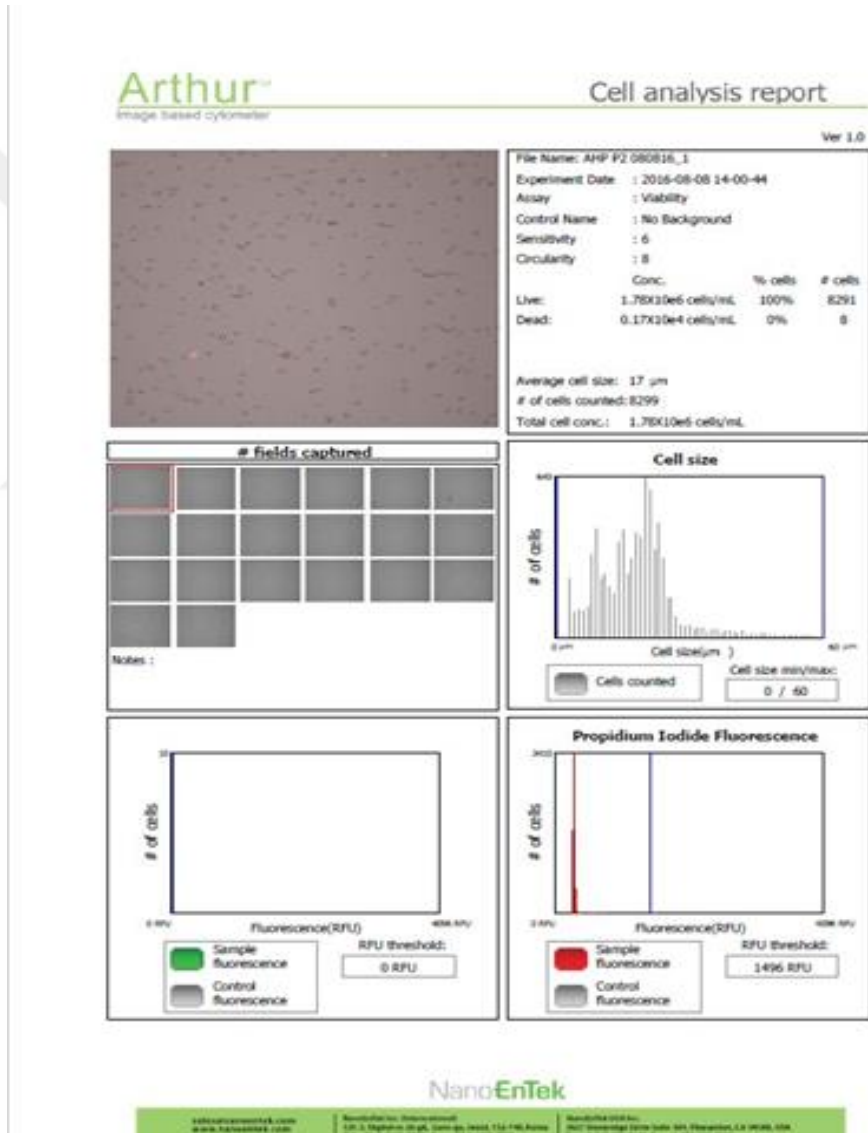
2.7. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi

Nanotek ArthurTM ile canlı ve ölü hücre yüzdesi hesaplaması için her gruba ait veriler Microsoft Office Excel 2010 versiyonu üzerine yazılarak, IBM SPSS Statistic 23.00 (Statistical Package for Social Sciences) programında oluşturulan veri tabanına aktarıldı ve istatistiksel analizler aynı program ile yapılmıştır. Sürekli değişkenlere ait; ortalama, standart sapma ve hata, minimum ve maksimum değerleri ve ortalamalar için %95 güven aralıkları sunulmuştur. 10 tabanına göre logaritmik dönüşüm yapılarak hipoksi ve normansi ortamlarında aynı pasaja ait örneklerin ortalamaları paired T- testi ile yapılmıştır. Tüm hipotez kontrolleri 0.05 önem seviyesinde gerçekleştirilmiş, yani $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

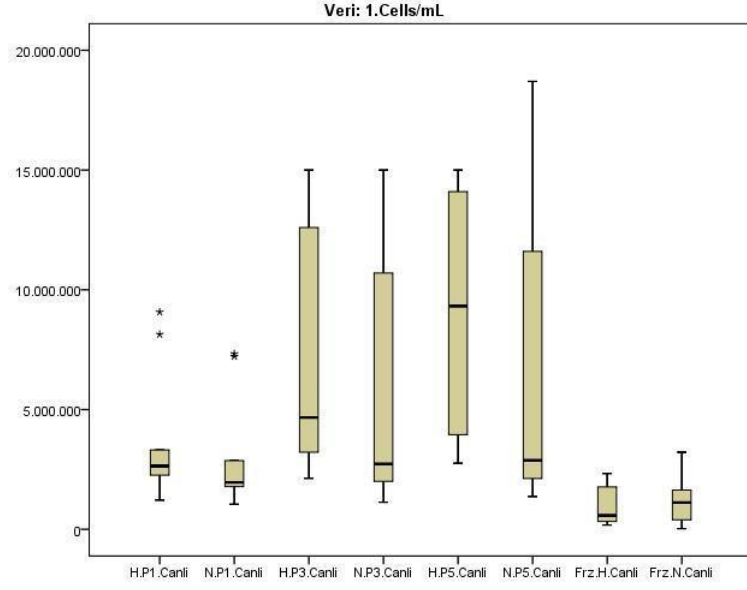
BULGULAR

3.1. Canlılık Analizleri

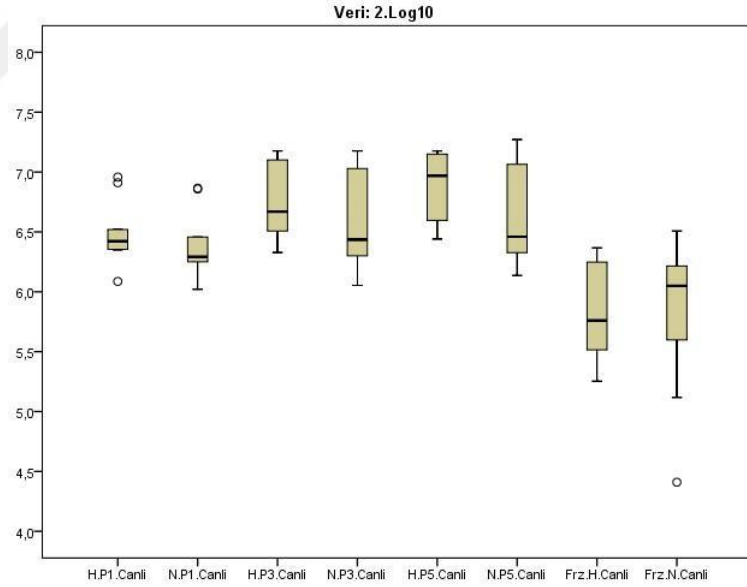
Her pasaja ait örnekler Nanotek Arthur™ hücre analiz cihazında okutulup sonuçlar istatistiksel değerlendirmeye alındı.



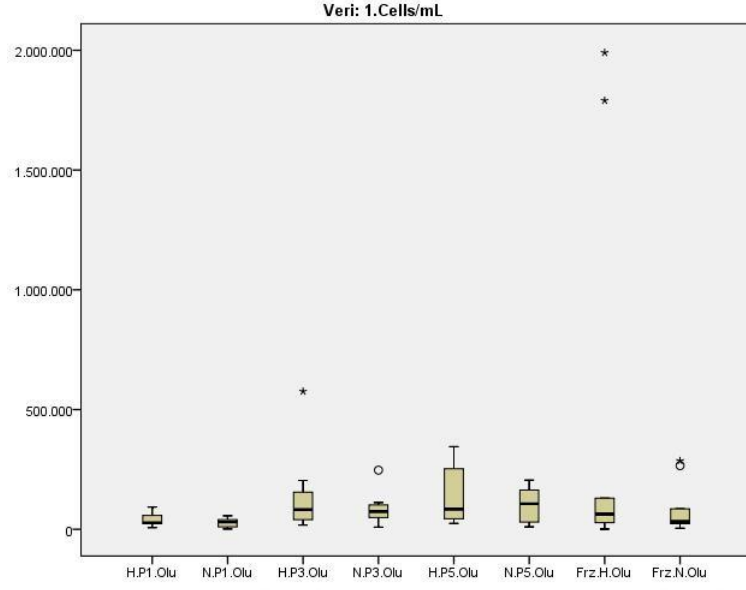
Şekil 27: Nanotek Arthur™ analiz sonucu örneği



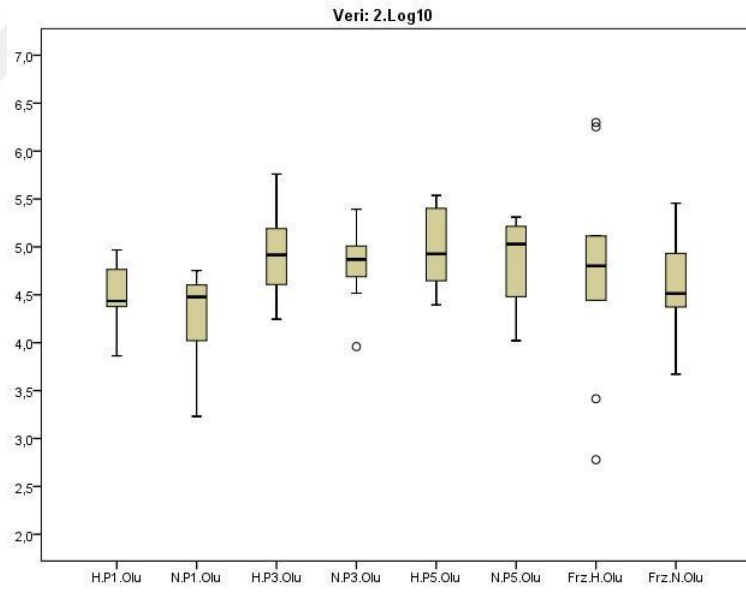
Şekil 28: Canlı hücre sayısının deney gruplarında dağılımı



Şekil 29: Canlı hücre sayısının deney gruplarında logaritmik 10 tabanına göre dağılımı.



Şekil 30: Ölü hücre sayısının deney gruplarında dağılımı



Şekil 31: Ölü hücre sayısının deney gruplarında logaritmik 10 tabanına göre dağılımı

Tablo 4: Deney gruplarına uygulanan istatistiksel analiz

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	H.P1.Canli	6,49416	10	,277152	,092384
	N.P1.Canli	6,37138	10	,307757	,102586
Pair 2	H.P3.Canli	6,78643	10	,344068	,114689
	N.P3.Canli	6,62240	10	,438437	,146146
Pair 3	H.P5.Canli	6,84895	10	,316032	,105344
	N.P5.Canli	6,67791	10	,443354	,147785
Pair 4	Frz.H.Canli	5,84108	10	,433783	,144594
	Frz.N.Canli	5,78653	10	,666415	,222138
Pair 5	H.P1.Olu	4,52114	10	,335929	,111976
	N.P1.Olu	4,26681	10	,512541	,170847
Pair 6	H.P3.Olu	4,90883	10	,479677	,159892
	N.P3.Olu	4,79459	10	,401939	,133980
Pair 7	H.P5.Olu	4,99066	10	,417448	,139149
	N.P5.Olu	4,85089	10	,496596	,165532
Pair 8	Frz.H.Olu	4,72351	10	1,151586	,383862
	Frz.N.Olu	4,63457	10	,572398	,190799

Logaritmik 10 tabanına dönüşüm yapılarak hipoksi ve normansi ortamlarında aynı pasaja ait örneklerin ortalamaları paired T- testi ile yapılmıştır. Tüm hipotez kontrolleri 0.05 önem seviyesinde gerçekleştirilmiş yani $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

		Paired Differences			
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower
Pair 1	H.P1.Canli - N.P1.Canli	,122782	,117782	,039261	,032247
Pair 2	H.P3.Canli - N.P3.Canli	,164029	,162875	,054292	,038832
Pair 3	H.P5.Canli - N.P5.Canli	,171033	,202692	,067564	,015229
Pair 4	Frz.H.Canli - Frz.N.Canli	,054551	,545285	,181762	-,364593
Pair 5	H.P1.Olu - N.P1.Olu	,254328	,354346	,118115	-,018046
Pair 6	H.P3.Olu - N.P3.Olu	,114241	,522798	,174266	-,287616
Pair 7	H.P5.Olu - N.P5.Olu	,139762	,406760	,135587	-,172901
Pair 8	Frz.H.Olu - Frz.N.Olu	,088942	,642777	,214259	-,405140

