

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA LUTEAL HÜCRELERDEN KÖK HÜCRE ELDE
EDİLEBİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**EMİNE ÜMRAN BOZKURT (ÖRSÇELİK)
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. A. ARZU YİĞİT**

**Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimince
Bağımsız Araştırma Projesi olarak desteklenmiştir.**

(Proje No: 2016/071)

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	i
Önsöz	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	iv
Şekiller	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
Kök Hücreler	1
Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	2
Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücreler	2
Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücreler	3
Mezenkimal Kök Hücrelerin Özellikleri	5
Mezenkimal Kök Hücreler ve Buldukları Yerler	5
Fiziksel Özellikleri	5
Elde Edildikleri Dokular	5
Yüzey Antijenleri	6
Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyelleri	6
Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Alanları	7
Tedavide Kök Hücre Kullanımının Avantajları ve Dezavantajları	9
Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanmasında Flow Sitometri (Akım Hücre Sayım) Metodunun Kullanılması	11
Ratlarda Luteal Hücreler	11
2. MATERYAL VE METOT	14
Luteal Hücre Kültürü Medyumları	14
Stok Hücre Medyumu	14
Stok Enzim Solüsyonu	14

Luteal Hücre Kültür Medyumu	14
Süperovulasyon Oluşturulması	15
Luteal Hücrelerin İzolasyonu	15
Percoll Gradient Yöntemi ile Hücrelerin Saflaştırılması	17
Hücrelerin Canlılık Oranlarının Belirlenmesi Amacıyla	18
Tripan Blue ile Boyanması	
Luteal Hücrelerin 3 β -HSD ile Boyanması	19
Luteal Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	20
Hücrelerin Kültüre Edilmesi	20
Flow-Sitometri ile Mezenkimal Kök Hücre Tanımlanması	21
Hücre Farklılaşmasının Tespit Edilmesi	22
Oil Red O ile Adiposit Farklılaşmasının Tespit Edilmesi	22
Alizarin Red S ile Osteosit Farklılaşmasının Tespiti	23
3. BULGULAR	24
İzole Edilmiş Olan Luteal Hücrelerin Mezenkimal	24
Kök Hücre Medyumunda Kültürü	
Luteal Hücrelerden Elde Edilen Kök Hücrelerin Flow Sitometri	25
ile Yüzey Markırlarının Belirlenmesi	
(Luteal Hücrelerin Karakterizasyonu)	
Luteal Hücrelerden Elde Edilen Mezenkimal Kök	26
Hücrelerin Farklı Hücre Hatlarına Dönüşmesi (Diferensiyasyonu)	
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	28
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	

ÖNSÖZ

Üreme ile ilgili problemler ekonomik, sosyal ve kültürel anlamda hem insan hem de hayvan sağlığı açısından önemlidir. Sadece birkaç yıl önce tedavisi mümkün görülmeyen birçok hastalık günümüzde kök hücreler kullanılarak tedavi edilebilmektedir. Bu araştırmada da ovaryum hastalıkları tedavisinde kullanılabilirliği mümkün olabileceği düşünülen multipotent özellikte mezenkimal kök hücrelerin korpus luteumdan elde edilmesinin mümkün olup olmadığı araştırıldı. Her ne kadar hastalıkların tedavisinde kat edilecek uzun ve zorlu yollar olsa da yapılan her çalışma insanlığın sağlık ve huzura doğru olan hedefine insanlığı biraz daha yaklaştıran adımlar olarak değerlendirilebilir.

Tezimi hazırlarken laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen değerli araştırmacılar Prof. Dr. A. Arzu YİĞİT, Dr. Ferda Alparslan PINARLI, Uzman Biyolog Meral TİRYAKİ ve Dr. Gülbahar BÖYÜK' e içten teşekkürler ediyorum. Aynı zamanda her zaman takdir ettiğim, aynı fakültede görev yaptığım mesai arkadaşım Prof. Dr. A. Arzu YİĞİT çok yoğun akademik ve bilimsel etkinliklerinin olduğu dönemde tez danışmanlığımı yaptı. Yoğunluğuna rağmen profesyonelliğinden taviz vermeksizin desteğini esirgemeyen tez danışmanıma ayrıca teşekkür etmek istiyorum.

Doğduğum günden beri beni okula, kitaba ve okumaya yönlendiren ve bilim sevgisinin tohumlarını yüreğime eken babam Mehmet BOZKURT ve annem Suzan BOZKURT'a minnettarım. Çocukluk ve gençlik yıllarımda benzer duyguları ve düşünceleri, daha sonra profesyonel düşüncelerini benimle paylaşan ablam Uzman Eczacı Esra ÖZYALÇIN ve eşi Dr. Ahmet ÖZYALÇIN'a, kız kardeşlerim Yardımcı Doçent Dr. Süheyla BOZKURT ve Yardımcı Doçent Dr. Feyza BAŞAK ile eşi Murat BAŞAK'a, ayrıca Elif, Ömer, Rana, Berra ve Burak'a hayatıma yaptıkları katkılardan dolayı çok teşekkür ederim.

Bu tezi can yoldaşım, hayat arkadaşım, sevgili eşim Avukat Hüseyin ÖRSÇELİK'e ithaf ediyorum. Ömrümüz oldukça hukuğa ve bilime sevgi katmaya devam edeceğiz.

SİMGELER VE KISALTMALAR

3 β -HSD	: 3 Beta hidroksi steroid dehidrojenaz enzimi
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
BLH	: Büyük luteal hücreler
BMP	: Kemik morfogenetik proteini
BSA	: Sığır serum albumini
$^{\circ}$ C	: Santigrat derece
CFU	: Koloni oluşturan birim
CO ₂	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DPBS	: Dulbecco'nun fosfat tamponu tuzu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EKH	: Embriyonal kök hücre
FBS	: Sığır fetüs serumu
G	: rölatif santrifüj gücü
Ham's F12	: Çin Hamster ovaryumundan elde edilen hücre üretme medyumu
hCG	: İnsan koriyonik gonadotropini
IPS	: İndüklenmiş pluripotent kök hücreler
IU	: Uluslararası ünite
kcal	: Kilokalori
kg	: Kilogram
KH	: Kök hücre
KLH	: Küçük luteal hücreler
LH	: Luteinleştirici hormon
M	: Molar
MAPC	: Multipotent yetişkin öncü kök hücre
ME	: Metabolik enerji
mg	: Miligram

MKH	: Mezenkimal kök hücre
ml	: Mililitre
MMKH	: Multipotent mezenkimal kök hücre
MMSH	: Multipotent mezenkimal stromal hücre
NaCl	: Sodyum klorür
O ₂	: Oksijen
P34cdc2	: Erginleşme Özendirici Faktör P34cdc2 tipi siklini
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PMSG	: Gebe kısrak serumu gonadotropini
SIP	: Stok izotonik Percoll solüsyonu
VH	: Vasküler hücreler
YKH	: Yetişkin kök hücre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Elde edildikleri kaynaklara göre yetişkin kök hücrelerin sınıflandırılması.	2
Şekil 2.1. Süperovulasyon oluşturulduktan sonra ovaryumların alınması.	15
Şekil 2.2. Ovaryum dokusunun laminar flowda mekanik olarak parçalanması.	16
Şekil 2.3. Santrifüj sonucunda %30-40' lık Percoll yoğunlukları sınırında büyük luteal hücrelerin, %20-30' lik Percoll yoğunlukları arasında küçük luteal hücrelerin yoğunlaşması.	18
Şekil 2.4. Tripan mavisi ile canlı hücrelerin Thoma lamında sayılması.	19
Şekil 2.5. 3 β -HSD pozitif luteal hücreler (X200)	20
Şekil 2.6. Ekimi yapılan luteal hücreler (0. Saat)	21
Şekil 3.1. Mezenkimal kök hücre medyumunda kültüre edilen luteal hücreler (X100)	24
Şekil 3.2. CD11b ve CD45R yüzey markırlarının negatif olduğunu gösteren flow sitometri sonuçları.	25
Şekil 3.3. CD90 ve CD49 yüzey markırlarının pozitif olduğunu gösteren flow sitometri sonuçları.	26
Şekil 3.4. Oil Red-O ile boyanmış adipositler.	27
Şekil 3.5. Alizarin Red ile boyanmış osteositler.	27

Ratlarda luteal hücrelerden kök hücre elde edilebilirliğinin araştırılması

ÖZET

Bu araştırma, sıçan korpus luteumlarından elde edilen luteal hücrelerin kök hücreye dönüşüp dönüşmediklerini incelemek amacıyla yapıldı. Şimdiye değin, mezenkimal kökenli kök hücre elde etmek için, kemik iliği, diş pulpası, adiposit doku gibi farklı dokular kullanılmış olup, bu çalışma luteal kökenli kök hücre elde etmek için yapılan ilk araştırmadır.

Bu amaçla, süperovulasyon yapılmış sıçan ovaryumlarından önce mekanik, sonra enzimatik işlemlerle luteal hücre süspansiyonu elde edildi ve hücreler Percoll gradient yöntemi ile saflaştırıldı. Elde edilen luteal hücreler her birinde 10^5 hücre olacak şekilde mezenkimal kök hücre medyumuna içerisinde T25 hücre kültür kaplarında %5 CO₂ içeren 37 ° C lik inkübatörde inkübe edildi. İkinci pasajın sonuna gelen hücrelerin bir kısmı ile flow sitometride tanımlama işlemi yapılırken, bir kısmı da başkalaşım medyumlarında inkübe edilmek üzere ayrıldı. Elde edilen hücrelerin CD11b ve CD45 yüzey markırlarının yönünden negatif, CD90 ve CD49 yüzey markırları yönünden de pozitif oldukları gözlemlendi. Adipogenez ve osteogenez farklılaşma kitleri kullanılarak luteal hücreden dönüşen kök hücrelerin yağ dokuya ve kemik dokuya başkalaşımaları gösterildi.

Bu sonuçlar, erişkin rat luteal hücrelerinin multipotent özellikteki erişkin stromal mezenkimal kök hücrelere dönüşebildiği hipotezini doğrulamaktadır. Bunun yanında korpus luteumdan elde edilecek kök hücrelerin özellikle dişilerde üreme sistemi hastalıklarında ve yapılması olası klinik çalışmalar için kök hücre kaynağı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: CD90, CD49, korpus luteum, farklılaşma, mezenkimal kök hücre

Investigation of the Achievability of Stem Cells Derived From Luteal Cells in Rats

SUMMARY

This study performed to investigate whether luteal cells from rat corpus luteum differentiate into stem cells or not. So far, different tissues such as bone marrow, dental pulp, and adipocyte tissue have been used to isolate mesenchymal stem cells. This is the first research to isolate stem cells originated from luteal tissue.

Luteal cell suspension isolated from superovulated rat ovaries by mechanical and enzymatic processes and the isolated cells were purified by Percoll gradient method. Isolated luteal cells were incubated in T25 flasks which each including 10^5 cells and mesenchymal stem cell medium at 37 °C with 5 %CO₂ at the end of the second passage. One part of the cells was used to determination of phenotypical characteristics of the cells and other part of them was incubated to treat differentiation medium. Isolated cells have negatively reacted for CD11b and CD45 surface markers and positively reacted for CD90 and CD49 surface markers. To differentiation into osteocytes and into the adipose tissue of the cells has been shown in osteocyte and adipocyte differentiation media.

These results support that the stem cells derived from the corpus luteum may also be used as stem cell sources especially in reproductive system diseases in the ovary, and may be a source for possible clinical trials; and support the hypothesis that adult rat luteal cells differentiate into adult stromal mesenchymal stem cells.

