

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN K562 (KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE
HATTI) HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Belma AKPINAR YILMAZ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Yüksek Lisans Programı için Öngördüğü
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Ana Bilim Dalı
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ
2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN K562 (KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE
HATTI) HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Belma AKPINAR YILMAZ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Yüksek Lisans Programı için Öngördüğü
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Ana Bilim Dalı
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR

KOCAELİ
2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin
K562 (Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattı) Hücreleri Üzerine
Stotoksik ve Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması

Tez yazarı: Belma Akpınar Yılmaz

Tez savunma tarihi: 27.10.2014

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Gülcin Gacar

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalı
Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Üye	Prof. Dr. Abdullah Hüseyin Kaşıkçıoğlu
Üye	Yrd. Doç. Dr. Gülcin Gacar
Üye	Yrd. Doç. Dr. Gökhan Durukan

ONAY

Fakatırdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Tuncay Çolak
Enstitü Müdürü



ÖZET

Son zamanlarda, kanser ve kök hücre ilişkisine yeni boyutlar kazandıran çalışmalar yayımlanmaya başlamıştır. Biz de çalışmamızda, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH'lerin) *in-vitro* koşullarda K562 (insan kronik myeloid lösemi) hücre dizisi üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkilerini çeşitli deneysel araçlarla göstermeyi amaçladık.

Apoptotik sinyal yollarını etkinleştirmek için Kİ-MKH 'ler IL-2(50 ng/mL) ile 24 saat boyunca 37°C'de önceden uyarıldı. K562 hücre dizisi, uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'ler ile direkt ve indirekt ortak kültür sistemine 1:1 oranında 72 saat süreyle 37°C'de nemli ortamda (%5 CO₂+%95 hava) kültüre edildi. Kanser hattının canlılık/çoğalım kapasitesi WST-1 ve CFSE yöntemleri kullanılarak ölçüldü. Apoptoz düzeyleri Annexin-V/PI boyaması takiben akım sitometri cihazıyla belirlendi.

IL-2 uyarımının Kİ-MKH'ler üzerinde morfolojik olarak herhangi bir etki yaratmadığı gözlemlendi. Uyarılma sonrasında indirekt ko-kültürde K562 hücre dizisinde çoğalım baskılanırken direkt ko-kültürde etkinin daha belirgin olduğu ölçülmüştür. Benzer bir ilişki uyarılmamış direkt kültürde gözlemlense de IL-2 uyarılması hücrenin anti-proliferatif etkisini önemli ölçüde artırmıştır. WST-1 testine ek olarak, CFSE boyaması ile de ölçülen proliferasyon yüzdesi sonuçları direkt ko-kültürün indirekt ko-kültüre oranla daha fazla anti-proliferatif etki gösterdiğini ayrıca IL-2 uyarımının bu etkiyi arttırdığı belirlenmiştir. Kİ-MKH'lerin sitotoksik etkilerine baktığımızda; IL-2 uyarımının direkt ve indirekt ko-kültür sistemlerinde değişiklik yaratmadığını ancak direkt ko-kültürün indirekt ko-kültüre kıyasla daha sitotoksik etki gösterdiğini tespit ettik.

Sonuç olarak yaptığımız çalışma ile kök hücrenin IL-2 uyarılması yönteminin kansere yönelik hücre temelli yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde farklı bakış açıları geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: mezenkimal kök hücreler, kanser, ko-kültür, sitotoksikite, IL-2

ABSTRACT

In the recent times, studies began to give a new dimension to the relationship between cancer and stem cell. In our study, we aimed to show the cytotoxic and anti-proliferative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) on K562 (human chronic myeloid leukemia) cell line.

To activate the apoptotic signaling pathways, BM-MSCs were stimulated with IL-2 (50 ng/mL) at 37°C for 24h. K562 cell lines were directly and indirectly co-cultured with stimulated and non-stimulated BM-MSCs at the ratio of 1:1 at 37°C for 72h in humidified condition (5% CO₂+95% air). The viability/proliferation capacities of cancer cells were estimated by WST-1 and CFSE methods. Their apoptotic levels were determined by flow cytometer, followed by AnnexinV-PI staining.

It was observed that the IL-2 stimulation caused no substantial morphologic effects on BM-MSCs. Although the suppression in proliferation of K562 was observed in in-direct co-culture with stimulated BM-MSCs, the effect was measured significantly higher in direct co-culture. While the similar correlation was also observed in direct co-cultures of K562 with non-stimulated BM-MSCs, the anti-proliferative effect of stem cells was remarkably increased after stimulation with IL-2. According to the proliferation percentage results measured also by the CFSE staining in addition to WST-1 assay, direct co-culture has been demonstrated to display higher antiproliferative activity compared to indirect co-culture and IL-2 stimulation has been shown to enhance this activity. Upon investigation of the cytotoxic effects of BM-MSCs, we detected that IL-2 stimulation did not make any difference in direct and indirect co-culture systems, but direct co-culture had higher cytotoxic effects than indirect co-culture.

In conclusion, we consider that our study based on IL-2 stimulation of stem cells will help to develop different view points in the development of novel cell-based treatment approaches against cancer.

Keywords: mesenchymal stem cells, cancer, co-culture, cytotoxicity, IL-2

TEŞEKKÜR

Bu tez ile yüksek lisans eğitimimin sonuna gelmiş bulunmaktayım. Bu süreçte ders ve tez aşamalarım boyunca engin bilgi birikimi ve yol göstericiliği ile her zaman yoluma ışık tutmuş olan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok değerli bilim insanı sayın hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e, tez projemin oluşturulması ve yürütülmesinde, sabrı, ilgisi ve her türlü bilimsel desteğiyle yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bu süreci en verimli şekilde geçirmemi sağlayan değerli danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR'a sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince engin tecrübe ve bilgilerini benimle paylaşarak yaşadığım her sorunda deneyimi, güler yüzü ve anlayışıyla manevi desteğini benden esirgemeyen çok değerli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ayla Eker SARIBOYACI'ya, varlığıyla hayat yolunda ışığım olan sevgili hocam sayın Arş. Gör. Serhat KAYA'ya, akım sitometre çalışmalarında en yoğun anlarında bile emeğini bizden esirgemeyen Biyolog Gülay ERMAN'a, özgün şekil tasarımıyla bana yardımcı olan çok değerli grafiker arkadaşım sayın Nurcan ERARSLAN'a,

Hayatım boyunca elimden tutup, her adımında bana güvenip maddi manevi desteklerini ve sevgilerini her an kalbimde hissettiğim canım annem, babam ve bir tanecik kardeşime, hayat arkadaşım canım eşime ve mutluluğum biricik oğlum Ateş'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamı beni büyüten, bana yaşattığı tarifi olmayan sonsuz sevgisi ile çocukluğumun şefkat kaynağı olan rahmetli Anneanne'me adıyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	
IV	
ABSTRACT.....	
..V	
TEŞEKKÜR.....	
.VI	
İÇİNDEKİLER.....	
VII	
SİMGELER VE KISALTMALAR	
DİZİNİ.....IX	
ŞEKİLLER	
DİZİNİ.....X	
ÇİZELGELER	
DİZİNİ.....XII	
1. GİRİŞ VE	
AMAÇ.....1	
2. GENEL	
BİLGİLER.....3	
2.1. Kök Hücrelerin Genel	
Özellikleri.....3	
2.2. Kök hücre çalışmalarının	
tarihçesi.....5	
2.3. Kök Hücreler: Yeni Yüzyılın Tedavi	
Araçları.....6	
2.4. Mezenkimal Kök Hücreler'in Keşfi Ve Klinikte	
Kullanımları.....8	
2.5. Kök Hücre	
Çeşitleri.....10	
2.5.1. Embriyonik Kök	
Hücreler.....10	
2.5.2. Embriyonik Olmayan Kök	
Hücreler.....11	