Paired Samples Correlations

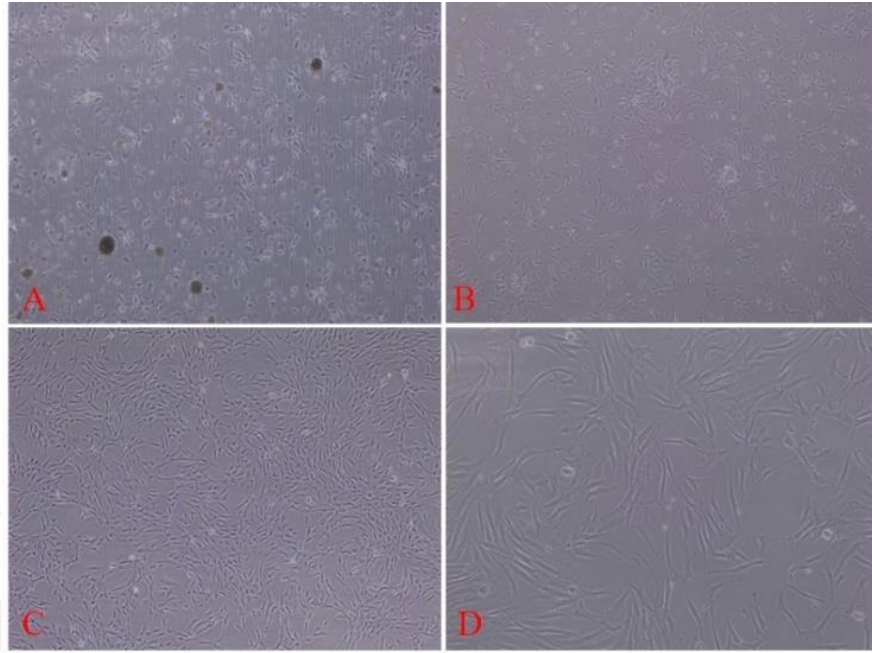
		N	Correlation	Sig.
Pair 1	H.P1.Canli & N.P1.Canli	10	,924	,000
Pair 2	H.P3.Canli & N.P3.Canli	10	,942	,000
Pair 3	H.P5.Canli & N.P5.Canli	10	,911	,001
Pair 4	Frz.H.Canli & Frz.N.Canli	10	,579	,102
Pair 5	H.P1.Olu & N.P1.Olu	10	,726	,027
Pair 6	H.P3.Olu & N.P3.Olu	10	,307	,422
Pair 7	H.P5.Olu & N.P5.Olu	10	,616	,077
Pair 8	Frz.H.Olu & Frz.N.Olu	10	,941	,000

Paired Samples Test

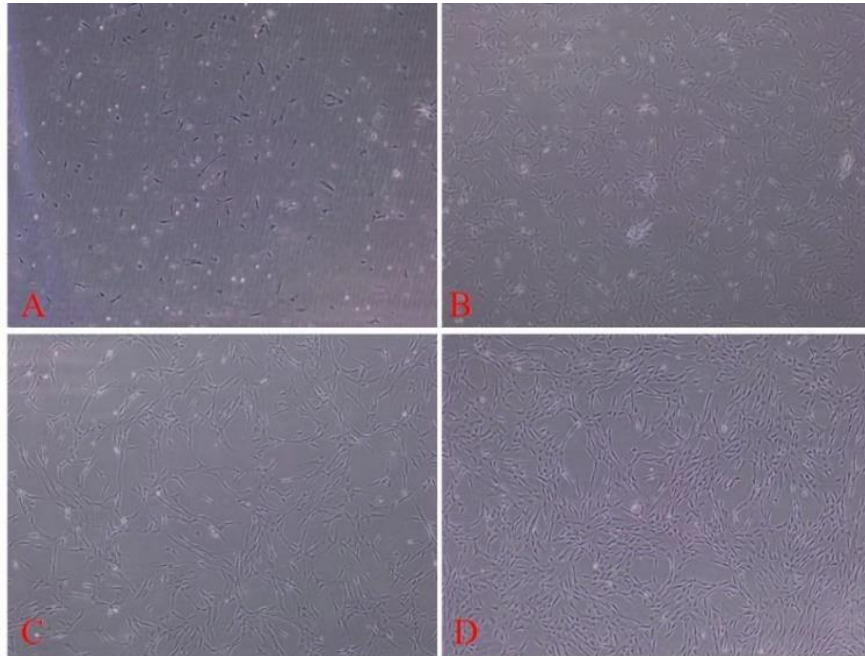
		Paired Differences			
		95% Confidence Interval of the Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
		Upper			
Pair 1	H.P1.Canli - N.P1.Canli	,213317	3,127	8	,014
Pair 2	H.P3.Canli - N.P3.Canli	,289226	3,021	8	,017
Pair 3	H.P5.Canli - N.P5.Canli	,326836	2,531	8	,035
Pair 4	Frz.H.Canli - Frz.N.Canli	,473694	,300	8	,772
Pair 5	H.P1.Olu - N.P1.Olu	,526703	2,153	8	,063
Pair 6	H.P3.Olu - N.P3.Olu	,516099	,656	8	,531
Pair 7	H.P5.Olu - N.P5.Olu	,452425	1,031	8	,333
Pair 8	Frz.H.Olu - Frz.N.Olu	,583024	,415	8	,689

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu Pasaj 1- Hipoksi Canlı hücre – Pasaj 1 Normansi canlı hücre; Pasaj 3- Hipoksi canlı hücre – Pasaj 3 Normansi canlı hücre; Pasaj 5- Hipoksi canlı hücre– Pasaj 5 Normansi canlı hücre sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur ($p < 0,005$). Ölü hücrelerin her pasajdaki sonuçları değerlendirildiğinde grupların hiçbirinde istatistiksel bir anlam elde edilemedi. Dondurma/çözülme hipoksi grubu Dondurma/çözülme normansi grubu istatistiksel karşılaştırılmasına bakıldığında ham verilerde hipoksi yönünde anlamlı olabilecek bir sonuç gözlenirken bunun istatistiksel analize yansımadığı ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p=0,689$).

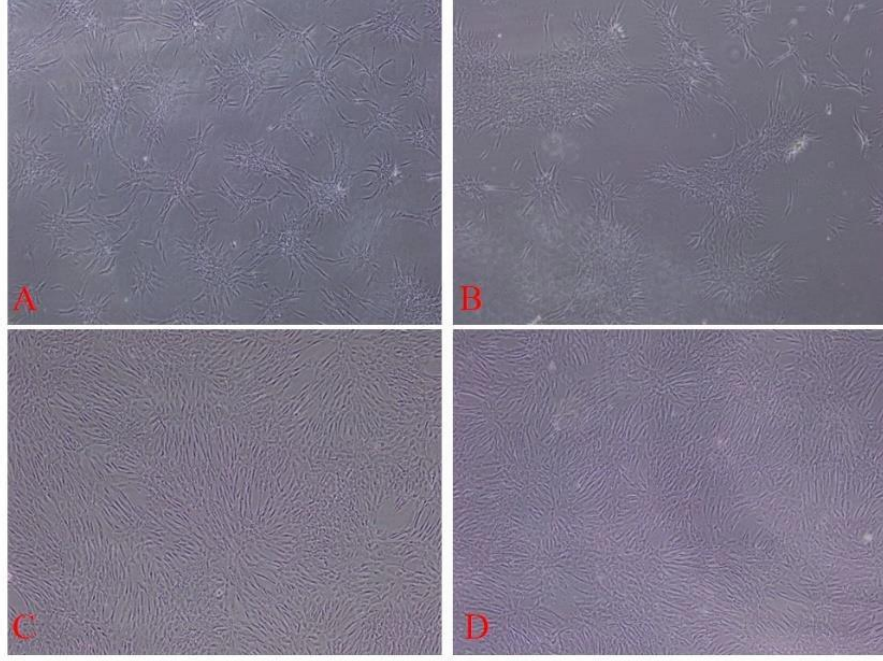
3.2. Pasajlara Göre Hücrelerin Morfolojik Yapısının Değerlendirilmesi



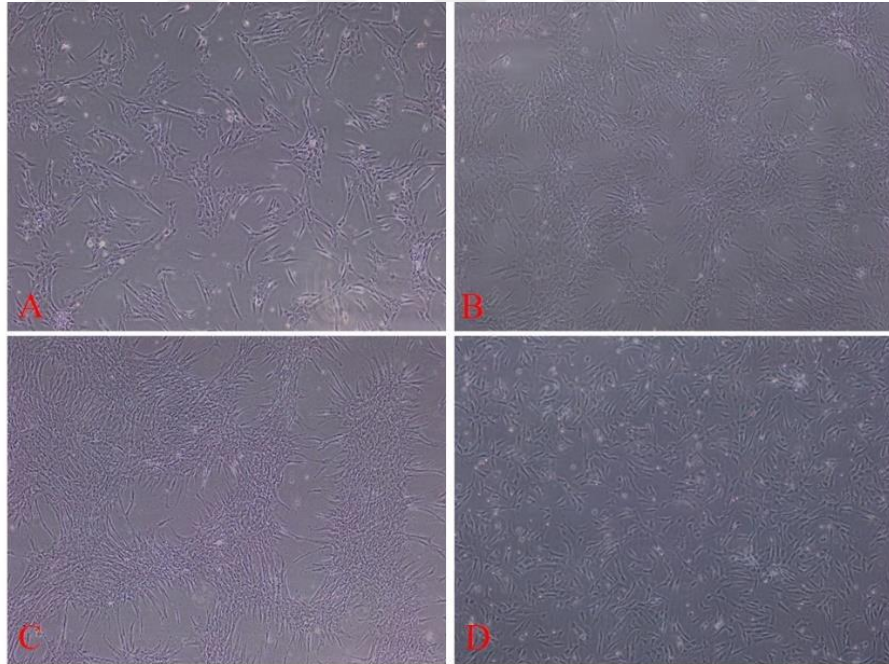
Şekil 32: Pasaj 0 Hipoksi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



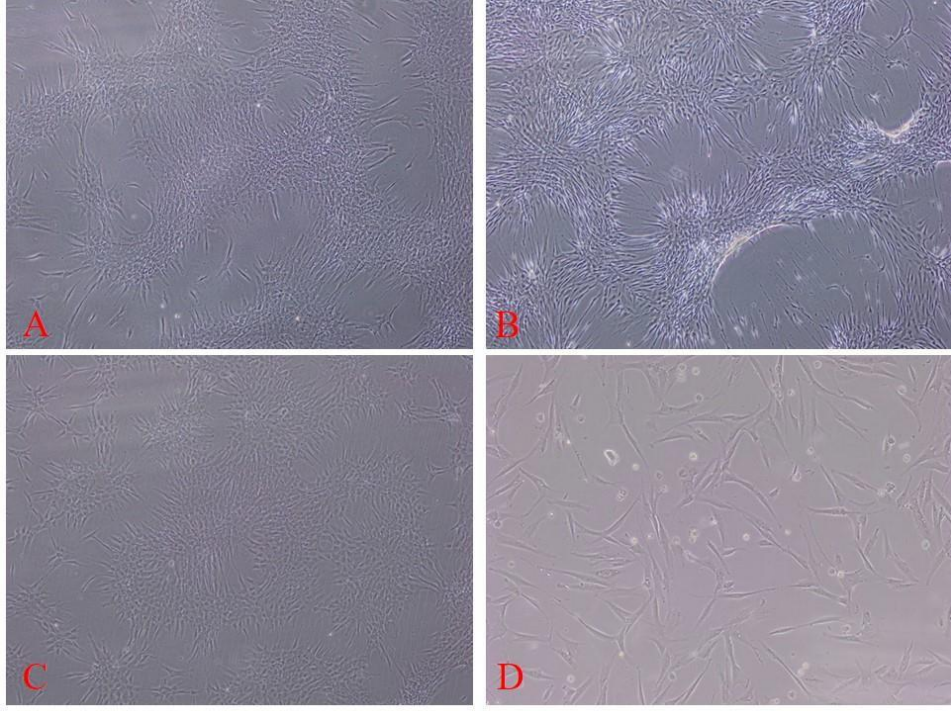
Şekil 33: Pasaj 0 Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



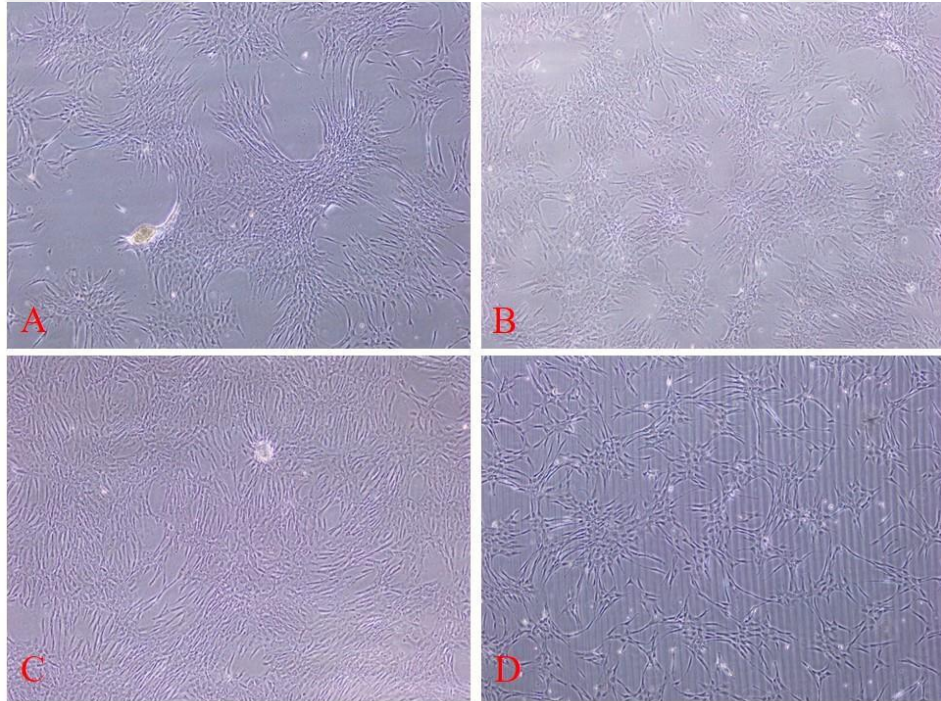
Şekil 34: Pasaj 1 Hipoksi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