Key Words: CD90, CD49, corpus luteum, differentiation, mesenchymal stem cell

1. GİRİŞ

Kök Hücreler

Bir canlının vücudunda sınırsız olarak bölünebilen, kendini yenileyebilen ve bu sayede farklılaşmış hücreler oluşturabilen hücrelere kök hücre (KH) denir. (Şahin ve ark, 2005).

Bir hücrenin kök hücre olarak tanımlanabilmesi için aşağıdaki ölçütlere uyması gerekir:

1. Kromozomlarının ucunda bulunan telomer adı verilen binlerce DNA tekrar dizileri taşımaları nedeniyle uzun süre bölünebilme ve kendini yenileyebilme özelliklerinin bulunması,

2. Özelleşmemiş olması

3. Her bir hücrenin, *in vitro* olarak köken aldığı dokudan farklı olan en az bir hücre tipine ve köken aldığı dokunun hücrelerine farklılaşabilmesi,

4. Hasarlı bir dokuda *in vivo* olarak kendi kökeninden farklı olan en az bir hücre tipine ve köken aldığı dokunun hücrelerinden en az birine işlevsel olarak farklılaşabilmesi,

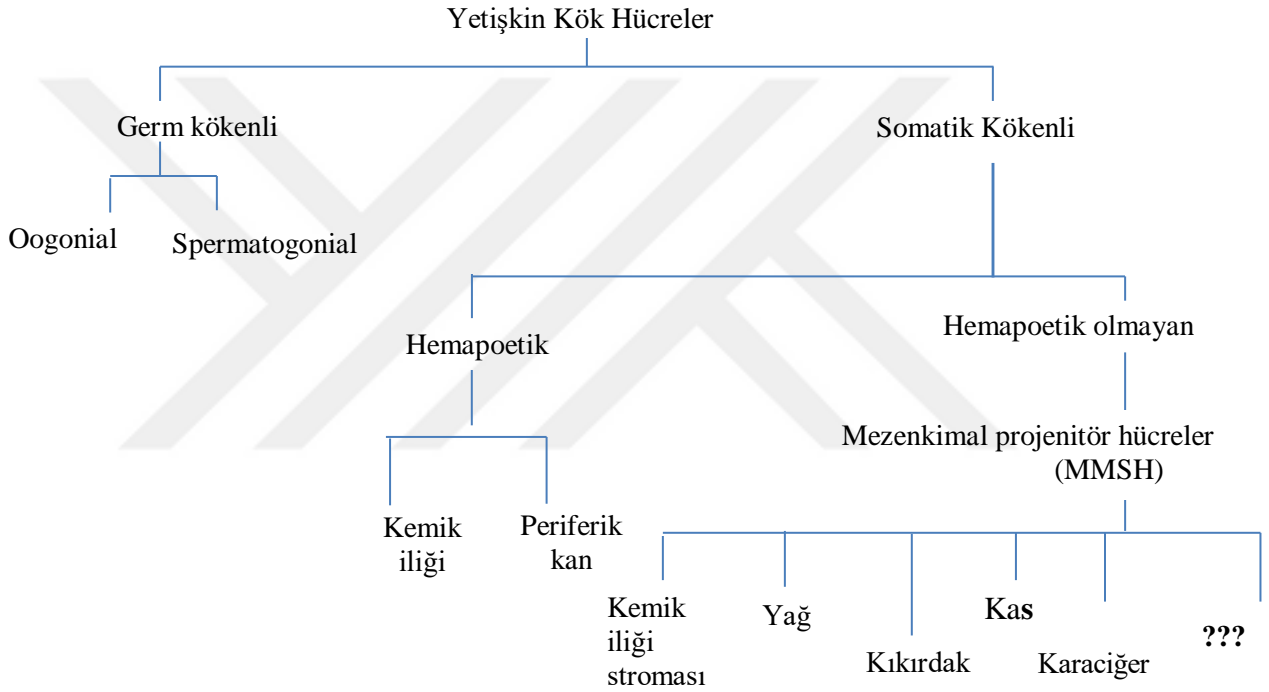
5. *In vivo* olarak doku hasarı olmadığı durumlarda da farklılaşma potansiyelleri bulunmalıdır (Karaöz & Ovalı, 2004).

Loeffler ve Roeder (2002) işlevsel olarak farklılaşmamış ve heterojen olarak tanımladığı kök hücrelerin, yukarıda sıralanan işlevlerden bir ya da birden fazlasını geri dönüşümlü olarak gerçekleştirebildiklerini belirtmiştir.

Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Elde Edildikleri Kaynaklara Göre

Karaöz & Ovalı, (2004) kök hücreleri, gelişim sırasında embriyoya ait ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakasına ve bunlardan köken alan farklı hücre tiplerine dönüşebilen embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak iki ana gruba ayırarak, embriyonik olmayan kök hücreleri erişkin kök hücreler, fetal kök hücreler, kadavradan elde edilen kök hücreler, göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri ile partenogenez ile elde edilen partenot denilen kök hücreler olarak sınıflandırmıştır.



Şekil 1.1. Elde edildikleri kaynaklara göre yetişkin kök hücrelerin sınıflandırılması.

Yetişkin kök hücreler germ ya da somatik hücre kökenli olabilirler. Germ hücre kökenli olanlar spermatogonial kök hücre ve oogonial kök hücrelerdir (Bongso ve Lee, 2005). Somatik hücre kökenli olanlar ise hemapoetik kök hücreler ve hemapoetik olmayan kök hücreler olarak gruplandırılabilir. Hemapoetik kök hücreler kemik iliği ya da periferik kan kaynaklı olabilirken, hemapoetik kökenli olmayanlar, erişkin kemik iliği stroması mezenkimal kök hücreleri (MMSH) veya mezenkimal projenitör hücre olarak bilinirler (Özmen ve ark, 2006). Bu hücreler, kemik, kıkırdak, yağ, tendon, kas ve kemik iliği stromasını içeren farklı mezenkimal dokulara *in vitro* veya *in vivo* olarak

dönüşebilen multipotent erişkin projenitör (öncül) hücreler (MMKH) dir (Özmen ve ark, 2006) (Şekil 1.1).

Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücreler

Totipotent kök hücre: Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler sınırsız farklılaşma özelliğine sahiptirler, tam bir organizmayı oluşturabilme potansiyeline sahiptirler, yani totipotent özellik göstermektedirler.

Pluripotent kök hücre: Erken embriyonik dönemde blastosist'in iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonal KH' ler ve erken embriyonik dönemde elde edilen primordiyal cinsiyet hücreleri bu gruba girerler. Bu hücreler *in vitro* olarak sınırsız bölünebilme ve *in vitro* ortamda uzun süre üretildikten sonra dahi organizmada bulunan her üç germ tabakasının tüm hücrelerine dönüşebilme yani farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler.

Multipotent kök hücre: Erişkin ya da yetişkin kök hücreler (YKH), yetişkin dokulardaki öncü (projenitör) hücrelere dönüşme kapasitesi olan, kısmen farklılaşmış hücrelerdir. Bu hücreler organizmanın yaşamı boyunca kendini yenileyebilme özelliğine sahiptirler, ancak pluripotent özelliği bulunan embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlı farklılaşma potansiyelleri bulunur, belirli hücre soylarına farklılaşabilirler (Bassi ve ark, 2011). Bu yüzden multipotent erişkin projenitör hücreler olarak ta tanımlanırlar (MAPC) (Bongso ve Lee, 2005; Reyes ve Verfaillie, 2001). Hemapoetik ve Mezenkimal KH' ler en çok çalışılan multipotent hücrelerdir (Can, 2014, Avecilla ve ark, 2003, Alvarez Dolado ve ark, 2003).

Unipotent kök hücre: Kendini yenileme özelliği sınırlı olan ya da hiç olmayan, yalnızca belli bir hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir (Lakshmiathy ve Verfaillie, 2005). Kas, iskelet, kalp-damar, sinir, sindirim sistemleri ile epitel doku, testis ve ovaryum kök hücreleri unipotent özellikte YKH'dir (Can, 2014).

Bu tanımlamalara ek olarak laboratuvar ortamında hücre çekirdeklerinin yeniden programlanmasıyla geliştirilen hücreler de bulunmaktadır. Cowan ve arkadaşları (2005), oositlere alternatif olarak insan somatik hücre çekirdeğini yeniden programlamak için

embriyonik kök hücrelerin kullanılabilceğini keşfetmişlerdir. Bu amaçla insan embriyonik kök hücrelerini insan fibroblast hücreleri ile kaynaştırarak kararlı tetraploid DNA içeriğine sahip insan embriyonik kök hücreleri elde etmişlerdir. Bu hücrelerin morfolojilerini, büyüme özelliklerini, yüzey antijen belirteçlerinin insan embriyonik kök hücreleri özelliklerini gösterdikleri gözlenmiştir. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* olarak farklılaşan hücrelerin her bir embriyonik germ tabakasında bulunan hücre tiplerini verdiği de belirlenmiştir. Araştırmacılar bu çalışma sonucunda insan somatik hücrelerinin çekirdeğinin yeniden programlanarak insan embriyonik kök hücrelerine dönüşebileceğini göstermişlerdir.

Takahashi ve Yamanaka (2006), fare embriyonik ya da yetişkin fibroblast hücrelerinden bazı transkripsiyon faktörlerinin hücre kültürü ortamına eklenmesiyle pluripotent kök hücreler elde edildiği bildirilmiş ve bu hücreler indüklenmiş pluripotent kök hücreler (IPS) olarak adlandırılmıştır. Elde edilen hücrelerin şekil, büyüme, antijen belirteçleri özellikleri yönünden embriyonik kök hücre özelliklerine sahip oldukları gösterilmiştir. Farelere deriyaltı olarak transplante edildiğinde her üç germ tabakasından çeşitli dokular içeren tümörler oluştuğu, blastosistlere enjekte edilmesiyle bu hücrelerin fare embriyosunun gelişimine katkı sağladığı belirtilmiştir. Bu çalışmadan da anlaşılacağı gibi yalnızca belli birkaç faktörün fibroblast kültürlerine eklenmesiyle pluripotent özellikte kök hücreler üretilebilmektedir.

Mezenkimal Kök Hücrelerin Özellikleri

Mezenkimal Kök Hücreler ve Buldukları Yerler

Mezenkimal kök hücreler hemapoetik kökenli olmayan, kemik iliği, kemik, kıkırdak, düz kas ve iskelet kası gibi neredeyse tüm vücut dokularında bulunan ve izole edilebilen multipotent özellikteki yetişkin kök hücrelerdir (Bassi ve ark, 2011). Başka bir deyişle

bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücrelerdirler. Bu hücreler mezodermal kökenli olup, içinde bulunduğu dokunun (yağ, kıkırdak, kemik, kas, sinir doku hücreleri gibi) özelleşmiş hücrelerine ya da farklı doku hücrelerine dönüşebilirler (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Fiziksel Özellikleri

Multipotent mezenkimal kök hücreler (MMKH) görünüş olarak fibroblastlara benzer, iğ şeklinde hücrelerdir. Bu hücreler plastik ve cama yapışabildikleri için hemapoetik hücrelerden kolayca ayrılırlar ve (Bassi ve ark, 2011) ve *in vitro* koşullarda erken üreme dönemlerinde fibroblast şeklinde koloni oluşturan birimler (CFU) oluşturmak üzere hızlı proliferasyon özelliklerine sahiptirler (Baer ve Geiger, 2012, Horwitz ve ark, 2005).