2.5.2.1. Erişkin Kök	
Hücreler:.....	11
2.5.2.1.1. Hematopoetik kök	
hücreler.....	12
2.5.2.1.2. Stromal kök hücreler (Mezenkimal kök hücreler)	
.....	13
2.6. Kök Hücre ve Kanser Hücreleri Arasındaki	
İlişki.....	15
2.6.1. MKH'lerin Endojen	
Fonksiyonları.....	17
2.6.2. MKH'lerin Tümör Baskılama Ve Destekleme	
Mekanizmaları.....	17
2.6.2.1. Vasküler	
Destekleme.....	17
2.6.2.2. Fibrovasküler	
Ağ.....	18
2.6.2.3. MKH'lerin Tümörde İmmün-düzenleyici	
Etkileri.....	18
2.6.2.4. Metastaz.....	19
2.6.2.5. Parakrin Faktörlerin	
Salgılanması.....	19
2.6.2.6. Sitotoksik Tedavide Tümör Cevabının	
Modülasyonu.....	19
2.7.Kanser Kök	
Hücreleri.....	21
2.8.Kronik Miyeloid	
Lösemi.....	22
3. GEREÇ VE	
YÖNTEMLER.....	24
3.1. Kemik İliği Materyalinden MKH İzolasyonu, Kültürü Ve	
Karakterizasyonu.....	24
3.1.1. Kemik İliği Materyalinden MKH	
İzolasyonu.....	24

3.1.2. MKH Kültürü Ve Pasajlanması.....	25
3.1.3. MKH'lerin Akım Sitometri Cihazı İle Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi.....	25
3.1.4. MKH'lerin Farklılaştırılması.....	25
3.1.4.1. Adipojenik Farklılaşma.....	25
3.1.4.2. Osteojenik Farklılaşma.....	26
3.2. K562 (İnsan Kronik Miyeloid Lösemi Hücre Hattı) Kültürü Ve Ko-Kültür Deney Sistemlerinin Oluşturulması.....	26
3.2.1. K562 Hücre Kültürü.....	26
3.2.2. MKH'lerin IL-2 İle Uyarılması.....	26
3.2.3. Uyarılmış Kİ-MKH'lerin K562 Hücreleri İle Direkt Ve İndirekt Ko-Kültürü.....	27
3.2.4. Uyarılmamış Kİ-MKH'lerin K562 Hücreleri İle Direkt Ve İndirekt Ko-Kültürü.....	28
3.3. 72 Saat Ko-Kültür Sonrasında K562 Hücreleri İçin Canlılık Ve Çoğalım Testleri.....	28
3.3.1. WST-1 Testi.....	28
3.3.2. CFSE Testi.....	29
3.4. 72 Saat Sonrasında K562 Hücreleri İçin Sitotoksosite Analizi.....	29
3.5. Direkt Ko-Kültürlerin Zamana Bağlı Görüntülenmesi.....	30
4. BULGULAR.....	31

4.1. Kİ-MKH ve K562	
Kültürü.....	31
4.2. MKH'lerin Akım Sitometri Cihazı İle Yüzey Belirteçlerinin	
Belirlenmesi.....	32
4.3. Adipojenik	
Farklılaşma.....	33
4.4. Osteojenik	
Farklılaşma.....	34
4.5. MKH'lerin IL-2 ile	
Uyarılması.....	35
4.6. Kİ-MKH'lerin K562 Hücreleri ile Direkt Ve İndirekt Ko-	
Kültürü.....	35
4.7. 72 Saat Ko-Kültür Sonrasında K562 Hücreleri İçin Canlılık Ve Çoğalım	
Testleri.....	37
4.8. 72 Saat Sonrasında K562 Hücreleri İçin Apoptoz	
Analizi.....	40
5.	
TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇLAR VE	
ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	
DİZİNİ.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	
53	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

Açıklamalar

Kİ-MKH

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre

K562

İnsan kronik myeloid lösemi hücre hattı

IL-2

İnterlökin-2

MKH	Mezenkimal kök hücre
KML	Kronik myeloid lösemi
HKH	Hematopoetik kök hücre
EKH	Embriyonik kök hücre
VEGF	Vascular endothelial growth factor
IFN-gama	İnterferon-gama
KKH	Kanser kök hücresi
ARA-C	Sitozin arabinozid
FBS	Fetal sığır serumu
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
IBMX	İsobutil-metil-ksantin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kök hücre araştırmalarının hedefleri.....	11
Şekil 2. 2. Erişkin kök hücre farklılaşması.....	12
Şekil 2. 3. Mezenkimal kök hücre ve kanser arasındaki ilişki.....	20
Şekil 3. 1. Kİ-MKH'lerin izolasyon basamakları.....	24

Şekil 3. 2. 6-Kuyucuklu Plakalarda Direkt Ve İndirekt Ko-Kültür Deney Sistemi.....	28
Şekil 4. 1. Kİ-MKH'lerin morfolojik görünümleri.....	31
Şekil 4. 2. K562 solüsyon hücre kültürünün invert mikroskop görünümü.....	32
Şekil 4. 3. İnsan kemik iliği materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) akım sitometri cihazında saptanan immunofenotipik özellikleri.....	33
Şekil 4. 4. İnsan kemik iliği materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) adipoz farklılaşmalarının görüntülenmesi.....	34
Şekil 4. 5. İnsan kemik iliği materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) ostojenik farklılaşmalarının görüntülenmesi.....	34
Şekil 4. 6. İnsan kemik iliği materyalinden izole edilmiş MKH'lerin 72 saat IL-2 uyarılmalarının ardından morfolojik olarak incelenmeleri.....	35
Şekil 4. 7. Kİ-MKH'lerin 6-kuyucuklu plakalara ekimi.....	36
Şekil 4. 8. Direkt ko-kültür sisteminde Kİ-MKH ile K562 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.....	36
Şekil 4. 9. Kİ-MKH'lerin 6-kuyucuklu plakalara ekiminin ardından ara bölmelerin yerleştirilmesi.....	37
Şekil 4. 10. K562 hücrelerinin Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda WST-1 testi ile proliferasyon potansiyellerinin belirlenmesi.....	38

Şekil 4. 11. K562 hücrelerinin uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda WST-1 testi ile proliferasyon potansiyellerinin karşılaştırılması.....	38
Şekil 4. 12. K562 hücrelerinin Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda CFSE testi ile proliferasyon potansiyellerinin belirlenmesi.....	39
Şekil 4. 13. K562 hücrelerinin uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda CFSE testi ile proliferasyon potansiyellerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 4. 14. K562 hücrelerinin Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda Annexin-V/PI testi ile apoptoz yüzdelerinin belirlenmesi.....	41
Şekil 4. 15. K562 hücrelerinin uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda Annexin-V/PI testi ile apoptoz yüzdelerinin karşılaştırılması.....	41
Şekil 4. 16. Kİ-MKH'ler ile direkt ko-kültüre alınan K562 hücrelerinin invert mikroskop ile çekilmiş videolarından elde edilen fotoğraflar.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücrelerin sınıflandırılması.....	5
Çizelge 2.2. Embriyonik ve erişkin kök hücrelerinin karşılaştırılması.....	14
Çizelge 2.3. MKH'lerin tümör gelişimini desteklediğini gösteren çalışmalar.....	21
Çizelge 2.4. MKH'lerin tümör gelişimini baskıladığını gösteren çalışmalar.....	21

1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Kök hücrelerin doku gelişiminde, rejenerasyonunda ve yenilenmesindeki gücü yıllardır bilinmektedir. Kök hücre araştırmalarına giderek artan ilginin sebebi ise bu hücrelerin eşsiz gücünden kaynaklanmaktadır (Watt et al. 2010).

Kök hücreler, kök hücre araştırmalarındaki önemli gelişmeler ve tedavi amaçlı kullanım potansiyellerinden dolayı bilim adamlarının dikkatini çekmekte ve özellikle de kök hücre araştırmalarından beklentisi olan pek çok hasta ve hasta yakınlarının umut kaynağı olmaktadır (Watt et al. 2010).

Mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin keşfi ve tümör dokusu üzerindeki etkilerine ilişkin araştırmalarla elde edilen sonuçlar, yakın zamanda bu hücrelere olan ilginin artmasına sebep olmuştur. Yapılan çalışmalarla, oluşturulan tümör modellerinde MKH'lerin, tümör gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İlginç olarak yapılan deneylerde farklı sonuçlar ortaya çıkmaktadır; bazı araştırmacılar MKH'lerin tümör gelişimini desteklediğini, bazı araştırmacılar ise tümör gelişimini baskıladığını bildirmiştir. Sonuçlar arasındaki bu çelişkinin sebebi olarak bazı mekanizmalar gösterilebilir. Örneğin; kemokin sinyalleri, apoptozisin modülasyonu, vasküler destekleme ve immün modülasyon gibi... MKH'lerin hangi koşullarda tümör gelişimini desteklediğini ve metastaz oluşumundaki rolünü anlayabilmemiz, bu hücrelerin karsinogenezdeki etkilerini belirlememizi kolaylaştırırken terapötik ajan olarak kullanımlarını da daha güvenli hale getirecektir.

Kronik myeloid lösemi (KML) kemik iliğinde çok fazla akyuvar üretilmesi sonucu ortaya çıkan, yavaş seyirli bir kanser türüdür. KML, insanlarda spesifik kromozom anomalisi ile ilişkisi tespit edilen ilk hastalıktır. Vakalarının % 90'dan fazlasında sitogenetik analiz ile Philadelphia (Ph*) kromozomu tespit edilir. KML'nin güncel tedavisinde İmatinib kullanılmaktadır. Klinik çalışmalarda, hedefe yönelik tedavi olarak,

yüksek düzeyde klinik ve sitogenetik etkinlik gösterdiği gözlenmiştir. Ancak ödem, cilt döküntüleri, sitopeniler gibi yan etkilerinin yanı sıra hastalığın ileri evrelerinde başarı şansı daha düşüktür. Oysaki tedavi mevcut verilere göre yaşam boyu verilmelidir. Bu durum, araştırmacıları KML tedavisi için imatinibin yanında yeni tedavi stratejileri geliştirmeye yöneltmiştir. Son yıllarda MKH'ler ile yapılan *in-vivo* çalışmalarda, başta kanser olmak üzere klinikte tedavisi olmayan pek çok hastalıkta kullanılabileceği öngörülmektedir.

Tez çalışmamızda MKH'lerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, kemik iliği kanseri olan, kronik miyeloid lösemi hücre hattı; K562 hücreleri ve kemik iliğinde bu hücreler ile aynı mikroçevreyi paylaşan kemik iliği kaynaklı MKH'ler deneylerimizde kullanılmak üzere seçilmiştir. MKH'lerin K562 hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Deneylerimizde kullandığımız MKH'lerin IL-2 ile uyarmanın sebebi bazı araştırmacılar tarafından IL-2'nin KML tedavisinde anti-lösemik olduğunu bildirmesidir (Vey et al. 1999). Biz de IL-2 ile uyarmanın MKH'lerin K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve anti-proliferatif etkileri üzerinde farklılık oluşturup oluşturmadığını belirlemek istedik.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. KÖK HÜCRELERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Tarih boyunca insanoğlunun en büyük hedeflerinden biri hastalıklara çare bulmak ve insan ömrünü uzatmak olmuştur. Çeşitli bitkilerden elde edilen karışımların binlerce yıl önce tedavide kullanıldığına dair bilgiler mevcuttur. M.Ö. 1534 yılına ait olduğu düşünülen bir papirüste çeşitli hastalıklardan ve tedavilerinden bahsedildiği saptanmıştır. İnsanoğlunun bilinçaltındaki ölümsüzlüğe ulaşma isteği bugüne kadar tıp biliminin itici gücü olmuştur (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Genlerin yapılarındaki bozukluklara bağlı hastalıklarda (örneğin; kanser) , hastalığın kökenine yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi belki de bu hastalıkların kesin ve kalıcı çözümü olacaktır. Ayrıca böbrek, kalp ve karaciğer gibi hayatsal organlarda ortaya çıkabilen hastalıklarda insan ölümlerinde ön sırada yer alıyor. Bu hastalıkların ilaçla tedavisi bazen mümkün olabilmekte; ancak kimi zaman organ yetmezlikleri kaçınılmaz bir son olmaktadır. Bu durumda da organ nakli gündeme gelmektedir. Ancak başka bir hastadan alınan organ genetik yapıdaki farklılık nedeniyle, vücut tarafından reddedilebilmektedir. Buna ek olarak, organ yetmezliği olan kişilerin sayısı, mevcut organ vericilerin sayısını kat kat aşabiliyor. Son yıllarda insanın herhangi bir hücresi kullanılarak deri, kemik ve kalp kası gibi çeşitli dokular üretilebiliyor. İnsanın kendi hücresinden meydana getirilen organların nakli, hem organ bağıışı azlığı problemini hem de vücudun organı reddetme olasılığını ortadan kaldırıyor (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip hücrelerdir. 1960'lı yıllarda Kanada'lı bilimadamları Ernest A. McCulloch ve James E. Till yaptıkları çalışmayla insan kök hücreleri alanındaki çalışmalara öncü olmuşlardır (Becker et al. 1963).

Bilim adamları, kök hücreleri vücuttaki diğer hücrelerden ayıran beş farklı özellik tanımlamışlardır. (Karaöz ve Ovalı, 2004)

a) Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler: Normalde kendileri çoğalamayan kan, kas veya sinir hücrelerinden farklı olarak, kök hücreler farklılaşmadan bölünebilir ve çoğalabilirler. Laboratuvar şartlarında aylar boyunca çoğalabilen kök hücre popülasyonunda, milyonlarca hücre ortaya çıkabilir.

b) Kök hücreler farklılaşmamıştır: Bir kök hücrenin temel özelliklerinden biri de, bu hücrenin özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya özgün yapıya sahip olmayışıdır. Bir kök hücre, bir kalp kasında olduğu gibi kanı vücuda pompalamak için komşularıyla beraber çalışamaz, kırmızı kan hücreleri gibi oksijeni dokulara taşıyamaz veya sinir hücreleri gibi doku ve organlara gerekli olan elektrokimyasal sinyalleri iletmez. Fakat özelleşmemiş kök hücreler kalp kası hücreleri, kan hücreleri veya sinir hücreleri gibi özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilirler.

c) Kök hücrelerden elde edilen bir yavru hücre, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir (farklılaşma): Embriyonun oluşumunu takip eden döllenmeden sonraki üç gün içerisinde gerçekleşen bölünmeler sonucunda oluşan 4 hücrenin tamamı, yeni bir canlı oluşturabilme kapasitesinde olup, totipotent (*totus*: tüm) kök hücreler olarak adlandırılırlar. Daha sonraki aşamada, bu hücreler blastokist denilen yapıyı oluşturarak yeni bir canlı şekillendirebilme özelliklerini yitirirler. Fakat insan vücudundaki iki yüz farklı özelleşmiş hücre tipine dönüşebilme potansiyellerinden ötürü pluripotent (*pluri*: daha fazla) kök hücreler adını alırlar. Embriyoda bu aşamadan sonra gastrulasyon aşaması başlar ve *germ* tabakaları (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşur. Bu tabakalara göç eden hücrelerin hangi tip hücrelere dönüşebilecekleri büyük ölçüde bellidir. Dolayısıyla, bu dönemdeki kök hücreler multipotent (*multi*: fazla, çok) kök hücreler adını alırlar. Embriyonik evre haricinde, multipotent kök hücreler insanların kemik iliği, kordon kanı ve diş pulpası gibi kısımlarında bulunarak insanın canlılığını bir denge içerisinde sürdürmesini sağlarlar (Çizelge 2.1).

d) Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrardan çoğaltabilmelidirler: Hematopoetik kök hücrelerde yaygın şekilde ve daha yakın geçmişte karaciğer öncüllerinde ve sinir kök hücrelerinde de gösterildiği üzere, kök hücrelerin hasar gören alıcıya naklinin sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrardan

çoğaltabilmeleridir. Kemik iliği stromal hücrelerin hasarlı kalp dokusuna enjeksiyonu sonucu kardiyomyositlere dönüşmesini örnek olarak verebiliriz.

e) Sonucu ve daha az anlaşılmış diğer bir ölçüt ise, kök hücrelerin in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmış kuşaklara katkı sağlamasıdır. (Karaöz ve Ovalı, 2004)

Çizelge 2. 1. Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücrelerin sınıflandırılması. (Kochar, 2004).