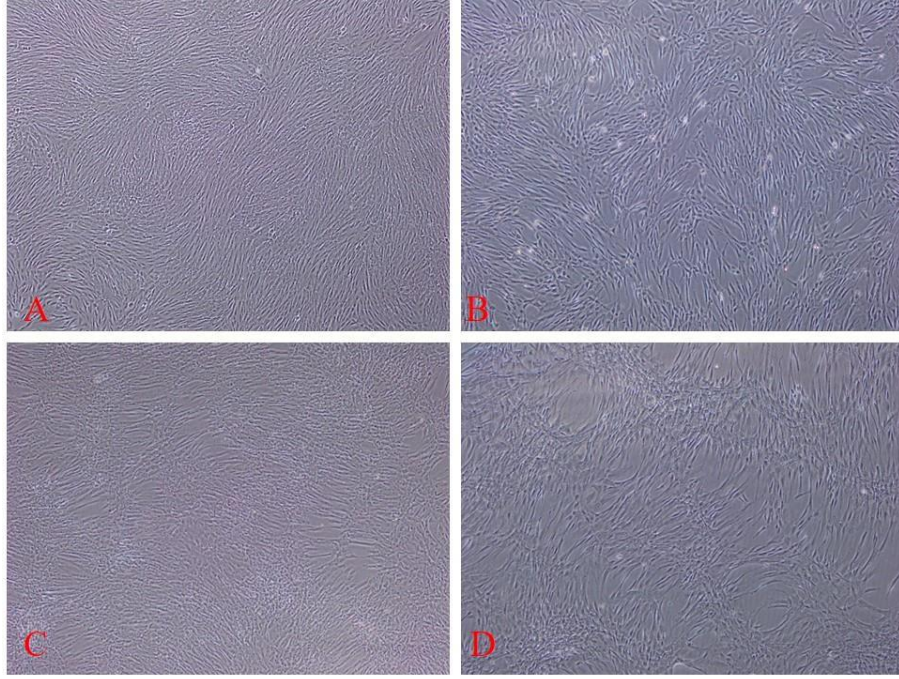
Şekil 35: Pasaj 1 Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



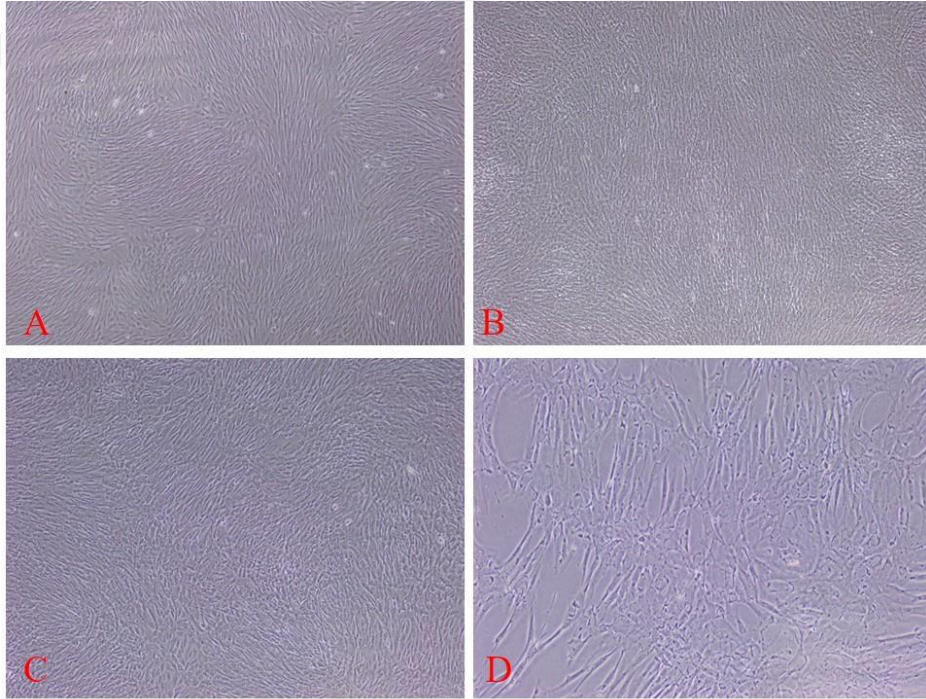
Şekil 36: Pasaj 3 Hipoksi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



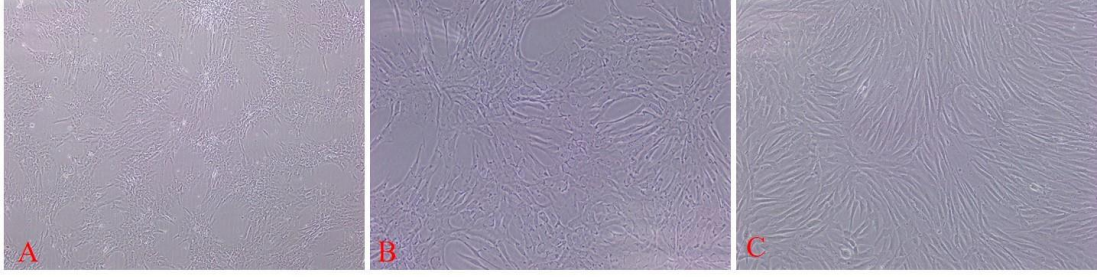
Şekil 37: Pasaj 3 Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



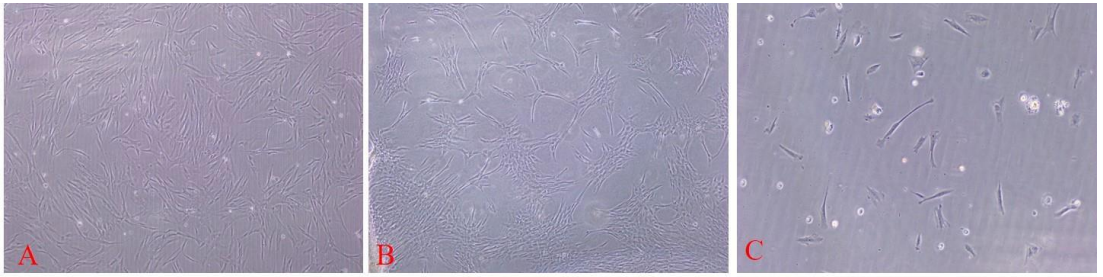
Şekil 38: Pasaj 5 Hipoksi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



Şekil 39: Pasaj 5 Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



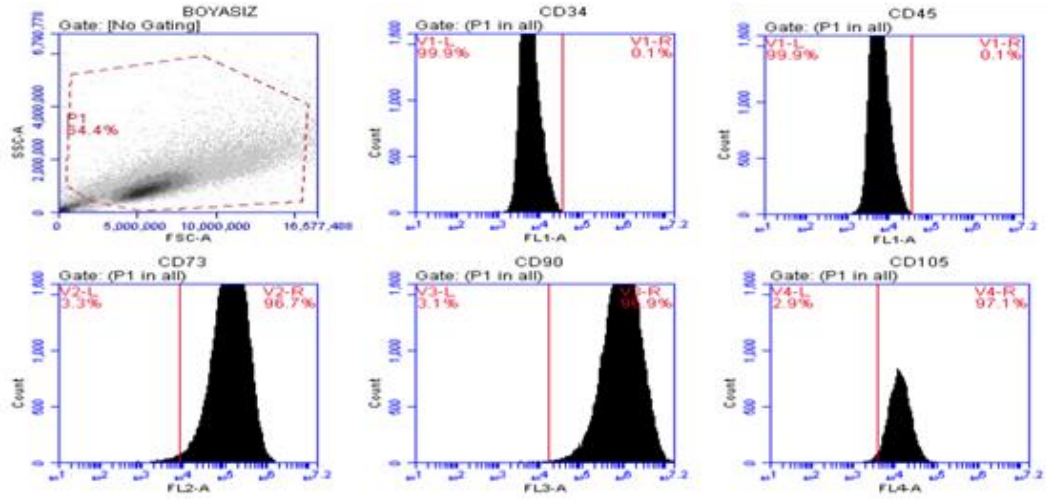
Şekil 40: Pasaj 4 Dondurulup çözölen hipoksik fotoğrafları. X4-10-40 büyütme



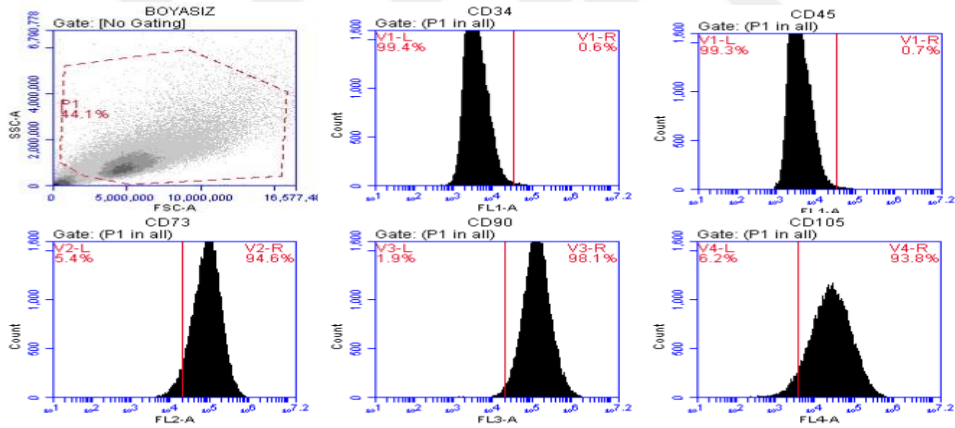
Şekil 41: Pasaj 4 Dondurulup çözölen Normansi MKH fotoğrafları. X4-10-40 büyütme

Genel anlamda bakıldığında hipoksik grupların tümünde normansi gruplara daha hücre yoğunluğunun fazla ve konfluent olma zamanlarının daha kısa olduğu görölmüştür. Hücre debrisi ya da benzeri görüntü veren olası apoptotik cisimlerin normansi gruplarında hipoksilere göre daha yoğun olduğu saptanmıştır.

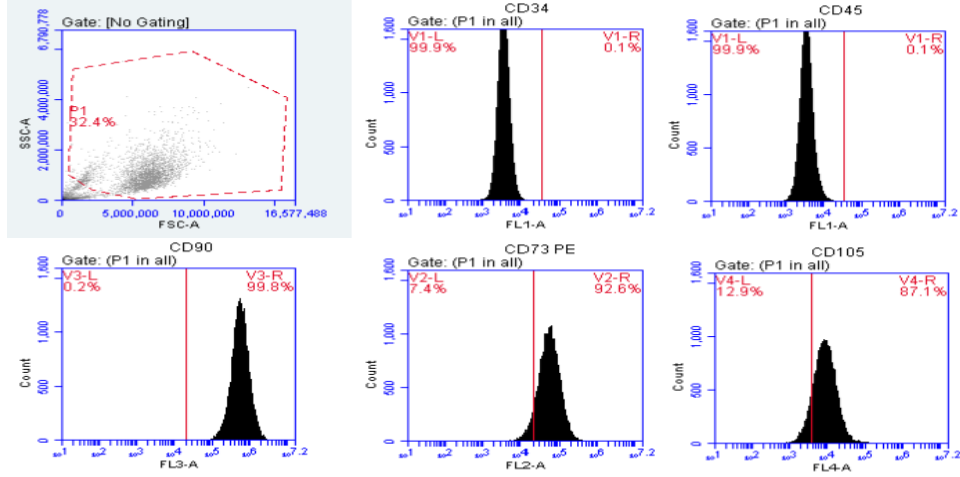
3.3. Akım Sitometrik Bulgular



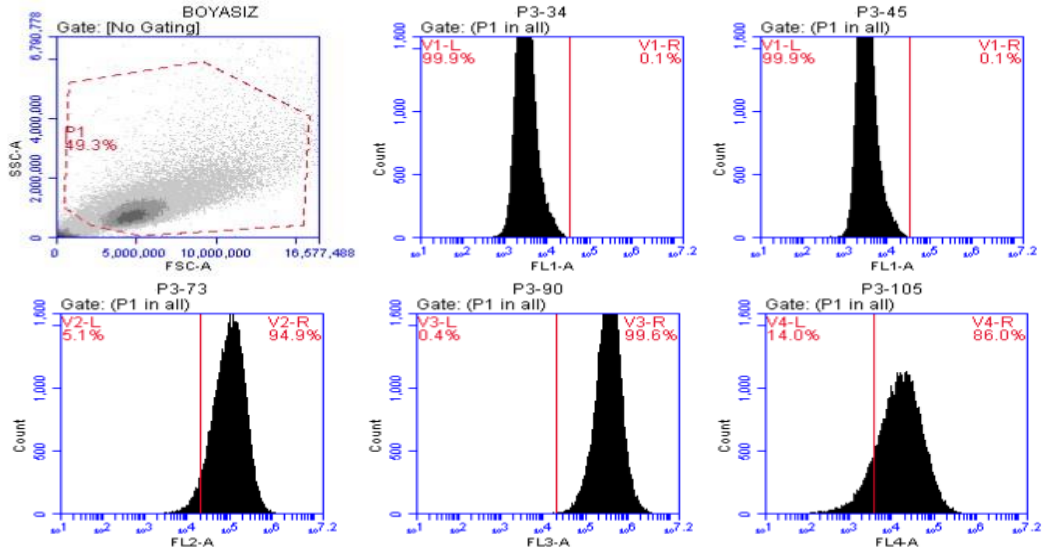
Şekil 42: Pasaj 3 Hipoksik grubu akım sitometrik grafikler