Uygun besi yerleri kullanılarak üretilen MKH düzenli aralıklarla % 0,25 tripsin-EDTA ile tutunmuş oldukları besi yerlerinden ayrılırlar ve yenilenmiş besi yerleri içeren yeni plastik kaplara aktarılırlar.

Elde Edildikleri Dokular

Mezenkimal kök hücreler başlıca kemik iliğinde olmak üzere, yağ (Baer & Geiger, 2012; Ra ve ark., 2011, Minguell ve ark, 2001), kemik (Nakahara ve ark, 1991), kas (Da SilvaMeirelles ve ark, 2006), deri, kordon kanı, amnion sıvısı, diş pulpası, retina, kornea, böbrek (Da SilvaMeirelles ve ark, 2006), sinovya (Jones & Pei, 2012; Pei ve ark, 2008), pankreas (Da SilvaMeirelles ve ark, 2006; Kroon ve ark, 2008), beyin, dalak, karaciğer, böbrek glomerülü, akciğer, timüs gibi doku ve organlardan elde edilebilirler (Da SilvaMeirelles ve ark, 2006).

Yüzey Antijenleri

İnsan MMKH' in CD73, CD166, CD54, CD55, CD13, Stro-1 ve CD44, CD90, CD105 yüzey antijenlerini taşıdıkları flow sitometri metodu ile tespit edilmiştir (Davis ve ark, 2012; Li ve ark 2012). Yüzeylerinde T hücrelerinin aktivasyonunda yardımcı uyarıcı moleküller olan CD40, CD80, CD86 ve hemapoetik yüzey antijenlerinden CD14, CD45, CD34 ve CD11b gibi hemapoetik belirteçleri eksprese etmezler (Bassi ve ark, 2011).

Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyelleri

Mezenkimal kök hücreler köken aldıkları bağ doku hücreleri olan yağ, kas, kemik, kıkırdak, tendon gibi hücrelere farklılaşabildikleri gibi, köken aldıkları dokudan farklı olan sinir, karaciğer, pankreatik hücre gibi diğer doku hücrelerine de dönüşebilmektedirler (Caplan, 2008). Bu özellik transdiferensiyasyon ya da plastisite olarak adlandırılır (Bassi ve ark, 2011). Literatürde bu hücrelerin *in vitro* olarak multipotent farklılaşma özellikleri olduğu gibi (Dominici ve ark, 2006) *in vivo* olarak da aynı hücre dizilerine farklılaşma özelliklerinin de bulunduğu bildirilmiştir (Bassi ve ark, 2011).

Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Alanları

Mezenkimal kök hücrelerin hızlı proliferasyon, hasarlı dokularca salgılanan sitokinlere doğru hareket etme, immunmodülasyon, antiapoptik, antiinflamatuvar ve anjiyojenik özellikleri bulunur. Bu özellikleri nedeniyle kemik (Alvarez-Dolado ve ark, 2003; Avecilla ve ark, 2003; Horwitz ve ark, 2001), kas (Smaldone ve Chancellor, 2008), eklem (Jones ve Pei, 2012) ve tendon (Smith ve ark, 2003) hastalıklarının tedavisinde kullanılması yönünde ilerleme kaydedilmektedir. İmmun baskılayıcı özellikleri nedeniyle (Shi ve ark, 2010; Uccelli ve ark, 2007) lupus eritematosus (Liang ve ark,

2010; Ren ve ark, 2012), osteogenezis imperfekta (Horwitz ve ark, 2001), oto immün işitme kaybı, multiple skleroz, poliyomiyotit, atopik dermatit (Ra ve ark, 2011), otoimmün tip 1 diyabet, romatoit artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar (Ra ve ark., 2011; Ren ve ark., 2012). Ren ve ark (2012) hematopoetik sistem defektleri, graft-versus host hastalığında, myokardial enfarktüs, Parkinson, akciğer ve omurilik yaralanmaları, karaciğer fibrozisi, kemik kırıkları, yanıklar, korneal abrasyonda farklı kökenden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığını belirtmiştir. Hasarlı hücrelerle füzyon yeteneklerinin bulunması da onları klinik kullanım için avantajlı kılar (Akgün 2016).

Kök hücreler hastalıkların hücresel tedavisi, transplantasyonlar, ilaç etkinliklerinin araştırılması ve doku mühendisliği alanlarındaki uygulamalarda da değerli bir kaynak olarak görülmektedir (Uçkan, 2007; Ulloa-Montoya ve ark, 2005).

Veteriner hekimlikte köpeklerde genetik kökenli muskuler distrofik hastalıkların (Vieira ve ark, 2012), periodontal defektlerin (Inukai ve ark, 2013; Tsumanuma ve ark, 2011), tedavisinde, atlarda tendon hastalıklarının tedavisinde (Richardson ve ark, 2007, Smith ve ark, 2003), karaciğer (Kocken ve ark, 1996) hastalıklarında hücresel tedavi seçeneği olarak kök hücreler kullanılmaktadır.

İnsanda sık rastlanan Duchenne kas distrofisinin eşdeğeri olarak kabul edilebilecek Golden Retriever kas distrofisi tedavisinde yağ aldırma yöntemi ile insanlardan elde edilen yağ doku kökenli stromal hücrelerinin lokal olarak 2 köpeğe, sağ *musculus biceps femoris*'e ve sistemik olarak *vena cephalica* yoluyla 4 hasta köpeğe enjekte edildiği bildirilmiştir (Vieira ve ark, 2012). Başlangıçta hastalığa neden olan kas distrofini bulunmamasına rağmen lokal kök hücre enjeksiyonunun uygulanmasından 6 ay sonra distrofik kaslarda kas distrofini Western blot ve immün floresan metotları ile tespit edilmiştir. Köpeklere herhangi bir immün baskılanma söz konusu olmadan yüksek miktarda insan yağ doku kökenli stromal hücrelerin sistemik olarak uygulanabildiği de bu araştırma için dikkate değer bir sonuçtur.

Tsumanuma ve arkadaşları (2011), 4 erkek Beagle köpeğin periodontal ligamentinden, alveol *periosteum*'undan ve kemik iliğinden elde ederek ürettikleri mezenkimal hücreleri aynı köpeklerde ikinci ve dördüncü mandibula *premolar* dişlerinin

çekilmesi ile oluşturulan kemiksel defektin tedavisinde kullanmışlardır. Transplantasyonu izleyen 8. haftada periodontal ligamentin rejenerasyonunu ve yeni *cementum* tabakasının geliştiğini gözlemlemişlerdir. Bu üç kaynaktan elde edilen hücrelerden kemiksel defektlerin hücresele tedavisinde en başarılı sonuca periodontal ligamentten elde edilen mezenkimal hücreler ile ulaşıldığını belirtmişlerdir. Inukai ve arkadaşları (2013) da benzer şekilde deneysel olarak mandibular *premolar* dişleri çekilmek suretiyle tek taraflı kemiksel defekt oluşturulan beş köpeğe insan ve köpektan elde edilen mezenkimal kök hücreler ve köpektan elde edilen periodontal ligament hücreleri ile hücresele tedavi uygulayarak *cementum* ve kemik doku rejenerasyonunda başarılı sonuç aldıklarını bildirmişlerdir.

Smith ve arkadaşları (2003), araştırmalarında *musculus flexor digitorum superficialis*'in tendosu zarar gören, 11 yaşlı polo Midilli atın kendi kemik iliğinden elde edilerek *in vitro* çoğaltılan hücrelerden hazırlanan süspansiyon hasarlı tendo bölgesine 10 ar gün aralıkla 6 hafta süre ile enjekte etmiş, 6 hafta sonunda klinik muayenede topallama ve ağrının azaldığı gözlemlemişlerdir.

Ovaryumda hücresele tedavi seçenekleri üzerine çalışan Abd-Allah ve ark (2013) da 14 gün boyunca siklofosfamid enjeksiyonu ile ovaryumlarında tahribat oluşturdukları erişkin diş tavşanlara erkek tavşanların kemik iliğinden elde edilerek *in vitro* olarak çoğalttıkları mezenkimal kök hücreleri, son siklofosfamid enjeksiyonunun ardından damar içi yolla uygulamışlardır. Uygulamadan 6 hafta sonra östradiol ve FSH düzeyleri siklofosfamid enjeksiyonundan önceki düzeylere ulaşmış, folikül sayısında artış olduğu gibi, antral foliküller ve korpus luteum da dahil ovaryum foliküllerinde belirgin bir düzelme tespit etmişlerdir.

Takehara ve arkadaşları (2013), fare ve ratların yağ dokusundan, rat kemik iliğinden ve rat kuyruğundan izole ederek *in vitro* olarak ürettikleri mezenkimal ve rat kuyruk fibroblast hücrelerinin rat ovaryumunda bir hücresele tedavi seçeneği olup olmayacağını araştırmıştır. Bu amaçla 14 gün ardışık siklofosfamidin intraperitoneal yol ile enjekte edildiği diş rat ve farelerin ovaryumuna son siklofosfamid enjeksiyonundan 15 gün sonra elde edilen kök hücreleri enjekte etmişlerdir. Hücre transplantasyonundan 8 hafta sonra diş farelerden normal proöstrusu yansıtan vaginal yayma elde edilmiş ve dişilerin

erkekler ile normal çiftleşme davranışlarını gösterdiği gözlenmiştir. Aynı süreçte hücrel tedavi uygulanan dişilerin ovaryumunda foliküllerin, korpus luteumun normal görünümünü aldığı da belirlenmiştir. Çiftleşen dişilerin 21-22 günlük normal gebelik sürecinin ardından kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre enjekte edilen ratlarda ortalama 12,8 ve yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre enjekte edilen ratlarda ortalama 13,6 tane yavru doğumu gerçekleştiği bildirilmiştir.

Wang ve ark (2014) dişi farelerin germ hücrelerinin pluripotent hücrelere dönüştüğünü bildirmişler, Wu ve ark (2017) da 6 günlük dişi farelerden elde ettikleri germ kök hücreleri *in vitro* ortamda kültüre ederek kısırlaştırılmış dişilerin ovaryumlarına transplante etmişler ve kısır farelerin ovaryum fonksiyonlarının düzeldiğini ve yavru verebildiklerini göstermişlerdir.

Tedavide Kök Hücre Kullanımının Avantajları ve Dezavantajları

Son yıllarda kök hücrelerin, önemli işlevleri olan organlardaki hastalıklar ve hasar durumlarında organ ve dokuların yenilenmesi ve/veya rejenerasyonu amacıyla kullanılmasına yönelik çalışmalar büyük hızla artmaktadır (Li ve ark, 2012; Ren ve ark, 2012; Ulloa-Montoya ve ark, 2005). Bağdoku kökenli olan kök hücreler buldukları organın parenkimal hücrelerine stromal destek sağlayabilmelerini sağlar. Hasarlı hücrelere tutunma özelliklerinin bulunması (Alvarez-Dolado ve ark, 2003) ve büyüme faktörleri, sitokinler gibi bazı kimyasal maddeleri salgılayabilmeleri (Avecilla ve ark, 2003) nedeniyle organ ve dokuların yenilenmesine kaynaklık edebilmeleri mümkün olmaktadır. Kök hücre çalışmaları organ nakline alternatif olarak ve organ nakli sonucu oluşan akut doku uyumsuzluğu sendromunda hastalıklarda rutin tedavi olarak da kullanılmaktadır (Shi ve ark, 2010; Uccelli ve ark, 2007).