Farklılaşma Potansiyeli	Dönüştürdüğü Hücre Tiplerinin Sayısı	Örnek Kök Hücre	Farklılaşma Sonucunda Oluşan Hücre Tipi
Totipotent	Bütün hücreler	Zigot, blastomer	Bütün hücreler
Pluripotent	Embriyonik membranlar dışındaki bütün hücreler	Embriyonik kök hücreler, İndüklenmiş pluripotent kök hücreler	Üç germ tabakasına ait bütün hücreler
Multipotent	Pek çok	Hematopoetik kök hücreler	İskelet kası, kalp kası, karaciğer hücresi, bütün kan hücreleri
Oligopotent	5	Miyeloid öncülleri	Beş kan hücresi tipine (Monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, eritrosit)
Quadripotent	4	Mezenkimal öncül hücreler	Kıkırdak, yağ, stromal, kemik oluşturan hücreler
Tripotent	3	Glial-sınırlanmış öncüller	Astrositlerin iki tipi, oligodentrositler
Bipotent	2	Murine fetal karaciğer hücresi öncülleri	B hücreleri, makrofajlar
Unipotent	1	Mast hücre öncülleri	Mast hücreleri
Nullipotent	0	Tamamen farklılaşmış hücrelerdir (kırmızı kan hücreleri)	-

2.2.Kök hücre çalışmalarının tarihçesi

- **1960**'lar J.Altman ve G.Das tarafından yetişkinlerde nörogenez görüldüğüne dair ilk kanıtlar (beyinde kök hücre aktiviteleri) rapor edilmiştir (Altman ve Das, 2007).
- **1963** McCulloch ve Till fare kemik iliği hücrelerinin kendilerini yenileyebildiğini göstermişlerdir (Becker et al. 1963).
- **1968** İki kardeş arasında başarıyla kemik iliği nakli gerçekleştirilmiştir (Gluckman et al. 1989).
- **1978** İnsan kordon kanında hematopoetik kök hücreler keşfedilmiştir (Prindull et al. 1978).
- **1981** Fare blastosistinin iç hücre kitlesinden embriyonik kök hücreler elde edilmiştir (Martin, 1981).
- **1992** Nöral kök hücrelerin in vitro kültürü yapılmıştır (Reynolds et al. 1992).
- **1997** Löseminin hematopoietik kök hücrelerden köken aldığı anlaşılmıştır ve kanser kök hücreleri ile ilgili ilk doğrudan kanıt elde edilmiştir (Bonnet ve Dick, 1997).
- **1998** J.Thomson ilk embriyonik kök hücre kültürünü yapmıştır (Thomson et al. 1998).
- **2001** Embriyonik kök hücre üretimi için insan embriyosu ilk kez klonlanmıştır (Cibelli et al. 2002).
- **2003** S.Shi yetişkin kök hücre kaynağı olarak çocukların süt dişlerinin kullanılabileceğini keşfetmiştir (Shostak, 2006).
- **2007** A.Atala amniyotik sıvıdan kök hücre elde ettiğini rapor etmiştir (De Coppi et al. 2007).
- **2010** İnsan embriyonik kök hücreleri ile ilk deneme yapılmıştır (Schwartz et al. 2012).

2.3.KÖK HÜCRELER: YENİ YÜZYILIN TEDAVİ ARAÇLARI

Kök hücre araştırmaları, çok uzun ve zengin bir geçmişe sahip olmakla birlikte, 1998 yılında James Thomson ve ark.'nın insan embriyonik kök hücrelerinin laboratuvar ortamında izolasyonunu ve karakterizasyonunu başarıyla gerçekleştirmelerinden sonra hız kazanarak ilerlemektedir (Bianco et al. 2008). Embriyonik kök hücrelerin, potansiyel tedavi aracı olarak kullanılabilmeleri, vücuttaki bütün hücreleri oluşturabilme yeteneklerine dayanmaktadır.

Kök hücrelerin araştırma ve klinikte kullanımları için çeşitli yollar mevcuttur. İnsan embriyonik kök hücre çalışmaları, embriyonun gelişimi sırasında meydana gelen karmaşık olaylar hakkında bilgi vermektedir. Yapılan çalışmaların öncelikli hedefi, farklılaşmamış kök hücrelerin, doku ve organları oluşturan farklılaşmış hücreleri nasıl oluşturduğudur. Günümüz bilgileri ile bu süreçte, ilgili genlerin ekspresyonunun rol oynadığı bilinmektedir. Bazı ciddi sağlık sorunları, kanser ve doğum defektleri gibi, hücre bölünmesi ve farklılaşmasındaki anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Bu süreçlerin genetik ve moleküler seviyede daha iyi anlaşılması, hastalıkların nasıl ortaya çıktığının tespitinde ve yeni tedavi stratejileri geliştirilmesinde önemli bir adımdır (Ankrum ve Karp, 2010).

Yeni ilaçların test edilmesinde kök hücreler önemli birer araçtır. Örneğin, yeni ilaçlar insan pluripotent hücre hatlarından üretilen farklılaşmış hücreler ile ilgili güvenlik açısından test edilebilir. Diğer hücre hatları ise zaten bu amaç için kullanılmaktadır. Örneğin kanser hücre hatları potansiyel anti-kanser ilaçlarının deneylerinde kullanılmaktadır. Pluripotent kök hücreleri, daha çeşitli hücre tiplerinde test edilmesini sağlamaktadır (Takayama ve Eto, 2012).

Ancak şüphesiz ki, kök hücre araştırmaları ile ilgili en önemli uygulama alanı, hücre temelli tedavilerde kullanım potansiyelleridir (Davila et al. 2004).

Hücreyel tedavinin amacı, hasar gören bir hücre, doku veya organın biyolojik işlevini yerine koymak, tamir etmek veya genişletmektir. Hedef organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabilir. Yenileyici (rejeneratif) veya onarıcı (reparatif) tıp olarak da adlandırılan bu alanda kök hücreler oldukça önemli kullanıma potansiyeli göstermektedir (Karaöz ve Ovalı 2004).

Kök hücre tedavisi, otolog veya allojenik kök hücrelerin, lokal bölgeye veya damar yoluyla hastalara verilmesini içermektedir. Yıllardır lösemi ve kanser tedavisinde

kullanılan hematopoetik kök hücre nakli ise kök hücre tedavisi için çok önemli bir örnektir. Son zamanlarda ise kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin terapötik kullanımları ile ilgili çok çarpıcı çalışmalar yayınlanmıştır (Lunn et al. 2011).