Şekil 43: Pasaj 3 Normansi grubu akım sitometrik grafikler



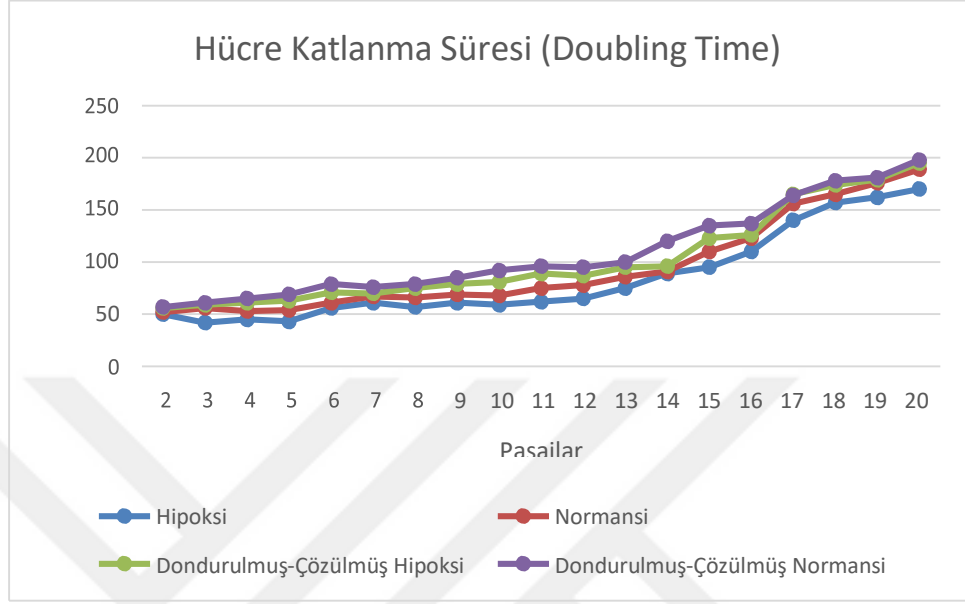
Şekil 44: Dondurulmuş çözülmüş Hipoksi grubu akım sitometrik grafikler



Şekil 45: Dondurulmuş çözülmüş Normansi grubu akım sitometrik grafikler

Mezenkimal hücrelerin spesifik özellikleri CD34 ve CD45 reseptör ifadesi bulundurmazlarken CD73, 90 ve 105 reseptörleri ifadesi %80 ve üzerinde olmalıdır. Yukarıda yer alan akım sitometre sonuçlarında hücrelerin yüzey reseptörlerinin ifadeleri sayısal olarak verilmiştir ve kullanılan hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu kanıtlanmıştır.

3.4. Doubling Time (Katlanma süresi) Analizi

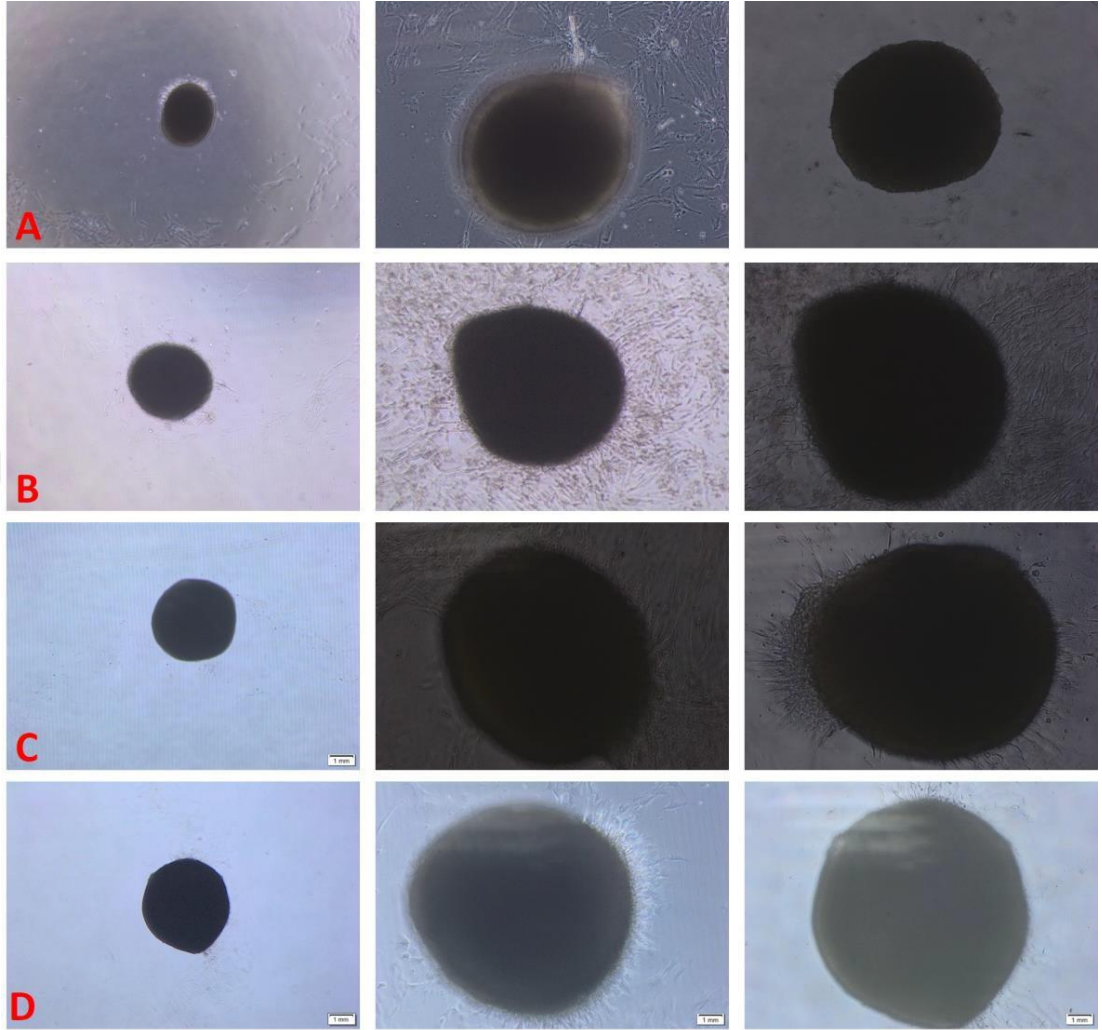


Şekil 46: Deneyde kullanılan MKH'lerin katlanma süreleri

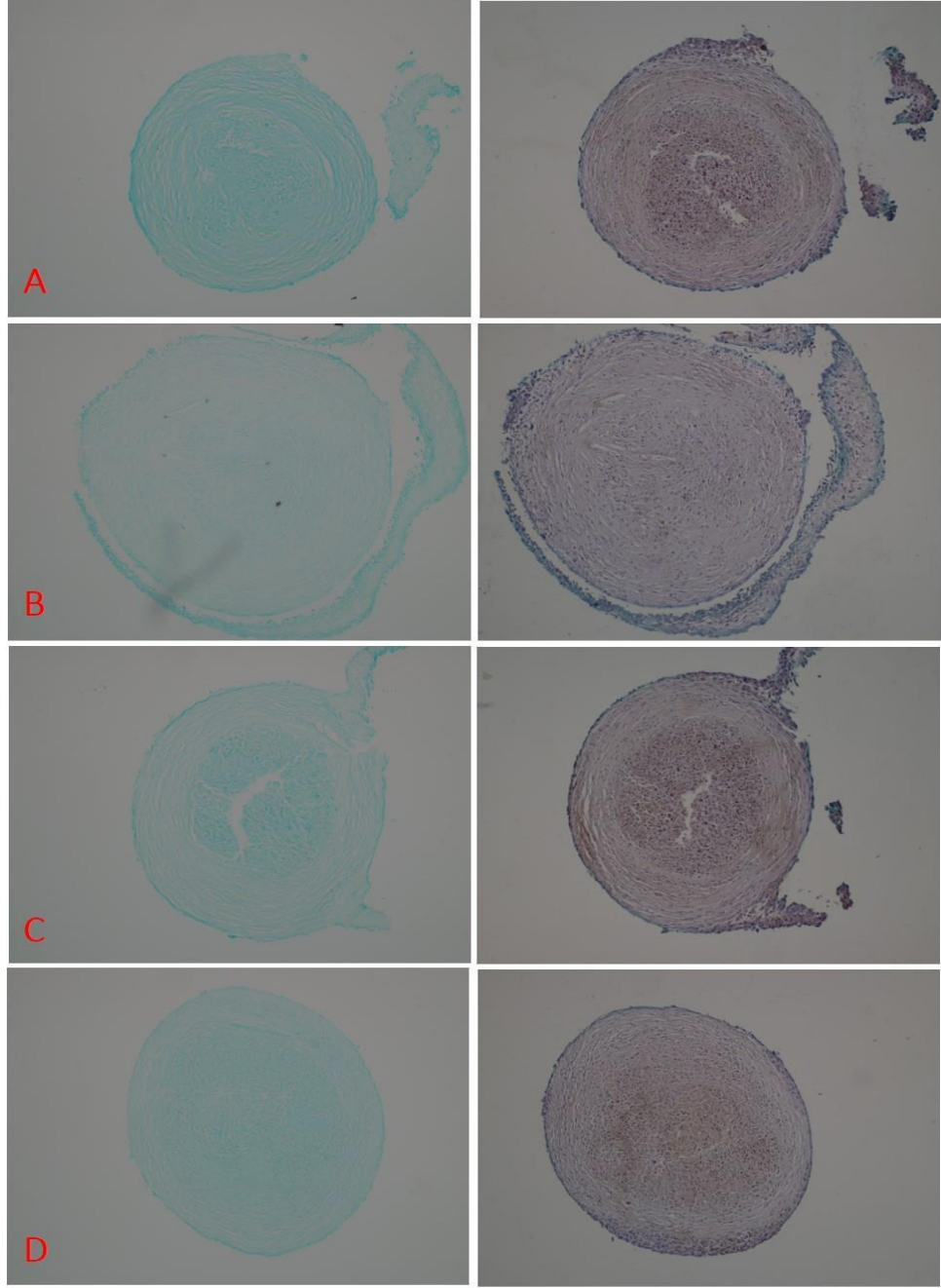
Hücre katlanma süresinin (doubling time) hesaplanması için bütün gruplardan hücreler (hipoksi/normansi/dondurup-çözme hipoksi/dondurup- çözme normansi) 20 kez pasajlanmıştır ve her pasajda katlanma süreleri hesaplanmıştır.

Verilere göre ilk yedi pasajda katlanma zamanı 40- 60 saat arasında değişmektedir. En düşük katlanma süresi hipoksi grubunda görölmüştür. Yedinci pasaj sonrasında katlanma süreleri giderek artış göstermektedir. Gruplar incelendiğinde normansi grubunun hipoksi grubundan daha yüksek katlanma süresine sahip olduğu görölmektedir. Dondurulup çözülen hücre grupları incelendiğinde hücre katlanma sürelerinin, dondurma işlemi yapılmamış hücrelere göre daha uzun olduğu görölmüştür. Dondurma işlemi uygulanmış gruplar kendi aralarında incelendiğinde dondurulup çözülen normansi grupları, aynı şekilde işlem gören hipoksi gruplarından daha uzun katlanma süresine sahip olduğu görölmüştür.

3.5. MKH'lerin Kıkırdağa Farklanma Bulguları



Şekil 47: Yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kıkırdak yapıya diferansiyasyonu. **A.** Hipoksi grubu **B.** Normansi grubu **C.** Dondurulmuş- Çözülmüş hipoksi grubu **D.** Dondurulmuş- Çözülmüş normansi grubu. Kıkırdak yönünde diferansiye olmuş MKH hücreleri Şekil 35’de gösterilmiştir.