Embriyonal kök hücrelerin hastalıkların tedavisinde ya da hasarlı dokuların tamirinde kullanılması, embriyonik kök hücreleri hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilebilmesi nedeniyle dezavantaj oluşturmaktadır. Dokunun reddedilmesinin önüne geçilebilmesi kök hücre bankalarının kurulması ya da hasta DNA'sının klonlanarak

üretilecek kök hücrelere transfer edilmesi ile mümkün olabilir. Etik olarak da tartışmalara neden olan bu sorun hastalıkların tedavisinde hastanın kendi erişkin kök hücrelerinin kullanılması yoluyla çözülmeye çalışılabilir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin sayılarının *in vitro* ortamlarda üretilerek çoğaltılması gerekmesi, bunun için teknolojik altyapı ve tecrübe gerektirmesi yanında bu süreçte kullanılan malzeme ve kimyasal maddelerin uluslararası standardizasyonu ve uzun süre kültür çalışmaları gerektirdikleri için dezavantaj oluşturmaktadır. Klinik kullanımda tekrarlayan transplantasyonlarda doğrudan doğruya dokulara hücre implante etmenin gerekli olduğu hallerde özel metotların kullanılmasının gerekmesi de mezenkimal kök hücrelerinin klinik kullanımlarında günümüzde karşılaşılan diğer bazı dezavantajları olarak sıralanabilir (Caplan, 2008; Uçkan, 2007).

Kök hücrelerin *in vitro* farklılaşması sırasında oluşan hücre popülasyonunun farklı hücre hatlarını içeren yani homojen olmayan bir hücre topluluğu olması ve üretilmesi arzu edilen hücre tipinin bu toplulukta az sayıda bulunması kök hücre eldesinde karşılaşılan bir dezavantaj olarak bildirilmiştir (Ulloa-Montoya ve ark, 2005). Multipotent özellikteki stromal kök hücrelerin kemik iliğinden izole edilen hücrelerin, Percoll gradient yoğunluğu 1.073 g/ml olan çok küçük bir oranını (% 0,001-0,01 arasında) oluşturduğu bildirilmiştir (Pittenger ve ark, 1999).

Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanmasında Flow Sitometri (akım hücre sayım) Metodunun Kullanılması

Flow sitometri, bir solüsyon içerisinde bulunan hücrelerin cihaza enjekte edilmesiyle üç boyutlu uzayda sıvı ortamda dağılan hücre solüsyonunun akımı esnasında cihazın okuyucusundan geçerken birden fazla özelliğinin tespit edilmesi esasına dayanır. Flow sitometride farklı hücre popülasyonları boyutlarına ve tanecikli yapılarına göre tanımlanır, zayıf ekspresyonlu yüzey antijenleri belirlenebilir. Ayrıca flow sitometri özel hücrelerin yüzey antijen profillerinin doğru şekilde tanımlanmasına olanak tanıyan çok renkli analizin mümkün olduğu bir metottur (Dunphy, 2004). Mezenkimal kök hücre

popülasyonunun en az %95 oranında CD105, CD73 veya CD90 yüzey antijenlerine sahip olduklarının flow sitometri yöntemi ile belirlenebilmesi gerekir. Bunun yanında CD45, CD34, CD14 ya da CD11b, CD79 α ya da CD19 ve HLA sınıf II yüzey antijenlerinin ekspresyonunun bulunmaması (bu antijenlerin multipotent mezenkimal kök hücre yüzeylerinde % 2' nin altında ekspresyona sahip olması) gerekir (Dominici ve ark, 2006).

Ratlarda Luteal Hücreler

Ratlarda seksüel siklusun metöstrus (ya da diöstrus 1) fazında ovaryumda aktif bir korpus luteum bulunur. Korpus luteum birbirlerinden morfolojik ve biyokimyasal olarak ayırt edilebilen üç farklı hücre tipini içerir: küçük luteal hücreler (KLH), büyük luteal hücreler (BLH) ve vasküler hücreler (VH) (Niswender ve ark, 2000).

Küçük luteal hücreler 12-20 μ m çapındadırlar. Korpus luteum oluşurken ovule olan folikülün teka hücreleri KLH'e dönüşürler (Milvae ve ark, 1996). KLH'in LH reseptörlerine sahiptirler. Bu hücrelerde progesteron hormonu üretimi protein kinaz A aracılığıyla LH tarafından uyarılır.

Büyük luteal hücreler 20 μ m'den büyük çaptaki hücrelerdir. Büyük luteal hücreler ovulasyondan sonra folikülün granuloza hücreleri tarafından oluştururlar. Korpus luteum yaşlandıkça bazı KLH'in büyük hücrelere dönüştüğü de bilinmektedir. Yani siklusun ileri aşamalarında büyük hücreler folikülün teka hücrelerinden köken alırlar (Hansel ve Blair, 1996). Büyük luteal hücreler sayıca KLH'e göre daha az olmasına rağmen, korpus luteumun ürettiği progesteron'un çoğunu sentezlerler ve KLH'e göre daha az LH reseptörleri bulunur. Bu nedenle düşük düzeylerdeki LH'dan etkilenmeksizin bazal progesteron üretimlerini sürdürürler. Bu hücrelerde de aktif protein kinaz A bulunduğu düşünülmektedir (Diaz ve ark, 2002). BLH ve KLH in birlikte bulduklarında progesteron üretiminin arttığı da bilinen bir durumdur (Nelson ve ark, 1992).

Vasküler hücreler immun hücrelerdir. Endotel hücreleri, eritrosit, lökosit, T lenfosit ve makrofajları içerirler. Vasküler hücreler çeşitli kimyasal haberciler salgılayarak luteal işlevin gerçekleştirilmesinde tamamlayıcı rol oynarlar (Meidan ve ark, 1999).

Ovaryumda özellikle germ hücrelerinin varlığı (Esmailian, 2010) ve elde edilmesine yönelik kök hücre çalışmaları (Johnson ve ark, 2004; Johnson ve ark, 2005; Lange-Consiglio ve ark, 2016; Liu ve ark, 2007; Pacchiarotti ve ark, 2010; Wang ve ark, 2014, Wu ve ark, 2017) bulunmaktadır. Korpus luteumdan luteal hücreler elde edilmesi yönünde çalışmalar bulunmasına rağmen (Hild-Petito ve ark, 1989; Mondal ve ark, 2013; Nelson ve ark, 1992; O'Shaughnessy ve Wathes, 1985), ovaryumdan mezenkimal kök hücre varlığının gösterilmesine ya da elde edilmesine yönelik çok az sayıda araştırma bulunmaktadır (Beşikcioğlu, 2015, Gök, 2011).

Dişi ratlarda kemoterapötik bir ajan olan siklofosfamid ile deneysel olarak oluşturulan ovaryum hasarında erkek rat kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ile rat ovaryumun stromasından elde edilen kök hücreler kullanılmıştır. Ratlara bir hafta ara ile 2 kez periton içi siklofosfamid enjeksiyonunun sonrasındaki günlerde olmak üzere 2 kez periton içi yol ile kök hücre enjeksiyonu uygulanmıştır. Son enjeksiyonun ertesini günü sakrifiye edilen dişi sıçanlarda ovaryum dokusunda folikül maturasyonu için önemli moleküller olan Konneksin- 43, BMP-6, BMP-15 ve p34Cdc2 moleküllerinin dağılımını immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Ovaryumda siklofosfamidin neden olduğu hasarı önlemede ovaryum stromasından köken alan kök hücrelerin daha etkili olduğu belirlenmiştir (Beşikcioğlu, 2015).

Ovaryumda kök hücrelerin varlığının araştırılması için, yeni doğan (2 günlük), pubertal (6 haftalık), ergin (12 haftalık) ve yaşlı (18 aylık) dönemdeki dişi farelerin ovaryumları alınarak, oositlerde, granuloza hücrelerinde ve ovaryum yüzey epitelinde Nanog ve Oct 3/4, c-Kit ve SSEA-1 yüzey markırlarının varlığı incelenmiştir. Nanog ve Oct 3/4 pluripotent ve embriyonik kök hücrelerde bulunan güçlü transkripsiyon faktörleridir. C-Kit oosit-granuloza etkileşiminde rol oynayan tip III reseptör tirozin kinazdır ve SSEA-1 fare ve insan embriyonik kök hücrelerinde tanımlanan trofoblast farklılaşmasının göstergesi olan yüzey markırlarından biridir. Bu yüzey antijenlerinin yaşlı grup dışında tüm grupların oositlerinde, ergin ovaryumlarında granuloza

hücrelerinde ve SSEA-1 dışında ergin ovaryum yüzey epitelinde bulunduğu immunohistokimyasal boyamalar ile gösterilmiştir (Gök, 2011).

Wang ve ark (2014) dişi farelerden elde ettikleri germline kök hücrelerin pluripotent özellikte olduğunu göstermişler, Wu ve ark (2017) da aynı tipteki germline hücrelerin ovaryumu hasarlanmış farelerde *in vivo* olarak yumurta hücresine dönüşerek farelerin yavru verebilme yeteneğini yeniden kazandıklarını bildirmişlerdir.

Yapılan bu araştırma ile kök hücrelerin elde edilmesinde korpus luteumun bir kaynak olup olmadığı ortaya konulması amaçlandı. Ayrıca Korpus luteumdan kök hücre elde edilmesi ve elde edilen kök hücrelerin kültüre edilmesi, farklılaşmasında uygun mikro çevrenin sağlanması hedeflendi. Korpus luteum kaynaklı kök hücrelerin başlıca over kaynaklı problemlerde tedavi amaçlı kullanılıp kullanılmayacağı daha sonra yapılması planlanacak çalışmalar içerisinde olacaktır. Bunun için öncelikle luteal hücrenin kök hücreye dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi gerekmektedir.

2. MATERYAL ve METOT

Araştırmanın etik onayı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (2016/15). Bu çalışmada 25-30 günlük 12 adet dişi Sprague-Dawley rat kullanıldı. Ratlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlıkta tutularak ad libitum su ve standart yem (ME 2600 kcal) sağlandı.

Luteal Hücre Kültürü Medyumları

Stok Hücre Medyumu

Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/F-12), %1 L-glutamin (Sigma, 51445C) + %1 antibiyotik + antimikotik (Gibco, 15140122) karışımı.

Stok Enzim Solüsyonu

%0,05 lik DNAz (Roche, SAP-10054034) ve %0,5 BSA (Sigma-Aldrich, A-3983).

Luteal Hücre Kültür Medyumu

Stok hücre medyumuna %10 FBS (Gibco, 10082139 eklendi. Medyum kültürden önce 22 µm lik filtreden (AISIMO Syringe Filter Lot:170227SF33CA22S) geçirilerek filtre edildi.

Süperovulasyon Oluşturulması

Ratlarda süperovulasyon oluşturmak için 30 IU/kg PMSG, 53 saat sonra 25 IU/kg hCG intraperitoneal yol ile uygulandı. Uygulamadan 6 gün sonra, ketamin hidroklorit (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile genel anestezinin ardından ovaryumlar alındı (Böyük, 2017) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Süperovulasyon oluşturulduktan sonra ovaryumların alınması.

Luteal Hücrelerin İzolasyonu

Soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılan ovaryumların üzerine bir miktar steril PBS koyularak, çevre dokular steril petride temizlendi. Ovaryuma birçok kez batırılan 26 G lik bir iğne ile mevcut foliküllerin tamamı parçalandı. Parçalanmış doku PBS ile yıkanarak granuloza hücreleri ortamdaki uzaklaştırıldı.