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler'in Keşfi ve Klinikte Kullanımları

MKH'ler pek çok dokudan izole edilebilen ve multipotent farklılaşma gösterebilen hücre grubudur. MKH'ler kendini yenileme ve çok çeşitli hücre gruplarına farklılaşma özelliklerinden dolayı, günümüzde kök hücre araştırmacılarının en popüler konusu olmaktadır. MKH'lerin keşfi 1960'lara uzanmaktadır. İlk olarak A. J. Friedenstein, kemik iliği örneklerinden süspanse kültür yaparken bir grup hücrenin plastik-adherent ve fibroblast-benzeri morfolojiye sahip olduğunu, ayrıca kondrosit ve osteoblastlara farklılaştıklarını gözlemlemiş ve bu hücreleri colony-forming unit fibroblast olarak isimlendirmiştir. Aynı grup daha sonra mesodermal orijinli hücrelere de farklılaşmalarından dolayı 'mezenkimal kök hücre' olarak yeniden isimlendirmiştir. Fakat 'kök hücre' kavramını ilk öneren A. J. Friedenstein'in değildir. Onun keşfinden önce, çeşitli bilim adamlarının çalışmaları kök hücre araştırmalarında dönüm noktası teşkil etmektedir. Örneğin Alexander A. Maximow tarafından ilk olarak 'kök hücre' fikri ve hematopoez sürecinde farklı hücre tiplerine farklılaştıkları öne sürülmektedir. Maximow'un 1906 yılında, kan hücrelerinin ortak bir anne hücreden geliştiğini öne süren teorisi 'unitarian theory of haematopoiesis', günümüzde hematopoez ile ilgili bilinenlerin temelini oluşturmaktadır (Wong, 2011).

Bununla birlikte, Ernest A. McCulloch ve James E. Till yaptıkları deneylerle kemik iliği hücrelerinin klonal yapısını ilk ortaya koyan bilim adamlarıdır. Işınlanmış farelere yaptıkları kemik iliği hücrelerinin enjeksiyonu sonrasında, farelerin dalaklarında, enjekte edilen hücre oranında 'dalak kolonilerinin' oluştuğunu fark etmişlerdir. Daha sonra bu kolonilerin tek bir kemik iliği hücresinden kökenlendiğini gözlemlemişlerdir (Wong, 2011).

Günümüzde, kemik iliğinin, hematopoetik kök hücre (HKH) ve mezenkimal kök hücre olmak üzere iki farklı tip kök hücre içerdiği bilinmektedir (Dexter et al. 1977). Kemik iliği

kaynaklı MKH (Kİ-MKH) 'lerin, HKH'lerin proliferasyon, farklılaşma ve canlılıklarında çok önemli oldukları in-vitro koşullarda gösterilmiştir. Kİ-MKH'lerinin tüm kemik iliği hücrelerinin %0,001'ini oluşturduğu ve Fikol yoğunluk santrifügasyonu ile veya plastik-adherent özellikleri ile izole edildikleri bilinmektedir (Barry ve Murphy, 2004). MKH'ler kemik iliği dışında; kordon kanı (Erices et al. 2000), yağ dokusu (Zuk et al. 2001), sinoviyal sıvı (Jones et al. 2004), göbek kordonu (Wang et al. 2004), amniyotik sıvı (In't Anker et al. 2003), plasenta (In't Anker et al. 2003) ve dental dokularda da (Gronthos et al. 2000; Karaöz et al. 2008) bulunmaktadır ve benzer yöntemlerle izole edilebilmektedirler.

MKH'ler fenotiplerinde çok çeşitli belirteçleri eksprese etmektedirler. ISCT (International Society for Cellular Therapy)'ye göre insan MKH'leri standart kültür koşulları altında aşağıda sıralanmış üç özelliğe sahip olmak zorundalar (Horwitz et al. 2005);

- a) Plastik-adherent olmak zorundalar,
- b) CD105, CD73 ve CD90 eksprese ederken, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 ve HLA-DR yüzey belirteçleri bakımından negatif olmak zorundalar,
- c) Osteoblast, Adiposit ve kondroblastlara farklılaşmak zorundalar.

MKH'lerin multi-lineage farklılaşma yetenekleri bu hücrelerin doku mühendisliğinde ve çeşitli hastalıklarda tedavi aracı olarak kullanımlarını mümkün kılmaktadır. Doku mühendisliği, transplantasyon için gerekli doku ve organların, yeterli sayıda donör bulma veya immünolojik-red gibi sıkıntılar olmadan, temini için alternatif olarak sağlamaktadır. Doku mühendisliği teknikleri ile hastadan alınan hücreler biyobozunur yapı iskelelerine ekilerek belirli dokuları oluşturmak mümkündür. Bu dokular, hastalık veya travmaya bağlı doku defektlerini onarmak için kullanılabilir. MKH'ler, proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerinden dolayı doku mühendisliğinde sıkça kullanılmaktadırlar (Kassem et al. 2004).

MKH'lerin tedavide kullanıldıkları başlıca hastalıklar (Trounson et al. 2011);

- Kalp hastalıkları
- Diyabet
- Otoimmün hastalıklar
- Kanser

- GVHD
- Nörodejeneratif hastalıklar
- Kıkırdak yenilenmesi

2.5.KÖK HÜCRE ÇEŞİTLERİ

Kök hücreler genel olarak iki farklı kaynaktan elde edilirler. Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler (Karaöz ve Ovalı, 2004).

İnsan embriyosunun hücre kaynağı olarak kullanılması düşüncesi, tedavi amaçlı (terapötik) klonlama çalışmaları etik ve yasal açılardan büyük tartışmalara neden olmuştur.

Embriyonik olmayan kök hücreler; erişkin kök hücreleri (Dokuya özgün kök hücre, postnatal kök hücre), fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, partenot hücreleri (partenogenez), göbek kordonu ve plasenta kök hücrelerini içermektedir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

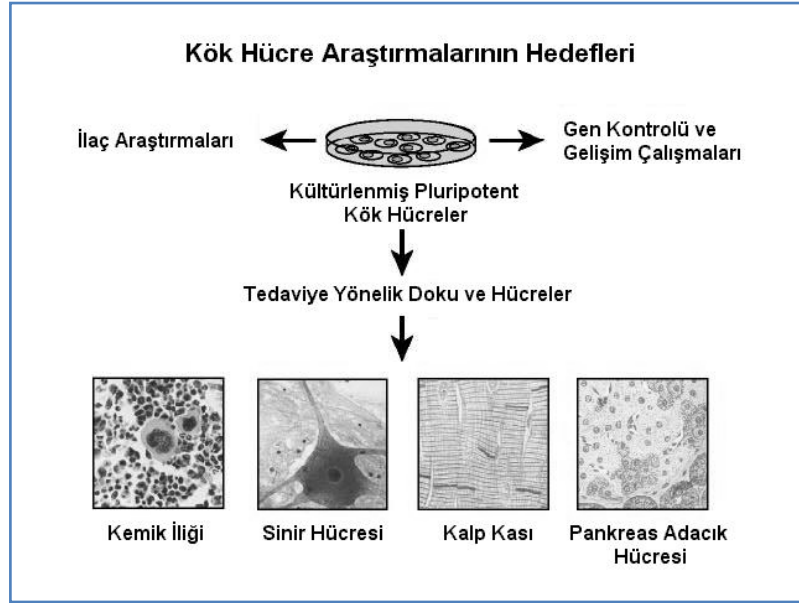
2.5.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler, erken dönemdeki embriyodan elde edilmektedir ve *in-vitro* ortamda sınırsız ve farklılaşmamış çoğalma kapasitesine sahiptirler. “Embriyonik kök hücre” terimi, teratokarsinoma kökenli pluripotent embriyonel karsinoma hücreleri ile embriyon kökenli pluripotent hücreleri ayırt etmek için öne sürüldü (Thomson et al. 1998).

İnsan ve fare embriyonik kök hücreleri, hücre biyolojisinin pek çok temel ve uygulamalı yönleri için güçlü araçları temsil etmektedir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin *in vitro* ortamda özgün hücre serilerine farklılaşmasına dayanan gözlemler bu hücrelerin (Şekil 2.1);

- a) Yeni ilaçlar için gen hedeflerinin tanımlanmasında,

- b) Gelişimsel biyolojide teratolojik ve toksik bileşiklerin tanımlanmasında,
- c) Gen tedavilerinde ve
- d) Hücre esaslı tedavilerde kullanılmak üzere hücrelerin ve dokuların üretilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.