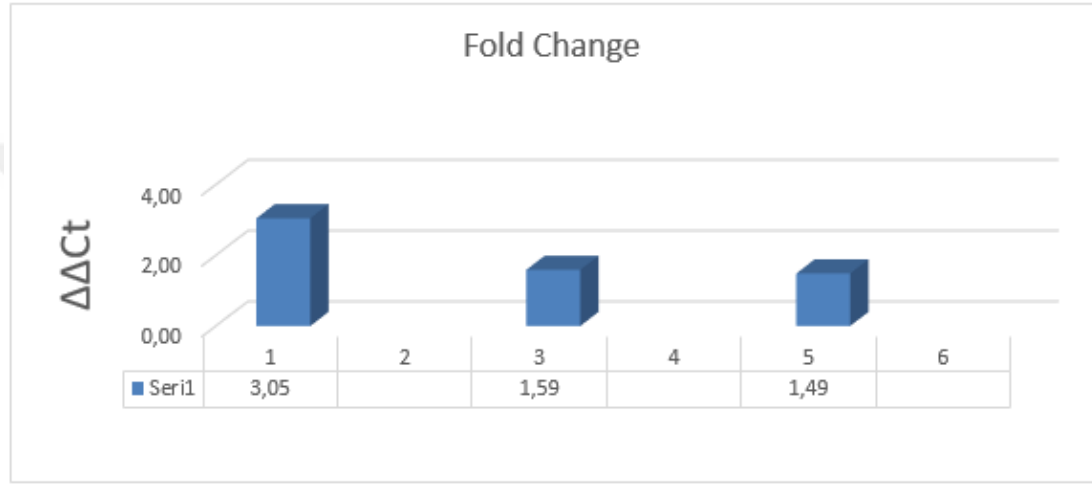
Şekil 48: Alcian blue ve anti-Tip II kollojen boyama. **A.** Hipoksi grubu **B.** Normansi grubu **C.** Dondurulmuş- çözülmüş hipoksi grubu **D.** Dondurulmuş- çözülmüş normansi grubu.

Özel besiyeri içerisinde kıkırdak yönünde farklılandırılan MKH hücrelerine ait örneklerin histopatolojik değerlendirilmesi yapıldığında her deney grubundan kıkırdak eldesi sağlanmıştır. Çeşitli büyüklükte elde edilen bu yapıların inverted mikroskopik

incelemesinde sferik yapıda ve değişken çaplarda yapılar grlmştr. Doku takibine alınan bu yapılardan kesitler alınıp Alcian mavisi ve anti- tip II kollojen boyamaları yapılmıştır. Alcian blue, asit mukopolisakkaritleri ve glikozaminoglikanları mavi renkte boyama özelliği göstermektedir. Dolayısıyla bu yapıda spesifik olarak aggrecan sentezine işaret eden bir yapıdır. 130 kadar kondroitin sülfat ve keratan sülfat, glikozaminoglikan zincirinin bağlandığı 210.000 mol ağırlığında, kıkırdakta bulunan bir proteoglikan yapısı olan aggrecanın Hipoksi ve Dondurulmuş- zlmş hipoksi grubu kesitlerine ait örneklerde daha yoğun boyandığı saptanmıştır. Tip II kollojen ise hyalin ve elastik kıkırdakta görülen kıkırdak dokusuna hem sağlıklı hemde esneklik kazandıran interteritorial matriks içinde yerleşmiş ve kondrosit/blast hücreleri tarafından üretilen bir proteindir. Gruplara ait yapılan histopatolojik incelemede alcian blue boyaması ile paralel olarak Hipoksi ve Dondurulmuş- zlmş hipoksi grubunda daha yoğun bir boyama gösterdiği grlmştr yine aynı gruplara ait örneklerde tip II kollojen sentezi yapan MKH'lerden kıkırdak hücrelerine dönüşen hücre ve hücre topluluklarında sitoplazmik yoğun boyanma verdikleri saptanmıştır. Ayrıca her kesite ait sferik yapıların etrafında fibroblast benzeri hücreler ve kıkırdak hücrelerine benzer hücrelerden karışık bir yapıda olası süreç içerisinde perikondrium benzeri yapılanmanın oluştuğu saptanmıştır.

3.6. Real Time PCR ile Aggreccan Tayini

Örnekler	Ref. Gen Ct (ACTB)	Target gen Ct (Aggreccan)	Norm. Gen Exp.	$\Delta/\Delta Ct$	$\Delta/\Delta Ct$ Down Regule
XNP3	17,039	31,422	4,68E-05	3,05	-0,33
XHP3	22,987	35,762	1,43E-04		
XNP4	15,402	33,883	2,73E-06	1,59	-0,63
XHP4	20,174	37,988	4,34E-06		
XNP5	17,698	36,217	2,66E-06	1,49	-0,67
XHP5	19,941	37,888	3,96E-06		



Şekil 49: Aggreccan Real-TİME PCR tayin Grafiği

Elde edilen sonuçlar relatif kantitasyon yapılabilmek için $\Delta/\Delta Ct$ metodu kullanıldı. Bu metod ile aggreccan geninin ct değerleri ACTB geni ile normalize edildiğinde, yukarıdaki tabloda görülen pozitif değerler elde edildi. Bu değerler aggreccanın anlamlı artışını temsil etmektedir.

TARTIŞMA

Vücudumuzdaki bütün hücrelerin ana kaynağı, dokuların ve organların yapı taşı olan kök hücreler; çok sayıda bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip, özelleşmemiş, ancak özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilen ve bu özelliğiyle hasarlanmış olan dokuyu tekrardan çoğaltıp eski fonksiyonunu geri kazandırabilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Günümüzde kök hücrelerin kullanıldığı yeni tedavi yöntemlerini düzenlemeye yönelik çok sayıda araştırma dünyanın önde gelen pek çok araştırma kuruluşunda yürütülmektedir. Kök hücre tabanlı tedaviler hastalara büyük umutlar vadetmektedir. Klinikte hematopoetik ve mezenkimal kök hücre uygulaması mevcutken embriyonik kök hücre uygulamasının yeri yoktur. Embriyonik kök hücreler İmmun redde neden olan HLA ekspresyonundan yoksun olmalarına rağmen etik ve politik nedenlerin yanı sıra *in vivo* teratom oluşturma riskinden dolayı kullanılmamaktadır. Araştırmacıların hala üzerinde çalıştıkları embriyonik kök hücreye alternatif olan indüklenmiş pluripotent kök hücreler ise allojenite sorununu ortadan kaldırırken teratoma ve viral enfeksiyonlar gibi istenmeyen ciddi sonuçlara neden olabilmektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı rejeneratif tıp, gen tedavileri ve doku mühendisliğinde kök hücre ve progenitor hücre kaynakları çoğunlukla otolog olarak kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin düşük immunreaktivite ve tümorojenite özellikleri yanında yüksek immünsupresif ve immunregülatör özellikler göstermeleri onları otolog ve allojenik tedavide kullanım için uygun birer kaynak haline getirmektedir (3,4,5).

Mezenkimal kök hücreler; Kemik iliği, adipoz doku, kordon, kordon kanı, karaciğer, beyin, diş pulpası, deri ve fetal dokularda bulunan farklılaşmamış, yüksek proliferatif kapasitede kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip, mezodermal farklılaşma yetisi çok yüksek olan kök hücrelerdir (1,2).

Multipotent mezenkimal kök izolasyonunda asıl kaynak kemik iliği olmasına rağmen aspirasyon prosedürünün oldukça invaziv oluşu, farklılaşma ve dayanıklılık potansiyellerinin yaşla birlikte azalması alternatif kaynaklar geliştirmeyi gündeme getirmiştir (1). Alternatif bir kaynak olan kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin elde edilme yöntemi daha az invaziv olmakla birlikte, yağ doku ve kemik iliği MKH ile

benzer fenotip, antiapoptotik özellik ve morfolojileri paylaşırken %70 civarı daha az izolasyon verimliliği göstermektedir. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerine göre adipojenik ve nörojenik farklılaşma potansiyeli çok düşüktür (2,39).

İnsan adipoz dokunun 1 gramında yaklaşık 1×10^6 adipoz kaynaklı MKH vardır (6). 1 ml yağ dokusu aynı miktardaki kemik iliği ile karşılaştırıldığında 500 kat daha fazla kök hücre içerir (56). Otolog hücre tabanlı tedavilerde en fazla kullanılan mezenkimal kök hücre kaynakları; kemik iliği ve yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerdir. Benzer morfoloji ve immün fenotiplere sahip olmalarına rağmen, yağ dokusu daha yüksek konsantrasyonda mezenkimal kök hücre içerir. Fakat kemik iliği kaynaklı olan mezenkimal kök daha uzun süredir çalışıldığı için klinik güvenilirliği ve uygulamasına ait veriler de daha fazladır (1,3,4).

Hücre bankacılığı açısından ele alındığında kemik iliği MKH'lerin (CF) koloni oluşturma kapasitesinin düşüklüğü ve (DT) katlanma zamanı uzunluğu belli başlı bazı zorluklara neden olur (4). Kemik iliği aspirasyonu ile karşılaştırıldığında, yağ kaynaklı MKH'lerin liposuction ve abdominoplasti gibi daha kolay yollarla elde edilebilmesi ve operasyon sonrası atık materyali olması düşünüldüğünde etik ve pratik anlamda daha uygun bir kaynaktır (63). Bu çalışmadaki amaçlardan biri yüksek sayıda ve işlevsel hücre elde etmek ve bu prosedürü standart hale getirmek olduğu için kaynak olarak yağ doku seçilmiştir.

Literatürde yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin; cinsiyet, yaş, (BMI) beden kitle indeksi (66,68,69,121), yağın alındığı bölge, lipoaspirasyon tekniği, cerrahide kullanılan kanül ölçüsü, vakum basıncı ve deney sürecinde uygulanan santrifüj hızından etkilendiğini/etkilenmediğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (70,72,122,123,124).

Standardizasyonun sağlanabilmesindeki en büyük zorluklardan biri bireylerden alınan örneklerdeki adipoz kaynaklı kök hücrelerinin kalitatif/kantitatif özelliklerinde farklılıklar olmasının yanı sıra aynı bireyin farklı bölgelerinden alınan örneklerde bile varyasyonlar görülmesidir (73).

Bu çalışmada; kalitatif aspirasyon tekniği, tek bir vücut bölgesi (alt karın), standart ölçülü kanül, sabit-düşük vakum basıncı, sabit santrifüj hızı, sabit BMI' ne sahip genç/yaşlı kadın bireyler kullanılarak sonuçların sapması elemine edilme sebebi olmuş ve görece yüksek bir standarta ulaşılmıştır.

MKH'lerin *in vitro* olarak çoğaltılması için ortama büyüme faktörleri ve diğer uyarıların eklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla kültürde serum içeren ortam olarak en sık kullanılanı, buzağı serumu olan FBS'nin % 10-15 gibi yüksek oranlarda kültür vasatına eklenmesidir. Klinik kullanım amaçlı mezenkimal kök hücre hazırlığında ise FBS, yan etkileri nedeniyle tercih edilmemektedir. Konu ile ilgili yapılmış çalışmalarda genellikle hayvan materyalleri kullanılmış olup klinik çalışmalar ve denemelerin çoğunda *in vitro* mezenkimal kök hücre ekspansiyonu kültür mediumunda serum olarak FBS ve FCS kullanılmaktadır. Fakat prion ve zoonoz tehlikesiyle birlikte FBS içindeki proteinlerin immünojenitesi de büyük bir sorundur. Çözüm olarak otolog serum kullanılması üzerine çalışmalar yapılmıştır (45,56,57).

Fakat literatürde otolog serumla hipoksida farklılaşma kapasitelerine bakılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu eksiklik çalışmanın özgün değerlerinden birini oluşturmaktadır.

Kök hücreleri tanımlayan en önemli karakterler; farklılaşmadan kendini yenileyebilmeleri ve multipotansilerini koruyabilme kapasiteleridir. Bu kapasite mikroçevrelerindeki kompleks sinyallerin dengesine bağlıdır. Düşük oksijen basıncı (hipoksi) embriyonik, hematopoetik, mezenkimal ve nöral kök hücre fenotiplerinin farklılaşmadan devamlılığı, proliferasyon ve hücre kaderini etkiler. Mezenkimal kök hücreler dokularda kan damarlarına yakın perivasküler nişte bulunurlar. Farklı dokularda düşük oksijen basıncının olduğu yerlerde bulunan MKH'lerin lokasyonları, vasküler yapıda olması farklılaşmadan çoğalabilmeleri (self-renewal) için hipoksik ortamın gerekliliğinin nedenini göstermektedir. Bu mikroçevrede kültüre edildiklerinde pluripotensi için gerekli olan Oct4 ekspresyonu, telomeraz aktivitesi artarken kondrojenik ve osteojenik farklılaşma yetenekleri ve proliferasyonları yüksektir. Hipoksik ortamda kültürü yapılan yağ kaynaklı MKH'lerin normansiye göre migrasyonları da çok daha fazladır. Bu veriler MKH'lerin köklülüğün devamlılığı (stemness) ve hücre kaderinin belirlenmesinde düşük oksijen basıncının önemini vurgulamaktadır (125). Bu araştırmada üç boyutlu mikro kütle yöntemi kullanılarak yapılmış olup kondrojenik farklılaşmanın gerek insan fizyolojisine uygun olan hipoksik ortamda, gerekse insanın kendi serumuyla yapılmış olması; kök hücre temelli yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesi, mevcut literature katkı sağlaması olasıdır.