Parçalanmış haldeki ovaryum %0,25 lik Tripsin-EDTA (Thermo Fischer Sci, katalog no 25200056) solüsyonunda 15 dakika süre ile %5 CO₂ içeren etüvde 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Ovaryum yüzeyindeki epitel hücreleri bu şekilde uzaklaştırıldıktan sonra etüvden alınan doku PBS ile yıkandı. Stok hücre medyumunu

içerisine alınan doku laminar flowda steril bir jilet ile daha küçük parçalara ayrıldı (Şekil 2.2). Parçalanmış ovaryum dokusu 70 µm por genişliğindeki steril filtreden (Corning inc. 352350) geçirildi. Filtrenin üzerinde kalan doku parçaları 25 ml lik bir erlenmayere aktarıldı. Bu doku üzerine 5 ml stok enzim solüsyonuna 10 mg tip 2 kollajenaz (%0,2) (Sigma-Aldrich, C6885) eklenerek elde edilmiş ve 2 dakika %95 O₂ ve %5 CO₂ ile oksijenlendirilmiş olan medyum eklenerek hücreler enzimatik parçalanmaya tabi tutuldu. Hücre süspansiyonu her 10 dakikada bir pastör pipeti ile karıştırmak suretiyle 1 saat süreyle 37 °C sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Her bir saat sonunda süpernatant alınarak falkon tüpe aktarıldı ve +4 °C de muhafaza edildi. Kollajenazlı medyum her uygulamada taze olarak hazırlandı ve işlem hücrelerin hepsi parçalanıncaya kadar tekrarlandı. Üç veya dört enzimatik parçalanma periyodundan sonra toplanan süpernatant 70 µm lik filtreden tekrar süzüldü ve 10 dakika süre ile +4 °C'de 1400 devir/dakika santrifüj işlemi uygulanarak süpernatant atıldı. Aynı işlem her defasında tüpte kalan hücrelerin üzerine 15 ml yeni medyum eklenerek 3 kez tekrar edildi (O'Shaughnessy & Wathes, 1985) .



Şekil 2.2. Ovaryum dokusunun laminar flowda mekanik olarak parçalanması

Bir dizi santrifüj ve yıkama işlemlerinden sonra elde edilen luteal hücreler stok hücre solüsyonu ile 1 ml'ye tamamlandı ve hazırlanan süspansiyondaki hücreler Percoll gradient yöntemiyle saflaştırıldı (Böyük, 2017).

Percoll Gradient Yöntemi ile Hücrelerin Saflaştırılması

Kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları:

Öncelikle 25 ml lik erlenmayere 12 ml Percoll (Sigma Aldrich, P4937, pH 8,5-9,5) konularak sterilize edildi.

1,5 M ve 0,15 M' lik NaCl hazırlandı.

Stok izotonik Percoll solüsyonu (SIP): Bir kısım 1,5 M NaCl solüsyonuna 9 kısım Percoll eklendi

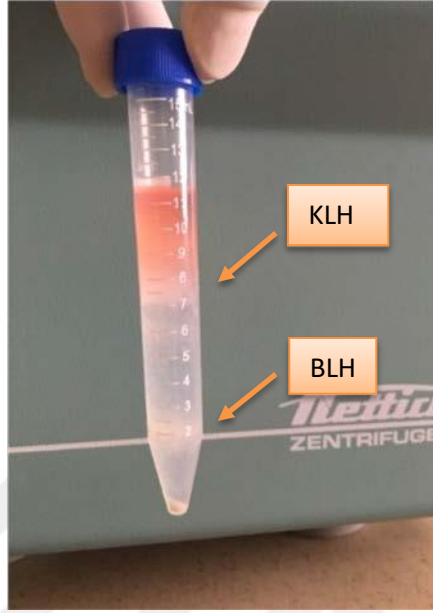
%20 lik Percoll solüsyonu : 1 ml SIP solüsyonuna 4 ml 0,15 M NaCl solüsyonu eklendi. (Dansite: 1.028)

%30 luk Percoll solüsyonu : 1,5 ml SIP solüsyonuna 3,5 ml 0,15 M NaCl solüsyonu eklendi. (Dansite: 1.040)

%40 lik Percoll solüsyonu : 2 ml SIP solüsyonuna 3 ml 0,15 M NaCl solüsyonu eklendi. (Dansite: 1.052)

Hazırlanan %20 lik, %30 luk ve %40 lık solüsyonlardan 5 er ml steril tüplere alınarak tüpler etiketlendi.

Bir tüp içerisine en alta %40, üzerine %30 luk ve onun üzerine de %20 lik Percoll solüsyonlarından üçer ml konularak daha önce hazırlanan hücre solüsyonundan 2 ml eklendi. Bu tüp 10 dakika süre ile +4 °C ve 400 G' de santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda büyük luteal hücrelerin %30-40 lık Percoll yoğunlukları sınırında küçük luteal hücrelerin ise %20-30 lik Percoll yoğunlukları arasında yoğunlaştıkları görüldü (Şekil 2.3). Buradan toplanan hücreler falkon tüpe aktarıldı.



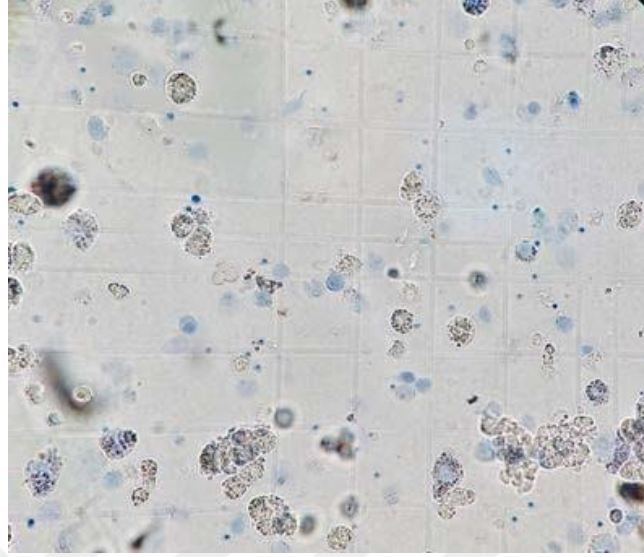
Şekil 2.3. Santrifüj sonucunda %30-40 lık Percoll yoğunlukları sınırında büyük luteal hücrelerin, %20-30 lik Percoll yoğunlukları arasında küçük luteal hücrelerin yoğunlaşması.

Bu işlemden sonra hücreler Thoma lamı yardımıyla mikroskop altında sayılarak tripan mavisi ile boyandı ve hücrelerin canlılığı kontrol edildi.

Hücrelerin Canlılık Oranlarının Belirlenmesi Amacıyla Tripan Mavisi ile Boyanması

Hücre süspansiyonununun 1 ml' sinden pipet ile 10 µl alınarak aynı miktarda tripan mavisi ile karıştırıldı. Bu solüsyon Thoma lamına damlatılarak boya almayan canlı hücrelerin sayılmasıyla canlı hücre sayısı belirlendi (Tennant, 1964) (Şekil 2.4).

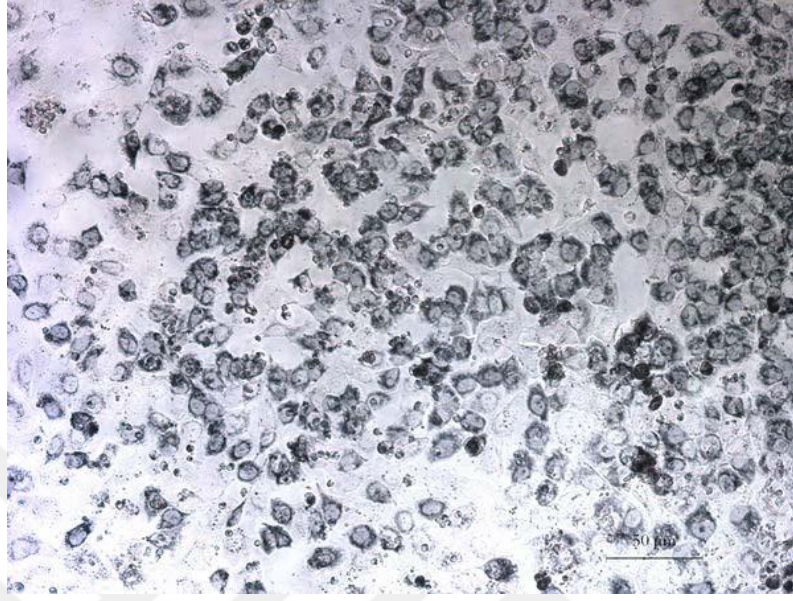
Böylece daha sonra flasklarda üretilecek olan luteal hücre sayısı belirlenmiş oldu.



Şekil 2.4. Tripan mavisi ile canlı hücrelerin Thoma lamında sayılması.

Luteal Hücrelerin 3 β -HSD ile Boyanması

Hücrelerin bir kısmı endoplazmik retikulumda pregnanolonun progesterona dönüşümüne aracılık eden 3 β -HSD enzim aktivitesini göstermek amacıyla boyandı (Şekil 2.5) . Bu enzim aktivitesinin pozitif olması steroidojenik aktivitenin bir göstergesidir (Arıkan ve Yiğit 2002).



Şekil 2.5. 3β-HSD pozitif luteal hücreler (X200)

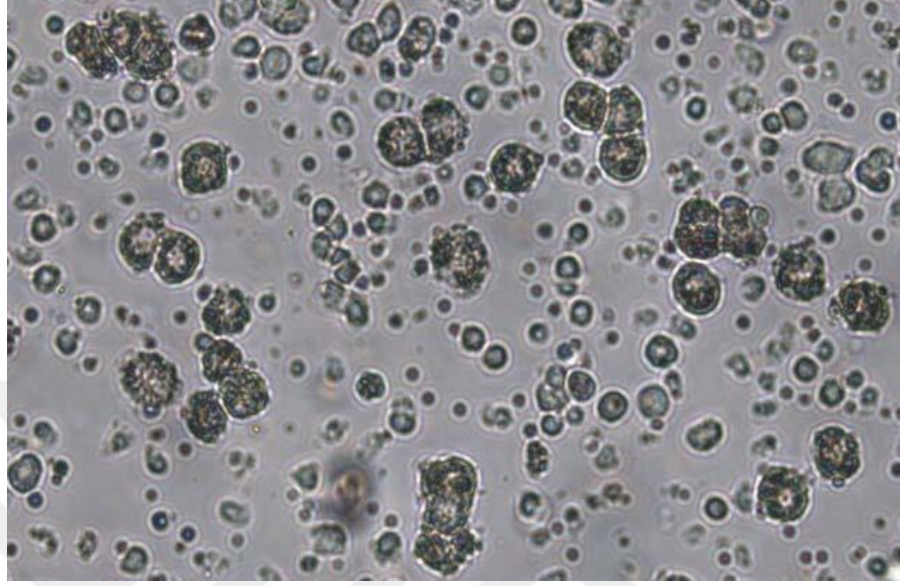
Luteal Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Mezenkimal Kök Hücre Besi Yeri

2 mM glutamax suppl (Gibco, 35050061), % 0,5 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin, % 10 FBS (Thermo Fischer Sci, 10270106) içeren low glukoz DMEM (Gibco, 11880-028).

Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Elde edilen luteal hücreler her birinde 10^5 hücre olacak şekilde T25 kültür kabına MKH besi yeri içerisinde ekildi ve %5 CO₂ içeren 37 °C lik inkubatore yerleştirildi (Şekil 2.6). Besi yeri 72 saatte bir değiştirildi. Hücrelerin gelişimi Leica invert mikroskobu (Leica, Almanya) ile takip edildi. Hücreler konfluense ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. İkinci pasajın sonuna gelen hücrelerin bir kısmı ile flow sitometride tanımlama işlemi yapılırken, bir kısmı da başkalaşım medyumlarında inkübe edilmek üzere ayrıldı.



Şekil 2.6. Ekimi yapılan luteal hücreler (0. Saat)

Flow-Sitometri ile Mezenkimal Kök Hücre Tanımlanması

İkinci pasajın sonunda ayrılan hücrelere CD45R, CD11b/c, CD90 ve CD49 markırları için aşağıdaki şekilde tanımlama işlemi uygulandı.

Kontrol ve numune olarak hazırlanan ve içerisinde 150.000 hücre içeren 2 tüp 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler 500 μ l % 0,25'lik tripsin EDTA ile 15 dakika çalkalamalı su banyosunda tek hücre haline getirildi. İnkübasyon sırasında 2-3 kere pastör pipeti ile pipetaj yapıldı. Hücreler 2 kere hücre kültür medyumu ile yıkandıktan sonra flow sitometri tüpü içerisinde 100 μ l olacak şekilde PBS ile resuspanse edildi. Hücre süspansiyonuna 10'ar μ l CD45R (BD, 554879) CD11b/c (BD, 550299), CD90 (Thermo Fischer Sci, MA1-80651), CD 49 primer antikorları (BD, Katalog no 553348) ilave edildi. Oda ısısında yarım saat inkübe edildi. Hücreler soğuk PBS ile 3 kere yıkandı. Üzerine 4'er μ l sekonder antikor eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildiler. Tekrar %3 BSA lı soğuk PBS ile 1 kere yıkanarak üzerlerine 300 μ l kadar sıvı

eklenen hücreler flow sitometri cihazı tüplerine aktarıldı. Tüplerde yıkanarak son yıkamada 600 µl kadar PBS kalacak şekilde ölçüme götürüldü.

Flow sitometrik değerlendirmeler FACS-ARIAIII (BD, USA) ile yapıldı.

Hücre Farklılaşmasının Tespit Edilmesi

Bir kısmı flow sitometride kullanılan kök hücreler her birinde 10^5 hücre olacak şekilde mezenkimal kök hücre besi yeri kullanılarak T25 flasklara ekim yapıldı. Medyum her 72 saatte bir değiştirildi. Üçüncü kez besi yeri değiştirilmesi esnasında yapılan mikroskop muayenesinde yeterli konfluense ulaştığı görülen hücreler 5 ml PBS ile nazikçe yıkandı. PBS boşaltılarak hücreleri içeren flaska % 0,25' lik Tripsin' den 1 ml eklendi ve inkübatörde 5 dakika bekletildi. Sürenin sonunda hücrelerin ayrışıp ayrışmadığı mikroskopta kontrol edildi. Ayrışan hücreler toplandı, 100 G' de 10 dakika santrifüj yapıldı. Tüp tabanında biriken pellet 1 ml' ye tamamlanarak yapılan sayımda hücre sayısı 2×10^5 olarak bulundu.

Osteogenezis için 4×10^4 , adipogenezis için 2×10^4 hücre olacak şekilde üç tekrarlı olarak 12 li welle ekim yapıldı.

Yağ dokuya farklılaşma için Stem Pro Adipogenesis farklılaşma kiti (Gibco, A-10070-01) ve kemik dokuya farklılaşma için Stem Pro Osteogenesis farklılaşma kiti (Gibco, A-10072-01) kullanıldı. Diferensiyasyon medyumunu olarak 90 ml bazal medyum, 10' ar ml adiposit ve osteosit supplementleri ve 50 µl gentamisin karışımı kullanıldı ve medyum 72 saatte bir değiştirildi.

Oil Red O ile Adiposit Farklılaşmasının Tespit Edilmesi

Farklılaşma medyumunda 21 gün inkübe olan hücrelerden kültür medyumunu uzaklaştırılarak DPBS ile yıkandı.

Hücreler 30 dakika süre ile %4' lük formaldehit solüsyonunda tutularak tespit edildi ve DPBS ile 2 kez yıkandı. 15 mg oil red O (Sigma, MAK194) %99 izopropanol ile 5 ml ye tamamlanarak stok boya hazırlandı ve bundan 3 birim alınarak 2 birim distile su ile karıştırılarak 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek süzöldü. Taze hazırlanmış olan oil red O boyası pleytlere koyularak 30 dakika süre ile inkübe edildi. Boyama sonunda hücreler distile su ile yıkanarak ışık mikroskop altında incelendi. Oluşan yağ damlacıkları invert mikroskop ile görüntölendi ve yağ dokuya farklılaşma belirlenerek kayıt altına alındı.

Alizarin Red S ile Osteosit Farklılaşmasının Tespiti

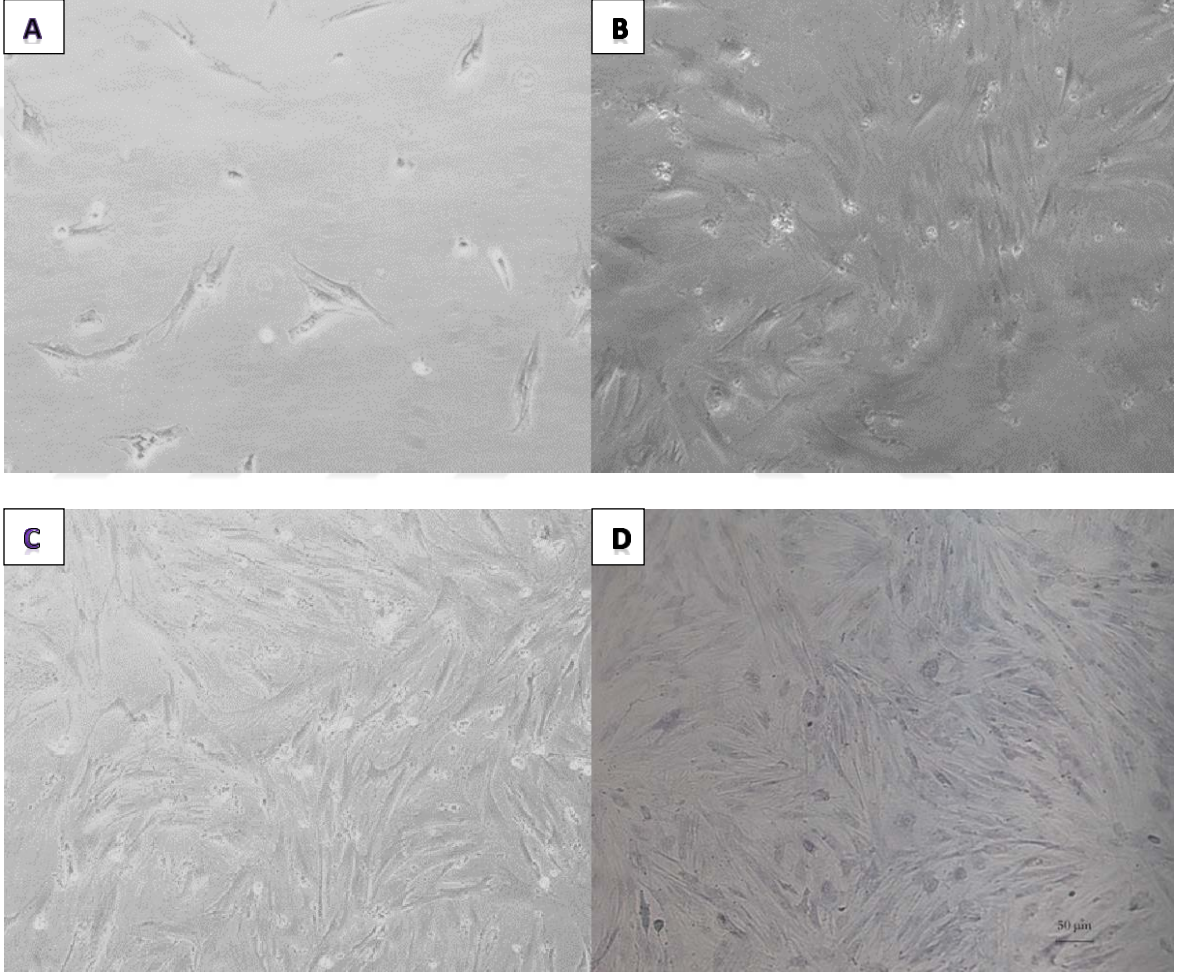
Farklılaşma medyumunda 21 gün inkübe olan hücrelerden kültür medyumunu uzaklaştırılarak DPBS ile yıkandı.

Hücreler 30 dakika süre ile %4' lük formaldehit solüsyonunda tutularak tespit edildi ve iki kez distile su ile yıkandı.

Distile su ile hazırlanmış %2' lik Alizarin Red S çözeltisi (pH 4,2) ile 5 dakika boyandı. Boyanma işleminden sonra 3 kez distile su ile yıkanan hücreler ışık mikroskop altında incelenerek fotoğrafları alındı.

3. BULGULAR

İzole Edilmiş Olan Luteal Hücrelerin Mezenkimal Kök Hücre Medyumunda Kültürü

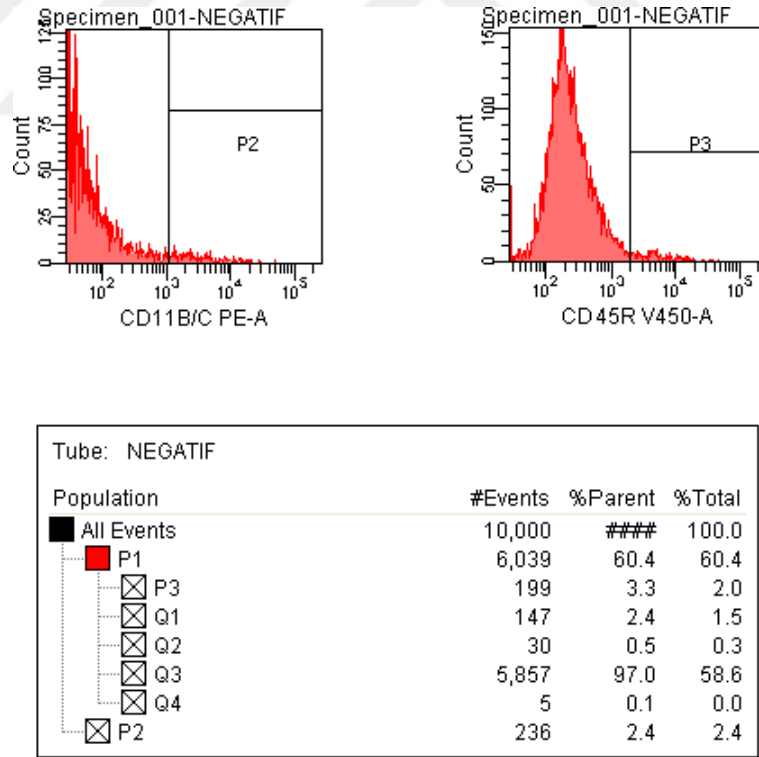


Şekil 3.1. Mezenkimal kök hücre medyumunda inkübe edilen luteal hücreler A: 0. Saat, B: 6. gün, C: 9. gün, D: 27. Gün, 2×10^5 hücre, (X100)