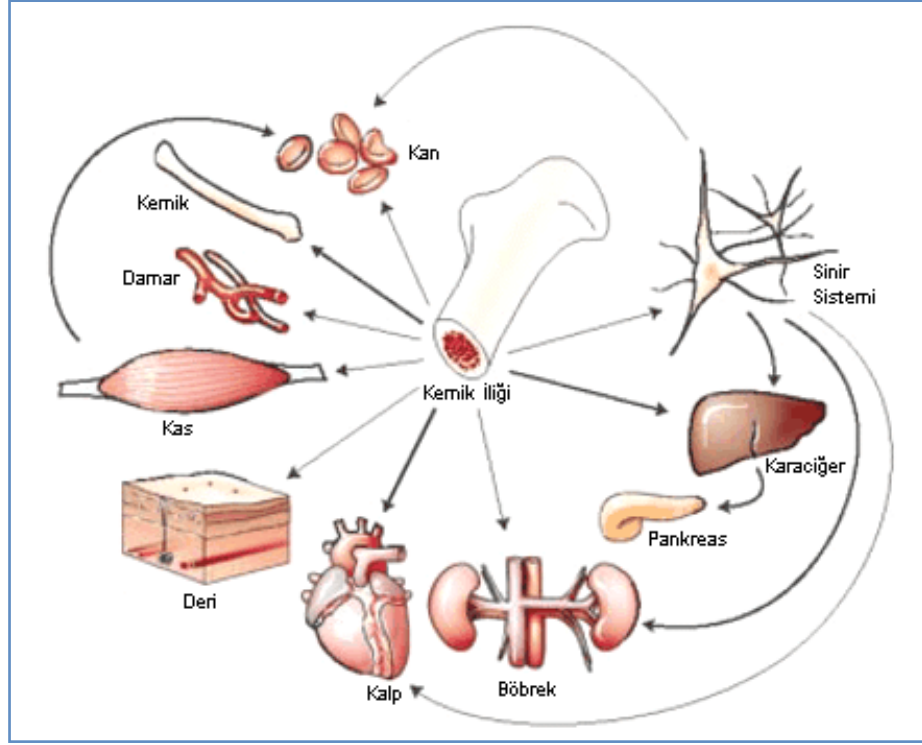
Şekil 2.1. Kök hücre araştırmalarının hedefleri (Karaöz ve Ovalı, 2004).

2.5.2. EMBRİYONİK OLMAYAN KÖK HÜCRELER:

2.5.2.1. Erişkin Kök Hücreler:

Tedavi amaçlı embriyonik kök hücre kullanımı bazı dezavantajlar içermektedir. (Wert ve Mummery, 2003). Embriyonik kök hücreler ile erişkin kök hücrelerin karşılaştırılması Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Erişkin kök hücreler, doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücreler olup, bu hücre kendisini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Erişkin kök hücrelerinin yaşayan organizmadaki esas görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Erişkin kök hücre farklılaşması (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Erişkin kök hücrelerini;

- 1- Hematopoietik kök hücreler,
 - a) Kemik iliği kök hücreleri,
 - b) Periferik kan kök hücreleri,
 - c) Kordon kanı kök hücreleri,
- 2- Stromal kök hücreler (Mezenkimal kök hücreleri),
- 3- Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri şeklinde sınıflayabiliriz.

2.5.2.1.1. Hematopoetik kök hücreler

Pek çok hastalığın günün birinde kök hücre tedavisiyle iyileştirilebileceğine yönelik beklentiler, kemik iliği nakillerinin lösemi, kalıtsal kan hastalıkları ve bağışıklık sistemini ilgilendiren hastalıklarda ortalama yaşam süresini uzatmasına ilişkin tarihi başarıya dayanmaktadır. Yaklaşık kırk yıl önce, elde edilen bütün başarılı sonuçlardan sorumlu

birincil hücre tipi, hematopoietik kök hücresi olarak tanımlandı. Hematopoietik kök hücrelerinin kemik iliğinde sürekli olarak kendilerini yenileyebilme ve kanda bulunan hücre türlerine farklılaşabilme yetenekleri, bunları temel erişkin kök hücresi sınıfına sokmaktadır. Kemik iliği stromal hücreleri denilen ikinci bir grup, bundan birkaç sene sonra keşfedildi. Kemik iliği kökenli stromal hücreler önceleri hematopoezi indüklemek amaçlı kullanılırken, sonraları osteositlere, kondrositlere, tenositlere, yağ dokusu hücrelerine ve düz kas hücrelerine dönüşebildikleri gösterildi. Hematopoietik kök hücreleri, erişkin insanlardan izole edilebilen az sayıdaki kök hücrelerden biridir. Esas itibariyle, kemik iliğinde yerleşik olan hematopoietik kök hücreleri normalde fetüsün karaciğerinde, dalağında, göbek kordonunda, plasentada ve erişkin periferik kanında bulunurlar (Karaöz ve Ovalı, 2004).

2.5.2.1.2. Stromal kök hücreler (Mezenkimal kök hücreler)

Kemik iliği, hematopoietik doku ve stroma olmak üzere iki ayrı sistemden oluşan bir organdır. Kemik iliği hücreleri kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman hızla plastik kültür kabına yapışan (adhere olan) hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri olduğu, yapışmayan (non-adherent) hücrelerin ise hematopoietik hücreler olduğu 1966'lı yıllardan beri bilinmektedir. Son yıllarda ise, stromal hücre sistemine duyulan ilgi giderek artmaktadır. Önceleri, kemik iliği kökenli stromal hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken daha sonraları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla aralarında kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, adipoz doku, böbrek, akciğer ve bağırsakların da olduğu çeşitli hematopoietik olmayan dokuların parankimal hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler, ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlandı. Sonraki *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar, mezenkimal kök hücreleri her üç germ yaprağından köken alan hücre ve dokuları oluşturan bir multipotent kök hücre kaynağı olarak belirlemişlerdir.

Mezenkimal kök hücrelerin başta hematopoietik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek arttırmaktadır.

Çizelge 2. 2. Embriyonik ve erişkin kök hücrelerinin karşılaştırılması. (Morst, 2006)

Özellik	Embriyonik Kök Hücreler	Erişkin Kök Hücreler
Farklılaşma potansiyeli	Pluripotent. Üç germ yaprağına ait tüm hücelere (potansiyel olarak tüm vücut hücrelerine) farklılaşabilirler.	Çoğu multipotent özellikte olup bazıları pluripotent farklılaşma göstermektedir.
Etik Kaygılar	Etik, kültürel ve dinsel tartışmalar, erken embriyoların izolasyonu ve kişiye özel EKH dizilerinin geliştirilmesi (SCNT teknolojisi) konularında yoğunlaşmaktadır.	Donörlerden bilgilendirilmiş onam alınması gerekmektedir. EKH'lerin ticari ürüne dönüştürülmesi konusu etik açıdan tartışmalıdır.
Kaynak ve İzolasyon	Elde edilmeleri zordur. Kişiyeye özel EKH dizilerinin geliştirilmesi de oldukça pahalıdır. Bir EKH hücre hattının geliştirilebilmesi için 5-50 insan oositinin kullanılması gerekmektedir.	İzolasyonları kolaydır ancak elde edilebilen hücre sayısı oldukça azdır. İzolasyonlarında cerrahi işlemler gerekebilir.
İn vitro koşullarda üretilmeleri	<i>İn-vitro</i> kültür koşullarında, kendilerini yenileme yeteneklerini devam ettirirler ancak farklılaşmadan stabilitelelerinin korunması zordur.	<i>İn-vitro</i> kültür koşullarında kendileri yenileme ve çoğalmaları yavaş gerçekleşmektedir.
Hastalık transfer riski	Viral kontaminasyon riski bulunmaktadır. (besleyici tabakadan ve serum bağımlı hücre hatlarından)	Kan transfüzyonu ve organ nakillerinde gözlenen risklere benzemektedir.
İmmunojenite	Hücre tedavilerinde, kişiye özel geliştirilmiş EKH hatlarında daha azalmış immunojenik özellik gözlenmektedir.	Otolog kaynaklar, immunojenik olarak reaktif değildir. Bazı EKH'ler daha düşük immunojenik özellik göstermektedir.
Tümör oluşumu	<i>İn-vivo</i> uygulamalarda, teratom oluşturma riski taşır.	<i>İn-vivo</i> uygulamalarda, tümör oluşturma riskleri daha düşük veya yoktur.
Genetik modifikasyon	Genetik modifikasyonlar daha kolay yapılabilir. Hücre seçimi veya hücre ölümüne izin vermek için gerekli olabilir. İstenmeyen mutasyonlara neden olabilir.	Genetik modifikasyonlar yapmak zordur (hücre sayısının azlığı ve kültür koşullarının zorluğu nedeniyle). Hücre füzyonu gen terapisine olanak sağlayan bir seçenek olabilir.
Hücre gen tedavilerinde kullanımları	Genetiği değiştirilmiş hücre dizilerinin elde edilmesi daha kolaydır.	Genetiği değiştirilmiş hücre dizilerinin elde edilmesi daha zordur.
Hücre yenileyici tedavi uygulamalarında kullanımları	Rapor edilen herhangi bir klinik tedavi veya insan uygulaması bulunmamaktadır.	Lösemi ve lenfoma tedavilerinde, klinik uygulamaları vardır. Kemik iliği nakilleri ve periferel kan veya kordon kanı nakilleri gerçekleştirilmektedir.