Hipoksik ortamın kemik iliği MKH'lerine etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada kök hücrelerin Oct4 ekspresyonları ve telomeraz aktivitesinin arttığı, adipoz MKH'leriyle yapılan benzer bir çalışmada da osteojenik ve kondrojenik farklılaşmanın yükseldiği gösterilirken benzer bir diğer çalışmada kondrojenik potansiyel genişlerken proliferatif kapasitenin düştüğü ifade edilmiştir. Hipoksik ortamda kültüre edilip, farklılaştırılan adipoz MKH'lerinde kondrojenik marker ekspresyonları daha yüksek bulunmuştur. MKH izolasyonu, kültürü ve deneysel tasarımdaki kombinasyon farklılıklarının fazlalığı düşünüldüğünde hipoksinin MKH'lerin biyolojisi üzerindeki rolünü standart olarak ortaya koymak oldukça güç iken hücrenin kaderini etkilediği açıktır (49,125).

Kriyoprezervasyon, ileride hasar görmüş doku veya organ fonksiyonlarının kurtarılması ya da iyileştirilmesi için hücre ya da dokuların saklanması iyi bir yoldur (63). Dondurma solüsyonu olmadan yapılan çalışmalar incelendiğinde proliferasyon ve farklılaşma kapasitelerinde çok belirgin farklılık olmazken apoptoz kaynaklı hücre ölümleri dondurma solüsyonu olmayan grupta fazla bulunmuştur (64). Kriyoprezervasyonda dondurma solüsyonu olarak kullanılan DMSO ve trehaloz kombinasyonu adipoz MKH'leri canlılığı, hücre membran bütünlüğü, farklılaşma kapasitesi, intrasellüler buz oluşumu, köklülük üzerine etkilerine bakılan bir çalışmada, yüksek trehaloz düşük DMSO kombinasyonu grupları taze örneklerle karşılaştırılmıştır. Bir yıl sonra çözdürülmüş örnek morfolojisinde bir değişiklik gözlenmemekle birlikte CD34-, CD90+ ekspresyon seviyeleri normal düzeyde tespit edilmiştir. Canlılık oranları taze ve 1. ayda çözdürülen grupta %92,5, 3. ayda %84,6 ve 1. yılda % 70 oranında bulunmuştur. Apoptotik ve nekrotik yüzelere bakıldığında da taze örneklerle çok büyük farklılıklar gözlenmemiştir. Aynı çalışmada bakılan adipojenik farklılaşma seviyelerinde de aylar arasında anlamlı bir değişiklik yoktur (7). Klinik uygulamalarda kullanılmak üzere dondurulan MKH'lerin kök hücre potensilerini kaybetmeden saklanmaları için 4 alternatifteki optimal protokolden en iyisi %4 DMSO+ %6 trehaloz+ %90 PBS olarak bulunan çalışmaya bu proje çalışmasında alternatif dondurma solüsyonumuz klinik kullanımda güvenlik sağlamak amaçlı serum ortamının otolog insan serumu olarak modifiye edildiği bir opsiyon olacaktır. Bu şekilde dondurularak saklanan hücreler ileri bir tarihte ihtiyaç olduğunda tekrar bir cerrahi operasyona gerek kalmaksızın çözülerek doku defekt tamirinde ya da kozmetik amaçlı cerrahi uygulamalarında kullanılabilir olacaktır. Güncel literatür

incelendiğinde adipoz dokunun yumuşak doku defeklerinin tamirinde otolog kullanım potansiyelinin yüksek olduğu bununla beraber dokunun ve içerdiği kök hücrelerin farklı izolasyon, çoğaltma, saklama koşulları, yöntemleri kullanarak etkinliği incelenmiş olsa da çalışma sayısının azlığı, birbirine zıt sonuçların elde edilmiş olması ve henüz dünya genelinde bu konuda kliniğe uygun etkin ve verimli bir standardın oluşturulamamış olması çalışmanın gerekçesidir.

MKH'lerin kemik, kırık, yağ, kas, tendon, stroma ve nöronal hücrelere dönüşebilme yetisi onları doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta faydalı araçlar haline getirir. Bu hücreler in vitro olarak plastik yüzeye yapışma ve özelliklerini kaybetmeden 30- 40 jenerasyon pasajlanabilme özelliğine sahiptir. Adiposit, kırık ve kemik gibi mezodermal kökenli hücrelere farklılaşabildikleri gibi, ektodermal ve endodermal kaynaklı hücrelere de farklılaşabilirler (45,57).

İnsan adipoz mezenkimal kök hücreleri pek çok çalışma ve uygulamalarda standart kültür koşullarında kültüre edilmekle birlikte vücutta fizyolojik olarak daha düşük oksijen seviyesinin olduğu ortamlarda bulunurlar. Standart kültür ortamında kısıtlı proliferatif ve migratif kapasiteye sahiptirler (125,126).

Literatürde yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin kültürü ve ekspansiyonunda az sayıda otolog serum denemesi yapılmış olmakla birlikte diferansiyasyonda indükleme ortamına FBS ilave edilmiş sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır. Bu çalışmada kondrojenik indükleme ortamında otolog serum uygulanmıştır. İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, proliferatif kapasitesi, diferansiyasyonu, canlılığı ve migrasyonları in vivo ve in vitro olarak araştırılmış az sayıda literatür olmasıyla birlikte, hipoksi altında otolog serumla birlikte bu etkilerin araştırılmasıyla ilgili literature rastlanılmamıştır.

2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT)' nin fikir birliğiyle MKH olarak sınıflandırma yapılabilmesi için;

- i. Hücrelerin kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilmeleri,
- ii. Yüzeylerinde CD 105, CD 73 ve CD 90 gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederken, CD 45, CD 34, CD14 veya CD 11b, CD 79 veya CD 19 ve HLA-DR tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri,

iii. *In vitro* ortamda kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilmeleri gerekmektedir (127,128).

Yağ doku mezenkimal kök hücrelerinin; tip 1 ve tip 2 diabetes mellitus, karaciğer sirozu, kron hastalığı, GVHD, miyokard infarktüsü, lipodistrofi, alzheimer, parkinson, inme, vitiligo, böbrek ve kalp yetmezliği, fekal inkontinans, osteoartrit, osteoporoz, menisküs gibi ortopedik hastalıklar, kanser ve immun hastalıklarda bağışıklık sistemini baskılayıcı ve düzenleyici, multipl skleroz, sekonder progresif multipl skleroz nörodejeneratif hastalıklar, omurilik yaralanmaları ve travmatik sinir kesileri gibi sinir sistemi hastalıkları, diş hekimliğinde implantlar, plastik cerrahide yanık tedavisi gibi rejeneratif amaçlı, osteogenesis imperfekta gibi kalıtsal hastalıklarda kullanıma ait deneysel ve klinik çalışmalar mevcuttur. Yağ kaynaklı mezenkimal kök hücreler düşük immünjenitesi, yüksek modulator ve immünespresif özelliklere sahip olduğu için klinikte kullanılmaktadır. Bununla birlikte belli bazı hastalıkların tedavisi için klinik çalışmalar halen devam etmektedir (9,65).

Deneye ait pasaj sonuçları açısından hipoksik grupların tümünde normansi gruplara daha hücre yoğunluğunun fazla ve konfluent olma zamanlarının daha kısa olduğu görülmüştür. Hücre debrisleri ya da benzeri görüntü veren olası apoptotik cisimlerin normansi gruplarında hipoksilere göre daha yoğun olduğu saptanmıştır.

Mezenkimal hücrelerin spesifik özellikleri CD34 ve CD45 reseptör ifadesi bulundurmazlarken CD73, 90 ve 105 reseptörleri ifadesi %80 ve üzerinde olmalıdır.

Yukarıda yer alan akım sitometre sonuçlarında hücrelerin yüzey reseptörlerinin ifadeleri sayısal olarak verilmiştir ve kullanılan hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu kanıtlanmıştır.

Verilere göre ilk yedi pasajda katlanma zamanı 40- 60 saat arasında değişmektedir. En düşük katlanma süresi hipoksi grubunda görülmüştür. Yedinci pasaj sonrasında katlanma süreleri giderek artış göstermektedir. Gruplar incelendiğinde normansi grubunun hipoksi grubundan daha yüksek katlanma süresine sahip olduğu görülmektedir. Dondurulup çözülen hücre grupları incelendiğinde hücre katlanma sürelerinin, dondurma işlemi yapılmamış hücrelere göre daha uzun olduğu görülmüştür. Dondurma işlemi uygulanmış gruplar kendi aralarında incelendiğinde dondurulup çözülen normansi grupları, aynı şekilde işlem gören hipoksi gruplarından daha uzun katlanma süresine sahip olduğu görülmüştür.

Hücre canlılığı bulguları açısından yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu Pasaj 1- Hipoksi Canlı hücre - Pasaj 1 Normansi canlı hücre; Pasaj 3- Hipoksi canlı hücre - Pasaj 3 Normansi canlı hücre; Pasaj 5- Hipoksi canlı hücre – Pasaj 5 Normansi canlı hücre sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur ($p<0,005$). Ölü hücrelerin her pasajdaki sonuçları değerlendirildiğinde grupların hiçbirinde istatistiksel bir anlam elde edilmemiştir.

Dondurma/çözülme normansi grubu istatistiksel karşılaştırılmasına bakıldığında ham verilerde hipoksi yönünde anlamlı olabilecek bir sonuç gözlenirken bunun istatistiksel analize yansımadağı ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p=0,689$).

Kıkırdak yönünde farklandırılan MKH hücrelerine ait örneklerin histopatolojik değerlendirilmesi yapıldığında her deney grubundan kıkırdak eldesi sağlanmıştır. Çeşitli büyüklükte elde edilen bu yapıların inverted mikroskopik incelemesinde sferik yapıda ve değişken çaplarda yapılar görülmüştür. Doku takibine alınan bu yapılardan kesitler alınıp Alcian mavisi ve anti-tip II kollojen boyamaları yapılmıştır. Alcian blue, asit mukopolisakkaritleri ve glikozaminoglikanları mavi renkte boyama özelliği göstermektedir. Dolayısıyla bu yapıda spesifik olarak aggrecan sentezine işaret eden bir yapıdır. Aggrecanın Hipoksi ve Dondurulmuş- Çözülmüş hipoksi grubu kesitlerine ait örneklerde daha yoğun boyandığı saptanmıştır. Gruplara ait yapılan histopatolojik incelemede alcian blue boyaması ile paralel olarak Hipoksi ve Dondurulmuş- Çözülmüş hipoksi grubunda daha yoğun bir boyama gösterdiği görülmüştür yine aynı gruplara ait örneklerde tip II kollojen sentezi yapan MKH'lerden kıkırdak hücrelerine dönüşen hücre ve hücre topluluklarında sitoplazmik yoğun boyanma verdikleri saptanmıştır. Ayrıca her kesite ait sferik yapıların etrafında fibroblast benzeri hücreler ve kıkırdak hücrelerine benzer hücrelerden karışık bir yapıda olası süreç içerisinde perikondrium benzeri yapılanmanın oluştuğu saptanmıştır. Elde edilen PCR sonuçlarına göre de relatif kantitasyon yapılabilmek için Δ/Δ Ct metodu kullanıldı. Bu metod ile aggrecan geninin ct değerleri ACTB geni ile normalize edildiğinde, yukarıdaki tabloda görülen pozitif değerler elde edildi. Bu değerler aggrecanın anlamlı artışını temsil etmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. FCS ve FBS gibi hayvan kaynaklı serum içermeyen, insan serumu ile oluşturulan hipoksik kültür ortamıyla, klinik kullanıma uygun yağ kaynaklı MKH elde edilmiştir. Bu hücrelerin kıkırdak dokusuna farklandığı gösterilmiştir.
2. Hipoksik ve normansi ortamlarda aynı pasaj, sayı ve aynı kişiye ait MKH'lerin kondrojenik farklılaşma ve proliferatif kapasitesi verileri değerlendirilerek hipoksik ortamın daha iyi bir kültür stratejisi olduğu sonucuna varılmıştır.
3. Otolog serumla izole edilen ve hipoksik kültür ortamında çoğaltılan yağ kaynaklı MKH'ların otolog serumla kriyoprezervasyonu ile ilgili literatürdeki boşluğun doldurulacağı düşünülmektedir.
4. Her deney grubuna ait MKH'lerden kıkırdak doku elde edilmiştir. Tip II kollojen ve aggrecan sentezi açısından bakıldığında hipoksik ve dondurup/çözme hipoksik gruplarında daha iyi kalitede kıkırdak dokusu elde edilmiştir.
5. Hücre ölümü ile yapılan analizler sonucunda hipoksik grupta normansiye kıyasla istatistiksel anlamlı olarak hücre sayısı yüksek bulunmuştur. Dondurma/çözülme hipoksi grubu- Dondurma/çözülme normansi grubu istatistiksel karşılaştırılmasına bakıldığında ham verilerde hipoksi yönünde anlamlı olabilecek bir sonuç gözlenirken bunun istatistiksel analize yansımadağı ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p=0,689$). Bunun temel nedeninin hasta sayısının yetersizliğine bağlı olduğu yapılacak daha yüksek N sayılı çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar alınabileceğı düşünülmüştür.
6. Bu çalışmada kriyoprotektan olarak kullanılan trehalozun, MKH üzerinde toksik etki göstermediğı saptanmıştır.
7. MKH'lerin bankacılığının yapılabilirliği ve rejeneratif tıp ya da kozmetik amaçlı kullanım potansiyeli olabileceğı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

1. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H BK. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006;
2. Hu L, Hu J, Zhao J, Liu J, Ouyang W, Yang C, et al. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
3. Harris D. Stem Cell Banking for Regenerative and Personalized Medicine. *Biomedicines* [Internet]. 2014;2(1):50–79. Available from: <http://www.mdpi.com/2227-9059/2/1/50/>
4. Harel, Harel. Cryopreservation and Cell Banking for Autologous Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Tissue Transplant Ther* [Internet]. 2013;1. Available from: <http://la-press.com/cryopreservation-and-cell-banking-for-autologous-mesenchymal-stem-cell-article-a3541>
5. Wan Kamarul Zaman WS, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. Long-term in vitro expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumourigenicity. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2014;8(1):67–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.1501>
6. Yang X-F, He X, He J, Zhang L-H, Su X-J, Dong Z-Y, et al. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* [Internet]. 2011;18(1):59. Available from: <http://www.jbiomedsci.com/content/18/1/59>
7. De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, Ferraro GA, Desiderio V, Paino F, et al. A New Method for Cryopreserving Adipose-Derived Stem Cells: An Attractive and Suitable Large-Scale and Long-Term Cell Banking Technology. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2009;15(4):659–67. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.tec.2008.0674>
8. Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish J Hematol*. 2008;25(2):57–9.
9. Tekeli S. Stem cells ; mesenchymal stem cells and current clinical applications. *FNG Bilim Tıp Transplant Derg*. 2016;1(2):72–83.
10. Sağsöz H KM. Kök Hücreler. *Dicle Üniversitesi Vet Fakültesi Derg* [Internet]. 2008;1(2):29–33. Available from: http://www.dicle.edu.tr/bolum/Muh/veteriner/dergi/dosyalar-2/2008-2_1_.pdf
11. Rossant J. Stem Cells and Early Lineage Development. *Cell* [Internet]. 2008;132(4):527–31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295568>

12. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* [Internet]. 2002;241(1):172–82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784103>
13. Lanza RP. *Essentials of stem cell biology* [Internet]. 2009. 681 p. Available from: <http://books.google.com.my/books?id=auyfanDzHIIC>
14. Weissman IL. Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities. *Science* (80-) [Internet]. 2000;287(5457):1442–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5457.1442>
15. Can A. *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Klinik Kullanımları*. Akad Kitapevi. 2013;
16. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res* [Internet]. 2008;100:133–58. Available from: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7CT1-4SYB53R-7&_user=10&_coverDate=12%2F31%2F2008&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000050221&_version=
17. Ara CRE, Sa TH BL. Embriyonik kök hücre araştırmaları hakkında sağlık bakanlığı genelgesi. 2015;1–4.
18. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2006;31(10):589–95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16911868>
19. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* [Internet]. 1984;133(1):157–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6586833>
20. Ploemacher RE. Stem cells: characterization and measurement. *Baillieres Clin Haematol* [Internet]. 1997;10(3):429–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421609>
21. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1992;89(7):2804–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.7.2804>
22. Tam WL, Ang YS, Lim B. The molecular basis of ageing in stem cells. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(1):137–48.
23. Sır Gözde, Tekeli Senem ve ark. Kordon kanı kök hücreleri ve klinik kullanımı. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplant Derg* [Internet]. 2016;1(2):53–8. Available from: <http://dergipark.gov.tr/ibufntx/issue/24822/262220>

24. Wyrsh A, Dalle Carbonare V, Jansen W, Chklovskaja E, Nissen C, Surbek D, et al. Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity. *Exp Hematol*. 1999;27(8):1338–45.
25. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2001;97(10):2962–71. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood.V97.10.2962>
26. Mayani H. Biological Differences Between Neonatal and Adult Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2010;19(3):285–98. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2009.0327>
27. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* [Internet]. 2007;25(11):2739–49. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0197>
28. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010;28(3):585–96.
29. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology? *Transfus Med Hemotherapy*. 2010;37(2):75–83.
30. Dr. Arnold I. Caplan. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* [Internet]. 1991;9(5):641–50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870029>
31. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
32. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2005;7(5):393–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236628>
33. Elahi KC, Klein G, Avci-Adali M, Sievert KD, Macneil S, Aicher WK. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells Int*. 2016;2016(Figure 1).
34. 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.
35. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics. *Tissue Eng* [Internet]. 2005;11(7–8):1198–211. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.2005.11.1198>

36. Shenghui H, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2009;25(1):377–406. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>
37. Gimble J, Katz A, Bunnell B. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res*. 2007;1249–60.
38. Pittenger MF, Martin BJ, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circ Res*. 2004;9–20.
39. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med* [Internet]. 2008;233(7):901–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18445775
40. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-WW, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301–13.
41. Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* [Internet]. 2008;214(2):413–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17654479>
42. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* [Internet]. 2001;7(2):211–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456>
43. Aicher WK, Bühring H, Hart M, Rolauffs B, Badke A, Klein G. Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells — Potential and pitfalls ☆. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2011;63(4–5):342–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.12.004>
44. Akgün I. Mezenkimal kök hücre Mesenchymal stem cell. 2016;1(1):29–32.
45. Bogdanova A, Bērziņš U, Brūvere R, Eivazova G, Kozlovska T. Adipose-derived stem cells cultured in autologous serum maintain the characteristics of mesenchymal stem cells. *Proc Latv Acad Sci Sect B Nat Exact, Appl Sci* [Internet]. 2010;64(3–4). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/prolas.2010.64.issue-3-4/v10046-010-0026-5/v10046-010-0026-5.xml>
46. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46(1):219–28.
47. Forte A, Finicelli M, Grossi M, Vicchio M, Alessio N, Santè P, et al. DNA damage and repair in a model of rat vascular injury. *Clin Sci (Lond)* [Internet].

2009;485(7):473–85. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19804370>

48. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2004;8(3):301–16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x>

49. Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion* [Internet]. 2014;19(Part A):105–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.005>

50. Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*. 2011;117(2):459–69.

51. Shikhsliyeva I. Investigation of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on boron containing Hap-Coated chitosan scaffolds. 2015.

52. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* [Internet]. 2007;8:70. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17352823

53. Bauer-Kreisel P, Goepferich A, Blunk T. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(7–8):798–813.

54. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an undersppreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150–4.

55. Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2002;61 Suppl 2:ii29-31. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12379617

56. Bogdanova A, Berzins U, Nikulshin S, Skrastina D, Ezerta A, Legzdina D, et al. Characterization of human adipose-derived stem cells cultured in autologous serum after subsequent passaging and long term cryopreservation. *J Stem Cells* [Internet]. 2014;9(3):135–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25157448>

57. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*. 2004;32(12):1212–25.

58. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.

59. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*. 1986;23(1):1–13.
60. Delilbası L. *İn vitro* fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri. 2008.
61. Palasz AT MRJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv*. . Send to *Biotechnol Adv* [Internet]. 1996;14(2):127–49. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14537604>
62. Minonzio G, Corazza M, Mariotta L, Gola M, Zanzi M, Gandolfi E, et al. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology*. 2014;69(2):211–6.
63. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine. *J Surg Res*. 2014;187(1):24–35.
64. Wang WZ, Fang XH, Williams SJ, Stephenson LL, Baynosa RC, Wong N, et al. The effect of lipoaspirates cryopreservation on adipose-derived stem cells. *Aesthetic Surg J*. 2013;33(7):1046–55.
65. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp* [Internet]. 2016;64(6):443–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27178663>
66. Mojallal A, Lequeux C, Shipkov C, Duclos A, Braye F, Rohrich R, et al. Influence of age and body mass index on the yield and proliferation capacity of adipose-derived stem cells 2750. *Aesthetic Plast Surg*. 2011;35(1432–5241 (Electronic)):1097–105.
67. Duschmann J, Gao S, Härter L, Hemmi S, Welti M, M.L. Wernel C, et al. Yield and proliferation rate of adipose-derived stromal cells as a function of age, body mass index and harvest site. *Cytherapy*. 2013;
68. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J HD. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*. 2014;
69. Dos-Anjos Vilaboa S, Navarro-Palou M, Llull R. Age influence on stromal vascular fraction cell yield obtained from human lipoaspirates. *Cytherapy*. 2014;16(8):1092–7.
70. Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende ARDR, Grechi B, et al. Sources of processed lipoaspirate cells: Influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(2):614–8.
71. Jurgens WJFM, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, ZandiehDoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res*. 2008;

72. Shiffman MA, Mirrafati S. Fat transfer techniques: The effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatologic Surg*. 2001;27(9):819–26.
73. Minteer D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells : Biology and Potential Applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013;129(July 2012):59–71.
74. Hämmerle CHF, Giannobile W V. Biology of soft tissue wound healing and regeneration--consensus report of Group 1 of the 10th European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2014;41 Suppl 1(November 2013):S1-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24640995>
75. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med*. 2005;9(4):929–39.
76. Shandalov Y, Egozi D, Koffler J, Dado-Rosenfeld D, Ben-Shimol D, Freiman A, et al. An engineered muscle flap for reconstruction of large soft tissue defects. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014;111(16):6010–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1402679111>
77. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg* [Internet]. 2001;28(1):111–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248861>
78. Li BW, Liao WC, Wu SH, Ma H. Cryopreservation of fat tissue and application in autologous fat graft: in vitro and in vivo study. *Aesthetic Plast Surg*. 2012;36(3):714–22.
79. Estes B, Diekman B, Gimble J, Guilak F. Isolation of adipose derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc* [Internet]. 2010;5(7):1294–311. Available from: <http://www.nature.com/nprot/journal/v5/n7/abs/nprot.2010.81.html>
80. Ma H-L, Hung S-C, Lin S-Y, Chen Y-L, Lo W-H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res* [Internet]. 2003;64A(2):273–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.10370>
81. Harasymiak-Krzyżanowska I, Niedojadło A, Karwat J, Kotuła L, Gil-Kulik P, Sawiuk M, et al. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Cell Mol Biol Lett* [Internet]. 2013;18(4). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/cmbble.2013.18.issue-4/s11658-013-0101-4/s11658-013-0101-4.xml>
82. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* [Internet]. 2006;24(5):1294–301. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2005-0342>

83. Vianello F, Dazzi F. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: A double edged sword? *Leukemia*. 2008;22(3):463–5.
84. Blanc K Le, Rasmusson I, Sundberg B, G\o therstr o m C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363 %6(9419):1439-1441 %&.
85. Bacigalupo A. Management of acute graft-versus-host disease. *Send to Br J Haematol*. 2007;137(2):87–98.
86. Couriel D, Caldera H CR. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer*. 2004;101.
87. Le Blanc K, Barrett AJ, Schaffer M, Hägglund H, Ljungman P, Ringdén O, et al. Lymphocyte Recovery Is a Major Determinant of Outcome after Matched Unrelated Myeloablative Transplantation for Myelogenous Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(9):1108–15.
88. Ograczyk E, Kowalewicz-Kulbat M, Wawrocki S, Fol M. Immunosuppression - Tough ally in torrid time. *Postepy Hig Med Dosw*. 2015;69.
89. Erbey F, Atay D, Akcay A, Ovali E, Ozturk G. Mesenchymal Stem Cell Treatment for Steroid Refractory Graft-versus-Host Disease in Children: A Pilot and First Study from Turkey. *Stem Cells Int [Internet]*. 2016;2016:1641402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4691494/pdf/SCI2016-1641402.pdf>
90. García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum [Internet]*. 2009;52(1):79–86. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19273960&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1007/DCR.0b013e3181973487>
91. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn’s fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum [Internet]*. 2005;48(7):1416–23. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003453-200548070-00011%5Cnpapers2://publication/doi/10.1007/s10350-005-0052-6>
92. De la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn ’ s disease: results from a multicenter phase I / IIa clinical trial. *Int J Color Dis*. 2013;28(3):313–23.
93. Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A SA. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg [Internet]*. 2007;119(1423–4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17415234>

94. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(3):201–9.
95. Tanikawa DYS, Agüena M, Bueno DF, Passos-Bueno MR, Alonso N. Fat grafts supplemented with adipose-derived stromal cells in the rehabilitation of patients with craniofacial microsomia. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(1):141–52.
96. Koh YG, Kwon OR, Kim YS, Choi YJ, Tak DH. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells With Microfracture Versus Microfracture Alone: 2-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Arthroscopy* [Internet]. 2016;32(1):97–109. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26585585>
97. Götherström C, Westgren M, Shaw SWS, Åström E, Biswas A, Byers PH, et al. Pre- and Postnatal Transplantation of Fetal Mesenchymal Stem Cells in Osteogenesis Imperfecta: A Two-Center Experience. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2014;3(2):255–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.5966/sctm.2013-0090>
98. Yamout B, Hourani R, Salti H, Barada W, El-Hajj T, Al-Kutoubi A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2010;227(1–2):185–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728948>
99. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 2010;67(10):1187–94. Available from: http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2010.248%5Cnhttp://archneur.jamanetwork.com.proxy.bib.uottawa.ca/data/Journals/NEUR/7794/nct05004_1187_1194.pdf
100. Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: An open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol* [Internet]. 2012;11(2):150–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442211703052>
101. Llufrü S, Sepulveda M, Blanco Y, Marin P, Moreno B, Berenguer J, et al. Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(12):e113936. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medc&NEWS=N&AN=25436769>
102. Park JH, Kim DY, Sung IY, Choi GH, Jeon MH, Kim KK, et al. Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery* [Internet]. 2012;70(5):1238–47; discussion 1247. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127044>
103. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, 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.