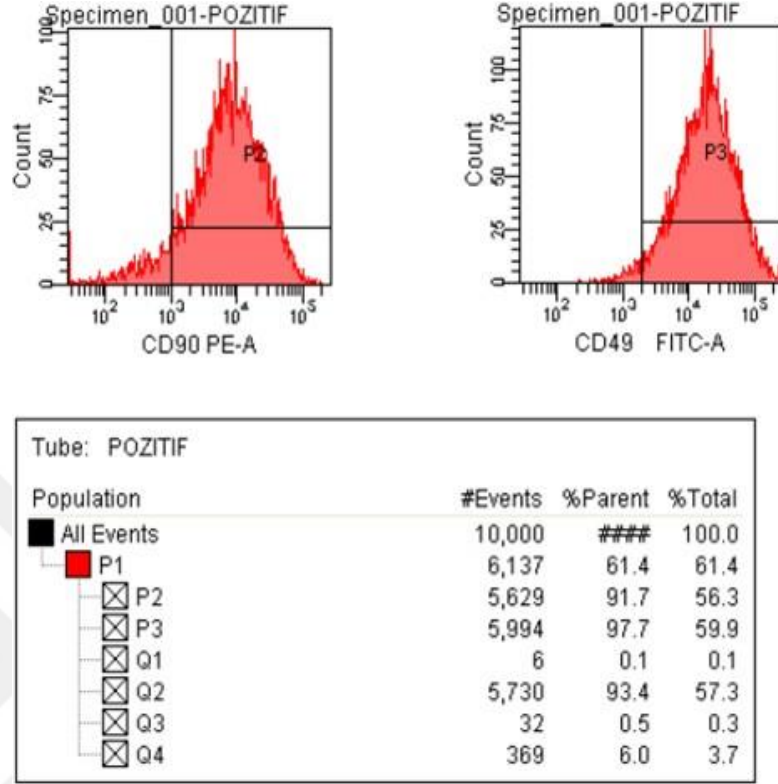
Mezenkimal kök hücre besi yerinde üreyen luteal hücrelerin yüzeye tutundukları, proliferere oldukları hücrelerin fibroblast morfolojisine sahip oldukları belirlendi (Şekil 3.1).

Luteal Hücrelerden Elde Edilen Kök Hücrelerin Flow Sitometri ile Yüzey Markırlarının Belirlenmesi (Luteal Hücrelerin Karakterizasyonu)

Ovaryumdan elde edilen luteal hücrelerin ikinci kez pasajlanmasından sonra CD11b ve CD45 yüzey markırlarının taşımadıkları, bunun yanında taşımaları beklenen CD90 ve CD49 yüzey markırlarının taşıdığı flow sitometri cihazı ölçüm sonuçlarında grafik ve tablo olarak gözlendi (Şekil 3.2, 3.3).



Şekil 3.2. CD11b ve CD45R yüzey markırlarının negatif olduğunu gösteren flow sitometri sonuçları



Şekil 3.3. CD90 ve CD49 yüzey markırlarının pozitif olduğunu gösteren flow sitometri sonuçları

Luteal hücrelerden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre hatlarına dönüşmesi (diferensiyasyonu)

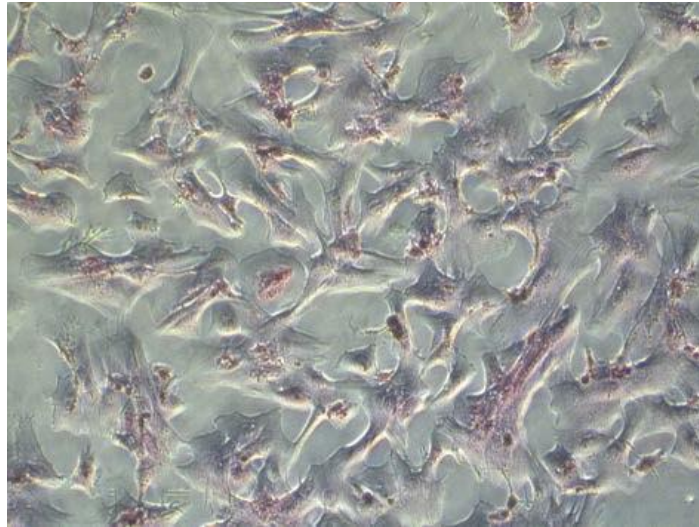
Elde edilen mezenkimal kök hücrelerin köken aldığı hücreden farklı hücre hatlarına farklılaşabildiğinin gösterilmesi için adiposit ve osteosit başkalaşım medyumlarında 72 saatte bir medyum değişimi yapılarak 21. güne kadar kültüre edildi.

Adipojenik hücre farklılaşma medyumunda, her 72 saatte bir medyum değiştirilerek 21 gün süre ile tutulan hücrelerin farklılaşmaları mikroskopta görüldü. Bu süre sonunda hücreler oil red O ile oda sıcaklığında 30 dakika boyandı. Boyanan kültüre edilmiş hücrelerin sitoplazmalarında olgun adiposit hücrelerinin karakteristik özelliği olan çok sayıda yağ dolu tanecikler gözlemlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Oil Red-O ile boyanmış adipositler, (X400)

Osteojenik farklılaşmanın histolojik olarak gösterilmesi amacıyla osteojenik farklılaşma medyumunda 21 gün süre ile her 72 saatte bir medyum değiştirilerek inkübe edilen hücreler bu süre sonunda Alizarin red ile boyandı. Boyama sonucu ekstrasellüler matrikste koyu renkli bölgeler halinde kalsifikasyon gözlemlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Alizarin Red ile boyanmış Osteositler, (X100)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın temel amacı mezenkimal kök hücre elde etmek için yeni bir kaynağın daha varlığını göstermekti. Bu amaçla rat korpus luteumundan izole edilen luteal hücreler kullanıldı ve *in vitro* yöntemlerle luteal hücrelerden kök hücre elde edilmesi yanında elde edilen kök hücrelerin morfolojik, immunfenotipik özellikleri ile büyüme-çoğalma, farklılaşma özellikleri de incelendi. Granulosa hücrelerinin kök hücreye dönüşebildiğini gösteren (Lange-Consiglio ve ark, 2016); genç ve erişkin fare ovaryumlarında embriyonik kök hücrelerin varlığını gösteren (Esmailian, 2010); yeni doğan, pubertal, ergin ve yaşlı dönem folikül oositlerinde, sekonder ve tersiyer foliküllerin granuloza hücrelerinde kök hücrelerin bulunduğunu immunohistokimyasal ve RT-PCR çalışmalarla destekleyen (Gök, 2011); ovaryum dokusunun explant yöntemiyle küçük parçalara ayırarak doğrudan kültür flaskına ekimi ile kök hücre varlığını bildiren (Beşikçioğlu, 2015) çalışmalar bulunsa da izole edilen luteal hücrelerin primer hücre kültürü ile *in vitro* olarak kök hücreye dönüşebileceği daha önce araştırılmamış bir konudur. Araştırma sonuçlarının kısırlık, polikistik over sendromu ve kanser gibi ovaryum kaynaklı hastalıkların tedavisinde ve oldukça önemli bir yere sahip olacağı düşünülmektedir.

Araştırmada rat korpus luteumundan elde edilen luteal hücreler L glutamin ve sodyum bikarbonat içeren DMEM/F12 medyumunda inkübe edilerek sayıca çoğalmaları sağlandı. (O'Shaughnessy ve Wathes, 1985). Üretmelerinde özellikli bir medyum kullanmaya ihtiyaç duyulmaması nedeniyle *in vitro* koşullarda fibroblast benzeri üreme gösteren luteal hücrelerin izolasyonunun diğer mezenkimal kök hücre izolasyonları gibi kolay olduğu söylenebilir. Mezenkimal kök hücrelerin kolay izolasyonu yanında *in vitro* ortam da oldukça yüksek oranda üreyebilme; osteoblast, kondrosit, adiposit, kardiyosit, nöral hücre ve hemapoetik destekli stroma hücrelerine farklılaşabilmesi ve hasara uğramış dokuyu tamir edebilme özelliklerinin de bulunması (Dawn ve Bolli, 2005) onların kök hücre tedavisinde kullanılmasını cazip bir araç kılar. Pratikte luteal hücre elde edilmesi için korpus luteumun kullanımının kolay olmaması bir problem gibi

görülmektedir. Ancak ovaryumun kendi dokusundan izole edilen kök hücrenin ovaryumun fonksiyonel problemlerinde tedavi edici olarak kullanılabilmesi için denenmesi gereken bir alternatif yöntem olarak düşünülmektedir. Ayrıca isteğe bağlı nedenlerle vücuttan alınan ovaryumlardan elde edilen luteal hücrelerin de kök hücre kaynağı olarak kullanılabilmesi ve bunların allojenik nakillerde ve tedavilerde kullanılabilmesi de varsayımlarımız arasındadır.

Elde edilen hücrelerin immun fenotipik karakterizasyonu için hemapoetik yüzey markırları olan CD11b ve CD45 varlığının elde edilen hücrelerin yüzeylerinde bulunmadığı tespit edilmiş dolayısıyla elde edilen hücrelerin hemapoetik kök hücreler olmadığını göstermektedir.

Bu çalışmada erişkin ratların korpus luteumundan elde edilen hücrelerin

1. Plastik yüzeylere tutunma özelliklerinin bulunduğu,
2. Uzun süre bölünerek kendini yenileme özelliklerine sahip oldukları,
3. Adiposit ve osteositlere farklılaşma özellikleri olduğu,
4. Mezenkimal kök hücre yüzey markırlarından CD49 ve CD90 yüzey

antijenlerini eksprese ettikleri,

5. Hemapoetik kök hücre yüzey markırlarından olan CD45 ve CD11b antijenini taşımadıkları için hemapoetik kökenli olmadıkları belirlendi.

Diferensiyasyon çalışmaları da flow sonuçlarını desteklemektedir.

Elde edilen hücreler mezenkimal kök hücre olarak tanımlanabilmek için gerekli olduğu belirtilen (Dominici ve ark, 2006) plastik yüzeylere tutunma, özel yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyeline sahip olma ölçütlerinin her üçünü de sağlamaktadır. Bu yüzden bu hücreleri erişkin multipotent mezenkimal (stromal) kök hücre olarak adlandırılması gerektiğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla korpus luteumun, multipotent özellikteki yetişkin mezenkimal kök hücreleri içerdiği belirtilen beyin, dalak, böbrek, böbrek glomerülü, akciğer, kemik iliği, kas, timus ve pankreasa (Da SilvaMeirelles ve ark, 2006) ek olarak yeni bir kaynak olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir.

Luteal hücrelerin multipotent erişkin mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılıp kullanılmayacağı gelecekte yapılacak *in vivo* çalışmalara bağlı olarak netlik kazanacaktır.



KAYNAKLAR

ABD-ALLAH SH, SHALABY, SM. PASHA HF, AMAL S, RAAFAT N, SHABRAWY SM, AWAD HA, AMER MG, GHARİB MA, GENDY EA, RASLAN AA, EL-KELAWY HM (2013) Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy*, 15 (1): 64-75.

AKGÜN I (2016) Mezenkimal kök hücre. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 1(1): 29-32 doi: 10.5606/fng.transplantasyon.2016.005

ALVAREZ-DOLADO M, PARDAL R, GARCIA-VERDUGO JM, FIKE JR, LEE HO, PFERRER K, LOIS C, MORRISON SJ & BUYLLA AA (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425 (6961): 968.

ARIKAN Ş & YİĞİT AA (2002) Size distribution of steroidogenic and non-steroidogenic ovine luteal cells throughout pregnancy. *Animal Science*, 75 (3): 427-432.