Erişkin kök hücrelerinin tedaviye yönelik olarak kullanılmalarındaki avantajları (Karaöz ve Ovalı, 2004):

- Bir erişkinden alınan kök hücreleri kullanmanın potansiyel avantajı, hastanın kendi hücrelerinin kültürde çoğaltılabilmesi ve daha sonra tekrardan hastaya verilmesidir. Hastanın kendi erişkin kök hücrelerinin kullanılması, bu hücrelerin immün sistem tarafından reddedilmeyeceği anlamına gelmektedir. İmmün red olayı, bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar kullanılarak aşılabilen güç bir problem olduğundan, bu durum önemli bir avantaj sağlamaktadır.
- Erişkin kök hücreleri kısmi olarak özelleşmiş (multipotent) oldukları için, bunlardan tam özelleşmiş hücrelerin elde edilebilmesini sağlamak amacıyla dışarıdan verilecek sinyallerin miktarı daha azdır.
- Embriyonik kök hücreler ile karşılaştırıldığında, etik yönden tartışmaların kapsamı dışındadır.
- Bazı durumlarda, özellikle kemik iliği kök hücrelerinin mobilizasyonu temeline dayanan yöntemlerin kullanılması non-invazif bir seçenek sağlamaktadır. Bunun yanında, son zamanlarda doku ya da organlardaki (beyin gibi) kök hücrelerini aktive edebilmek için dışarıdan büyüme faktörleri ve hormonlar vermenin olumlu sonuçları bildirilmiştir.

2.6.Kök Hücre ve Kanser Hücreleri Arasındaki İlişki

MKH'lerin keşfi ve tümör dokusundaki rollerine ilişkin araştırmalarla elde edilen bulgular son yıllarda bu hücrelere olan ilginin artmasına neden olmuştur. Araştırmacılar çeşitli tümör modelleri oluşturarak MKH'lerin tümör gelişimi üzerindeki etkilerini belirlemeye çalışmaktadır. İlginç olarak yapılan çalışmalarla çelişkili sonuçlar ortaya çıkmaktadır, bazı araştırmacılar MKH'lerin tümör gelişimini teşviklediğini öne sürerken, bazı araştırmacılar ise tümör gelişimini inhibe ettiğini vurgulamaktadır (Şekil 2.3). Bu gözlemleri açıklamak için bazı mekanizmalar mevcut: kemokin sinyalleri, apoptozisin modülasyonu, vasküler destekleme ve immün modülasyon gibi. MKH'lerin hangi koşullarda tümör gelişimini arttırdığını ve metastazlardaki rollerini anlayabilmemiz, bu hücrelerin karsinogenezdeki rollerini anlamamızı kolaylaştırırken terapötik ajan olarak kullanımlarını da daha güvenli hale getirecektir (Klopp et al. 2011).

Mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin keşfi ve tümör dokusundaki rollerine ilişkin araştırmalarla elde edilen bulgular ise son yıllarda bu hücrelere olan ilginin artmasına neden olmuştur. Özellikle, son yıllarda gerçekleştirilen birçok araştırmanın sonuçları MKH'lerin;

- a) İmmunosüpresyon ve immunomodülasyon,
- b) Anti-apoptatik,
- c) Anti-fibrotik,
- d) Anti-inflamatuar,
- e) Kemoatraktan,
- f) Yeni damar oluşumunu etkileme gibi özelliklerini açığa çıkarmıştır.

Bu özellikleri birçok pre-klinik çalışmayla ortaya konmuş ve klinik insan denemelerinden yararlanılmaya başlanmıştır. Örneğin, immunosüpresif etkileriyle günümüzde başta GvHD olmak üzere alloimmunitiyi (doku-organ nakilleri gibi) engellemeye yönelik girişimler Faz III aşamasına kadar gelmiştir. Bunun yanında, yeni damar oluşturma potansiyelleri kullanılarak iskemik dokuların canlandırılmasına yönelik girişimler artmıştır. Örneğin, diyabetik ayak ve Burger hastalığı gibi olgularda uygulanan MKH'lerinin bu amaca hizmet ettiği birçok deneysel çalışmayla gösterilmiştir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

MKH'ler tümörlere belirgin olarak tropizm gösterirler. Tümör fibrovasküler ağında bulunan MKH'ler farklılaşarak tümör-associated fibroblastları ve vasküler perisitleri oluştururlar (Kidd et al. 2009). Son beş yıldır yapılan çalışmaların artmasına rağmen MKH'lerin tümör gelişimindeki rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı çalışmalar tümör gelişimini ve metastaz eğilimini desteklediğini vurgularken; diğer bazı çalışmalar tümör gelişimini baskıladığını öne sürmektedir (Çizelge 2.3 ve 2.4). Bu çelişkinin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, farklı tümör modellerinin kullanımına, MKH'lerin çok çeşitli kaynaklardan elde edilmesine, enjekte edilen MKH dozuna, taşıyıcı hayvana bağlı olarak çok çeşitli farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

MKH'lerin tümöre olan tropizmleri, onları antitümör ajanları hedefe taşıyabilecek eşsiz hücresel araçlar yapmaktadır. MKH'ler çeşitli ajanı hedefe taşıyabilirler: interferon β , sitozin deaminaz, tümör nekroz faktör ve onkolitik virüsler gibi (Yong et al. 2009).

MKH'ler çok çeşitli yetişkin ve fetal dokulardan benzer yöntemlerle izole edilebilirler; kemik iliği, yağ, diş pulpası, kordon kanı gibi dokulardan elde edilen MKH'ler kemik iliği MKH'lerine benzer özellik gösterirler. Ek olarak MKH'lerin tümöre gösterdikleri tropizmin kanıtlanması onları, farklılaşmış fibroblastlar gibi, diğer mezankimal hücrelerden ayırmaktadır. MKH'lerin bu kadar çeşitli kaynaklardan izole ediliyor olmaları ve donörlerin yaşam tarzlarındaki farklılıklar yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçların çıkmasına neden olmuş olabilir.

2.6.1. MKH'lerin Endojen Fonksiyonları

MKH'lerin tümördeki rolleri yara iyileşmesindeki rollerine benzetilebilir. Yaralarda olduğu gibi, MKH'ler tümör dokusunda bulunan fibroblastlara, perisitlere ve endotel hücrelere farklılaşırlar. Buna ek olarak bazı matrix proteinleri ve sitokinler salgılayarak (VEGF, PDGF... gibi) tümör proliferasyonunu ve vaskülogenezi artırırlar. MKH'ler ayrıca kompleks immün-düzenleyici etkilere de sahiptir. Hostun immün cevabını baskılayarak ve fibrosisi önleyerek inflamasyonla savaşır. MKH'lerin immünbaskılayıcı özellikleri GvHD tedavisinde umut olarak görülmektedir (Brooke et al. 2007).