104. El-Badri N, Ghoneim M a. Mesenchymal stem cell therapy in diabetes mellitus: progress and challenges. *J Nucleic Acids* [Internet]. 2013;2013:194858. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762531>

105. Pileggi A. Mesenchymal stem cells for the treatment of diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2012;61(6):1355–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22618774> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3357279/pdf/1355.pdf>

106. Shapiro, James; Lakey, Jonathan; Ryan, Edmond; Korbitt, Gregory; Toth, Ellen; Warnock, G; Kneeteman, Norman; Rajotte R. Islet Transplantation in Seven Patients with type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *N Engl J Med.* 2000;343(4):230–8.

107. Scully T. Diabetes in numbers. *Nature.* 2012;485:2–3.

108. Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D BM. Islet cell transplantation today. *Langenbecks Arch Surg.* 2007;392(3):239–53.

109. Hirshberg B. Lessons learned from the international trial of the edmonton protocol for islet transplantation. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2007;7(4):301–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17686407>

110. McCall M, James Shapiro AM. Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(7).

111. Shapiro AMJ, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. *N Engl J Med* [Internet]. 2006;355(13):1318–30. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa061267>

112. El-Badawy A, El-Badri N. Clinical efficacy of stem cell therapy for diabetes mellitus: A meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(4). Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84963801010&doi=10.1371%2Fjournal.pone.0151938&partnerID=40&md5=e2612d11a6a28c52c3d5a00e5291821e>

113. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue* [Internet]. 2001;7(2):211–228. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/107632701300062859>

114. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):64–76.

115. Korzyńska A, Zychowicz M. A Method of Estimation of the Cell Doubling Time on Basis of the Cell Culture Monitoring Data. *Biomed Eng (NY).* 2008;28(4):75–82.

116. Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Michael T, Malladi P, et al. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;94305:1139–46.
117. Hamid A, Idrus R, Saim A, Sathappan S, Chua K. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics [Internet].* 2012;67(2):99–106. Available from: <http://clinics.org.br/article.php?id=683>
118. Matsuda Y, Fujii T, Suzuki T, Yamahatsu K, Kawahara K, Teduka K et al. Comparison of Fixation Methods for Preservation of Morphology, RNAs, and Proteins From Paraffin-Embedded Human Cancer Cell-Implanted Mouse Models. *J Histochem Cytochem [Internet].* 2011;59(1):68–75. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3201123/pdf/10.1369_jhc.2010.957217.pdf
119. Sheehan DC HB. Theory and practice of histotechnology. In: Mosby. 1980. p. 481.
120. Goldstein M WS. Immunohistochemistry. *Curr Protoc Mol Biol [Internet].* 2008;31(1):14.6.1-14.6.13. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142727.mb1406s31>
121. Duschmann J, Gao S, Härter L, Hemmi S, Welti M, M.L. Wernel C, et al. Yield and proliferation rate of adipose-derived stromal cells as a function of age, body mass index and harvest site. *Cytotherapy.* 2013;15(9):1098–105.
122. Pu LL. Towards more rationalized approach to autologous fat grafting 1323. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012;65(1878–0539 (Electronic)):413–9.
123. Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, Mangoni D, Gallelli A, Bourkoula E, et al. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Res Ther [Internet].* 2015;6(1):2. Available from: <http://stemcellres.com/content/6/1/2>
124. Son D, Choi T, Yeo H, Kim J, Han K. The effect of centrifugation condition on mature adipocytes and adipose stem cell viability. *Ann Plast Surg.* 2014;72(5):589–93.
125. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell [Internet].* 2010;7(2):150–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682444>
126. Feng Y, Zhu M, Dangelmajer S, Lee YM, Wijesekera O, Castellanos CX, et al. Hypoxia-cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells are non-oncogenic and have enhanced viability, motility, and tropism to brain cancer. *Cell Death Dis.* 2014;5(12).

127. Li Y, Wu Q, Wang Y, Li L, Bu H, Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2017;39(4):775–82. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/>
128. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(13):2345–60.





ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hipoksik Ortamda Ototolog Serumla Elde Edilen İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Kriyoprezervasyon Etkisi, Proliferatif Ve Kondrojenik Farklanma Kapasitesinin İncelenmesi & 008			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Yiğit UYANIKGİL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU ÜNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırma Proje Fonu			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ ÜNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	OKTAY			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>	FAZ 4 <input type="checkbox"/>
	Gözlemsel İlaç Çalışması <input type="checkbox"/>	Tıbbi Cihaz Klinik Araştırması <input type="checkbox"/>			
	İn Vitro Tıbbi Tani Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları <input type="checkbox"/>		İlaç Dışı Klinik Araştırma <input checked="" type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz:				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	18.03.2015	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	01.04.2015	0	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 15-3.2/19	Tarih: 02.04.2015			
	Yukanda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği					
BAŞKANIN ÜNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayşenur OKTAY					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiagnostik	EÜ. Tıp Fakültesi Radyoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 1/2
---	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel anlamda her konuda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her türlü yardımı ve desteğiyle arkamda olduğunu bildiğim, ayrıca tez çalışma konumun belirlenmesinden, araştırmanın sonuçlanmasına kadar olan süreçte bana yol gösteren değerli danışman hocam **Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince bilgisi, tecrübesi, tavsiyeleri ve yarattığı imkânlarla yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Sn. Prof. Dr. Yiğit Özer TİFTİKÇİOĞLU**'na, flow sitometri analizleri aşamasında vaktini ayırarak yardımcı olan değerli hocam, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sn. Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ**'e, farklılaştırma deneylerim süresince benimle bilgisini, tecrübesini, vaktini ve emeğini paylaşan her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam **Sn. Prof. Dr. Dilek TAŞKIRAN**'a çok teşekkür ederim.

Çalışmamın deneysel aşamalarında bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan değerli arkadaşım **Sn. Arş. Gör. Gürkan YİĞİTTÜRK**'e, **Sn. Burak GÖKÇE**' ye, istatistiksel analizlerinin yapılmasında yardımcı olan **Sn. Doç. Dr. Timur KÖSE**'ye, projenin her aşamasında gece gündüz demeden her koşulda bilgisi, desteği ve yardımıyla yanımda değerli dostum ve iş arkadaşım olan **Sn. Esra ARISU NAGHAVİ**'ye çok teşekkür ederim.

Çalışmaya katılmayı kabul edip bilime katkı sağlayan tüm gönüllü hastalara sonsuz teşekkür ederim.

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi **Sn. Prof. Dr. Hüseyin ONAY**'a deneysel çalışmalarına vakit ayırabilmem için işyerinde gösterdiği anlayış ve desteği için sonsuz teşekkür ederim.

Desteğini ve inancını esirgemeyen daima bana güvenen canım ailem; babam **Mesut TEKELİ**, annem **Vicdan TEKELİ**, ablam **Şebnem TEKELİ**, baba yarım canım amcam **Dr. Ali TEKELİ**' ye ve yengem **Dr. Ayşe TEKELİ**' ye sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesine Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu 2015-TIP-011 nolu BAP projesi aracılığıyla destek sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Senem TEKELİ
E-posta : senemtekeli@gmail.com

Eğitim Durumu

2012-Halen Ege üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Kök Hücre Anabilim Dalı
Doktora

2006-2008 Anadolu Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji Bilim
Dalı – Yüksek Lisans - 4 / 3,67

2004-2005 Orta Doğu Teknik Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı
(Tamamlanmadı)

2000-2004 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı – Lisans – 4 /
3,48

Yüksek Lisans Tezi

“Bazı Bitki Ekstrelerinin Mast Hücreleri Üzerine Etkilerinin İn Vivo Araştırılması”

Burs & Başarı Bilgileri

Eğitim Başarı Bursu / Özel Kurum / 2006-2008 - ANKARA

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Yüksek Şeref Öğrenciliği / 2001-
2004

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mezuniyet Bölüm Üçüncüğü /
2004

Yabancı Dil

İngilizce Orta Doğu Teknik Üniversitesi Yabancı Dil Sertifika Programı 2004 -2005

Eğitim Sertifikaları

“Cord Blood Establishments Accreditation” under the EU Project of “Technical Assistance on Aligment in Human Tissues and Cells” – Sağlık Bakanlığı – 04-08 / 2018

Yabancı Dil Sertifika Programı – ODTÜ – 23.09 – 10.06 / 2005

New Brunswick Marka 170S Model CO2 İnkübatör Cihazına İlişkin Kullanıcı Eğitim Programı 14.11.2014

Olympus Marka S761 Model Stereo Mikroskop Cihazına İlişkin Kullanıcı Eğitim Programı 14.11.2014

OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi İç Denetçi Eğitimi

OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi

Toplam Kalite Yönetimi

ISO 9001:2008 Kalite Yönetimi Sistemi Temel Eğitimi

ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi İç Denetçi Eğitimi

Bigisayar Kullanımı (Bilgisayar İşletmenliği – Operatör) Programı Sertifikası

Katılım Sertifikaları

2. Hematolojik Genetik Sempozyumu / Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi /

24-26/2016 - İZMİR

2nd İnternational Congress On Stem Cell And Celluler Therapies / 15-18/2015 - ANTALYA

Somatic Cell Nuclear Transfer For Regenerative Medicine and Disease Modeling & In Vitro Production of Bovine Embryos / EUTF Kordon Kanı Hücre & Doku Merkezi / 2014

2. Ulusal Sağlık Bilimleri Lisansüstü Öğrenci Kongresi – Celal Bayar Üniversitesi –
17-20.04 / 2014

Ege Üniversitesi Temel Kök Hücre Eğitim Semineri Egekök/İZMİR25 Ocak
2014

1.Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi – Ege Üniversitesi / 2008

Staj

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı – 2004 (1 ay)

Bilgisayar Bilgisi

Microsoft Office Word – Excel – Powerpoint, Internet

İş Deneyimi

2011 – 2015 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Doku Hücre Uygulama ve Araştırma
Merkezi

2015 – Halen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Projelerde Aldığı Görevler

Hipoksik Ortamda Otolog Serumla Elde Edilen İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal
Kök Hücrelerde Kriyoprezervasyon Etkisi, Proliferatif Ve Kondrojenik Farklanma
Kapasitesinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi, 15-TIP-011, ARAŞTIRMACI, 2015-
Halen

Ursodeoksikolik Asidin Sirolimusa Maruz Kalmış İnsan Kemik İliği Kaynaklı
Mezenkimal Kök Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi, 15-
TIP-010, ARAŞTIRMACI, 2015-Halen

Hipoksik Ortamda Otolog Serumla Elde Edilen İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal
Kök Hücrelerde Kriyoprezervasyon Etkisi, Proliferatif Ve Kondrojenik Farklanma
Kapasitesinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi İnsan Etik Kurulu, 2015

Dergilerde Yayınlanan Makaleler

Tekeli Senem, Naghavi Esra Arısu, Gökçe Burak, Sır Gözde, Yiğittürk Gürkan, Çavuşoğlu Türker, Uyanıkgil Yiğit, Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları Review, 2016, FNG Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi 2016;1(2):72-83

Sır Gözde, **Tekeli Senem**, Kürekçi Şebnem Yıldırım, Naghavi Esra Arısu, Çavuşoğlu Türker, Uyanıkgil Yiğit, Kordon kanı kök hücreleri ve klinik kullanımı Review, 2016, FNG Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi 2016;1(2):53-58

Poster ve Bildiriler

2.Uluslararası Kök Hücre Ve Hücreyel Tedavi Kongresinde ‘Investigation Of The Effect Of Oxytocin On AT-MSK Exposure With Tacrolimus’ konulu poster, 15-18 Ekim/2015 - ANTALYA

2. Ulusal Sağlık Bilimleri Lisansüstü Öğrenci Kongresinde “Flow Sitometri Temel Prensipleri ve Kordon Kanında Kullanımı“ sunumu, 17-20 Nisan/2014 - MANİSA

“ İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Bankacığı” konulu seminer sunumu, 2014, Kordon Kanı Hücre & Doku Merkezi – İZMİR

“ Biyoteknolojinin Tıpta Kullanımı ” konulu seminer sunumu, Anadolu Üniversitesi - ESKİŞEHİR