AVECILLA ST, HATTORI K, HEISSIG B, TEJADA R, LIAO F, SHIDO, K, JIN DK, DIAS S, ZHANG F, HARTMAN TE, HACKETT NR, CRYSTAL RG, WITTE L, HICKLIN DJ, BOHLEN P, EATON D, LYDEN D, de SAUVAGE F, RAFII, S. (2003) Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine*, 10 (1): 64-71. doi:10.1038/nm973.

BAER PC & GEIGER H (2012) Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells International*.

BASSI ÊJ, AITA CAM & CÂMARA NOS (2011) Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: where do we stand? World journal of stem cells, 3(1): 1.

BEŞİKÇİOĞLU HE (2015) Cyclophosphamide İle İndüklenmiş Ovaryum Hasarında Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Ve Ovarian Stromal Kök Hücrelerin Follikül Maturasyonundaki Etkilerinin Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi, Ankara.

BONGSO A & LEE EH (2005) Stem cells: Their definition, classification and sources. In A. Bongso & E. H. Lee (Eds.), Stem Cells: from bench to bedside 1 (pp. 1-13). London: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

BOYUK G (2017) Adacık hücreleri ile kokültüre edilen luteal hücrelerin, hücre canlılığı, revaskülarizasyon ve immun yanıtta etkileri. Doktora tezi. Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

CAPLAN A (2008) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. Journal of Pathology, 217: 318–324.

CAN A (2014) Kök Hücre, Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akademisyen Kitabevi, s. 327-426.

COWAN CA, ATIENZA J, MELTON DA & EGGAN K (2005) Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science, 309 (5739): 1369-1373.

DA SILVA MEIRELLES L, CHAGASTELLES DC & NARDI NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119: 2204-2213. doi:10.1242/jcs.02932

DAVIS NE, HAMILTON D & FONTAINE MJ (2012) Harnessing the immunomodulatory and tissue repair properties of mesenchymal stem cells to restore β cell function. *Current diabetes reports*, 12 (5): 612-622.

DAWN B & BOLLI R (2005) Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic research in cardiology*, 100 (6): 494-503.

DIAZ FJ, ANDERSON LE, WU YL, RABOT A, TSAI SJ & WILTBANK MC (2002) Regulation of progesterone and prostaglandin F 2α production in the CL. *Molecular and cellular endocrinology*, 191 (1): 65-80.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANS RJ, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4): 315-317. doi:10.1080/14653240600855905

DUNPHY CH (2004) Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch Pathol Lab Med*, 128 (9): 1004-1022.

ESMAEİLİAN Y (2010) Fare ovariyumu kök hücrelerinin real time PCR ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması. (Yüksek Lisans), Ankara Üniversitesi, Ankara. (275463)

GÖK D (2011) Ovaryum dokusunda kök hücre varlığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

HANSEL W & BLAIR RM (1996) Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, 45 (7): 1267-1294.

HILD-PETITO SA, SHIIGI SM & STOUFFER RL (1989) Isolation and Characterization of Cell Subpopulations from the Monkey Corpus Luteum of the Menstrual Cycle. *Biology of Reproduction*, 40: 1075-1085.

HORWITZ EM, PROCKOP DJ, GORDON PL, KOO WW, FITZPATRICK LA, NEEL MD, Mc CARVILLE ME, ORCHARD PJ, PYERITZ RE, BRENNER MK (2001) Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*, 97 (5): 1227-1231.

HORWITZ EM, Le BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, DEANS RJ, KRAUSE RS & KEATING A (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7 (5): 393-395.

INUKAI T, KATAGIRI W, YOSHIMI R, OSUGI M, KAWAI T, HIBI H & UEDA M (2013) Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration. *Biochemical and biophysical research communications*, 430 (2): 763-768.

JOHNSON J, BAGLEY J, SKAZNIK-WIKIEL M, LEE HJ, ADAMS GB, NIIKURA Y, TSCHUDY KS, TILLY JC, CORTES ML, FORKERT R, SPITZER T, IACOMINI J, SCADDEN DT, TILLY LJ (2005) Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 122 (2): 303-315.

JOHNSON J, CANNING J, KANEDO T, PRUAMES KJ & TILLY JL (2004) Germline Stem Cells and Follicular Renewal in the Postnatal mammalian Ovary. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 59 (7): 518-520.

JONES BA & PEI M (2012) Synovium-derived stem cells: a tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18 (4): 301-311.

KARAÖZ E ve OVALI E (2004) Kök hücreler: Celepler Matbaacılık. Trabzon.

KOCKEN JM, RINKES IHB, BIJMA AM, DE ROOS WK, BOUWMAN E, TERPSTRA OT & SINAASAPPEL M (1996) Correction Of An Inborn Error Of Metabolism By Intraportal Hepatocyte Transplantation In A Dog Modell. *Transplantation*, 62 (3): 358-364.

KROON E, MARTINSON LA, KADOYA K, BANG AG, KELLY OG, ELIAZER S, YOUNG H, RICHARDSON M, SMART NG, CUNNINGHAM J, AGULNICK AD, D'AMOUR DA, CARPENTER MK, BAETGE EE (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature biotechnology*, 26 (4): 443-452.

LAKSHMIPATHY U & VERFAILLIE C (2005) Stem cell plasticity. *Blood reviews*, 19 (1): 29-38.

LANGE-CONSIGLIO A, ROMALDINI A, CORREANI A, CORRADETTI B, ESPOSTI P, CANNATA MF, CLAUDIA P, GIOVANNA MM, DAVIDE B, CREMONESI F (2016) Does the Bovine Pre-Ovulatory Follicle Harbor Progenitor Stem Cells? *Cellular Reprogramming*, 18 (2): 116-126.

LI J, EZZELARAB MB & COOPER DK (2012) Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 19 (5): 273-285.

LIANG J, ZHANG H, HUA B, WANG H, LU L, SHI S, HOU Y, ZENG X, GILKESON GS, SUN L (2010) Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis*, 69: 1423–1429.

LIU, Y, WU, C, LYU, Q, YANG, D, ALBERTINI DF, KEEFE DL & LIU L (2007) Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Developmental biology*, 306 (1): 112-120.

LOEFFLER M & ROEDER I (2002) Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self-Organization and Models – A Conceptual Approach. *Cells Tissues Organs*, 171: 8–26.

MEIDAN R, MILVAE RA, WEISS S, LEVY N & FRIEDMAN A (1999) Intraovarian regulation of luteolysis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 54: 217-228.

MILVAE RA, HINCKLEY ST & CARLSON JC (1996) Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45 (7): 1327-1349.

MINGUELL JJ, ERICES A & CONGET P (2001) Mesenchymal stem cells. *Experimental biology and medicine*, 226 (6): 507-520.

MONDAL S, NANDI S & REDDY IJ (2013) Isolation and characterization of luteal cells in Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Indian J Physiol Pharmacol*, 57 (1): 1–8.

NAKAHARA H, DENNIS JE, BRUDER SP, HAYNESWORTH SE, LENNON DP & CAPLAN AI. (1991) In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Experimental cell research*, 195 (2): 492-503.

NELSON S, McLEAN M, JAYATILAK P & GIBORI G (1992) Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology*, 130 (2): 954-966.

NISWENDER GD, JUENGEL JL, SILVA PJ, ROLLYSON MK & McINTUSH EW (2000) Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological reviews*, 80 (1): 1-29.

O'SHAUGHNESSY PJ & WATHES DC (1985) Characteristics of bovine luteal cells in culture: morphology, proliferation and progesterone secretion in different media and effects of LH, dibutyryl cyclic AMP, antioxidants and insulin. *Journal of Endocrinology*, 104: 355-361.

ÖZMEN S, FINDIKÇIOĞLU F, SIEMIONOW M (2006) Kök Hücreler. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi*, 3 (14): 187-96.

PACCHIAROTTI J, MAKI C, RAMOS T, MARH J, HOWERTON K, WONG J, PHAM J, ANORVE S, CHOW YC, IZADYAR F (2010) Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation*, 79 (3): 159-170.

PEI M, HE F & VUNJAK-NOVAKOVIC G (2008) Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Differentiation* 76 (10): 1044-1056.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284 (5411): 143-147.

RA JC, KANG SK, SHIN IS, PARK HG, JOO SA, KIM JG, KANG BC, LEE YS, NAKAMA K, PIAO M, SOHL B, KURTZ A (2011) Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Journal of translational medicine* 9 (1): 181.

REN G, CHEN X, DONG F, LI W, REN X, ZHANG Y & Shi, Y. (2012) Concise Review: Mesenchymal Stem Cells and Translational Medicine: Emerging Issues. *Stem cells translational medicine* 1(1): 51-58.

REYES M & VERFAILLIE CM (2001) Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 938(1): 231-235.

RICHARDSON LE, DUDHIA J, CLEGG PD & SMITH R (2007) Stem cells in veterinary medicine—attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in biotechnology* 25(9): 409-416.

SHI Y, HU G, SU J, LI W, CHEN Q, SHOU P, XU C, CHEN X, HUANG Y, ZHU Z, HUANG X, HAN X, XIE N, REN G (2010) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair *Cell Research* 20: 50-518.

SMALDONE MC & CHANCELLOR MB (2008) Muscle derived stem cell therapy for stress urinary incontinence *World journal of urology* 26 (4): 327-332.

SMITH R, KORDA M, BLUNN G GOODSHIP A (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine veterinary journal* 35 (1): 99-102.

ŞAHİN F, SAYDAM G, OMA Y SB (2005) Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi 15: 48-56.

TAKAHASHI K, YAMANAKA S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126: 663–76.

TAKEHARA Y, YABUUCHI A, EZOE K, KURODA T, YAMADERA R, SANO C, MURATA N, AIDA T, NAKAMA K, AONO F, AOYAMA N, KATO K & KATO O (2013) The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. Laboratory Investigation 93(2): 181-193.

TENNANT JR (1964) Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability Transplantation 2 (6): 685-694.

TSUMANUMA Y, IWATA T, WASHIO K, YOSHIDA T, YAMADA A, TAKAGI R, OHNO T, LIN K, YAMATO M, ISHIKAWA İ OKANO T & IZUMI Y (2011) Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. Biomaterials 32 (25): 5819-5825.

UCCELLI A, PISTOIA V & MORETTA L (2007) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? Trends Immunol 28 (5): 219-226. doi:10.1016/j.it.2007.03.001

UÇKAN DÇ (2007). Mezenkimal Kök Hücreler: Nerede? Ne Zaman? Kök Hücre Biyolojisi ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar. 4. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Bursa.Türk Hematoloji Derneği.

ULLOA-MONTOYA F, VERFAILLIE CM & HU WS (2005) Culture Systems for Pluripotent Stem Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (1): 12–27. doi:10.1263/jbb.100.12

VIEIRA NM, VALADARES M, ZUCCONI E, SECCO M, JUNIOR CB, BRANDALISE V, ASSONI A, GOMES J, LANDINI V, ANDRADE T, CAETANO HVA, VAINZOF M & ZATZ M (2012) Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell transplantation*, 21(7): 1407-1417.

WANG H, JIANG M, BI H, CHEN X, HE L, LI X & WU J (2014) Conversion of female germline stem cells from neonatal and prepubertal mice into pluripotent stem cells. *Journal of molecular cell biology* 6 (2): 164-171.

WU C, XU B, LI X, MA W, ZHANG P, CHEN X & WU J (2017) Tracing and Characterizing the Development of Transplanted Female Germline Stem Cells In Vivo *Molecular Therapy* 25 (6): 1408-1419.