Bazı çalışmalar, MKH'lerin tümör gelişimi üzerinde etkisi olmadığını göstermektedir (Kucerova et al. 2007).

2.6.2. MKH'lerin Tümör Baskılama Ve Destekleme Mekanizmaları

2.6.2.1.Vasküler Destekleme

MKH'ler direkt veya indirekt olarak tümör damar sistemini destekler. Direkt olarak perisit ve endotel hücrelere farklılaşarak; indirekt mekanizmalar ise vaskülogenik büyüme faktörleri (VEGF, fibroblast- derivet büyüme faktörü, PDGF ve SDF-1 gibi) salgılayarak olmaktadır (Roorda et al. 2009). Bu sitokinlerin salınımı kan damarlarının gelişimini desteklemektedir. VEGF ekspresyonunun pankreatik ksenograflarda kılcal damar yoğunluğunu arttırdığı ancak VEGF'nin rekombinant olarak medyuma eklenmesi aynı proliferatif etkiyi göstermemiştir bu da diğer proanjyogenik faktörlerinde önemli olduğunu göstermektedir (Potapova et al. 2007).

2.6.2.2.Fibrovasküler Ağ

Tümör stromasında birincil hücre tipini içeren fibroblastlar, tümör mikroçevresinin en önemli bileşenleridir. Tümör fibroblastları MKH'lerin farklılaşmasıyla veya çevresel hücrelerin sirkülasyonu ile oluşmaktadır. MKH'ler tümör mikroçevresine maruz kaldıktan sonra tümör fibroblast antijenlerini eksprese etmeye başlıyorlar: α -smooth muscle actin, fibroblast spesifik protein, vimentin ve SDF-1 gibi (Spaeth et al. 2008, Mishra et al. 2008).

Tümör fibroblastlarının tümör oluşumundaki önemi pek çok farklı deney modelleri ile kanıtlanmıştır. Tümör fibroblast ekstraktlarının fareye enjeksiyonu meme ve yumurtalık kanserlerinin gelişimini kolaylaştırmaktadır. Bu olay farklı mekanizmalar aracılığıyla gelişmektedir: kanser hücre apoptozunun inhibisyonu, tümör hücre proliferasyonunun artırılması ve anjiyogenezin indüklenmesi gibi mekanizmalar rol oynamaktadır (Ostman ve Augsten, 2009).

2.6.2.3.MKH'lerin Tümörde İmmün-düzenleyici Etkileri

MKH'lerin tümör gelişimini desteklemelerinde yada *in-vivo* tümör oluşumunu arttırmalarında genel olarak immün baskılayıcı etkilerinin rol aldığı düşünülmektedir. MKH'ler direkt olarak immün sistem hücrelerinin (B ve T lenfositleri, NK hücreleri, dendritik hücreler gibi) fonksiyonlarını bozabilirler. Bu immün baskılayıcı özellikleri ile allojenik kök hücre nakli ile gelişen GvHD'yi azaltmak için kullanılmaktadırlar (Ning et al. 2008).

MKH'ler T-hücre proliferasyonunu çeşitli mekanizmalarla baskırlar. IFN-gama direkt olarak, yüzey marker inhibitörü olan B7-H1 ekspresyonunu arttırarak MKH'lerin T-hücre baskılama etkilerini arttırırlar. Stro-1+ ekspresyonu ile tanımlanan MKH'lerin alt popülasyonu hücreler en potansiyel T-hücre proliferasyonunu baskılayan hücrelerdir (Nasef et al. 2009).

2.6.2.4. Metastaz

Karnoub ve ekibi (2007) MKH'ler tarafından salınan CCL5'in meme kanser hücrelerinde kısa süreli prometastatik etkide bulunduğunu bulmuşlardır. Meme kanser hücrelerinin MKH'ler ile birlikte enjekte edildiklerinde akciğer kanseri gelişiminde 2-7 kat artış olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak MKH'lerin daha uzak bir bölgeye enjekte edildiklerinde aynı prometastatik sonuç ile karşılaşılmamıştır, bu da prometastatik dönüşümün MKH'ler ile kontakt temasın veya salgılanan parakrin faktörlerin aracılığı ile olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca araştırmacılar MKH yerine diğer mezenkimal hücreleri enjekte ettiklerinde de metastaz ile karşılaşmamışlar bunu da prometastatik özelliğin yalnızca MKH'lere özgü olduğuna bağlamışlardır.

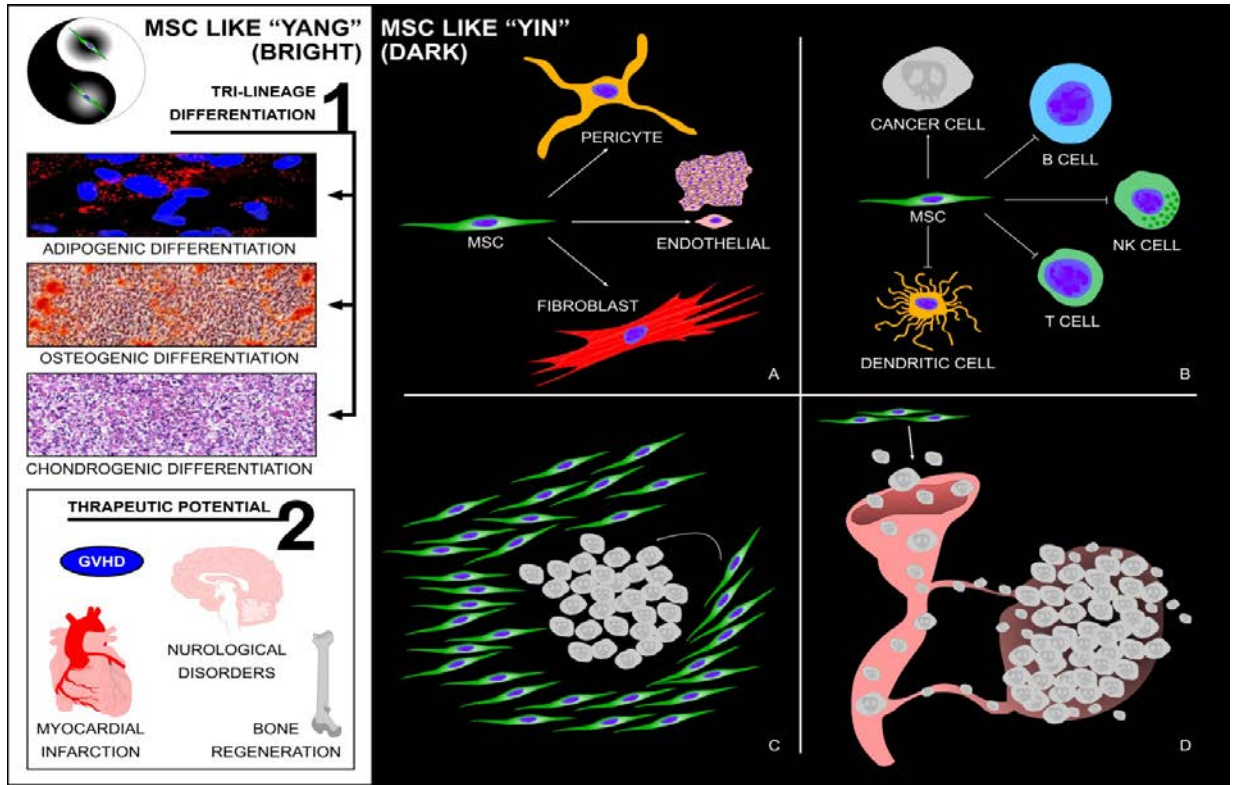
2.6.2.5. Parakrin Faktörlerin Salgılanması

MKH'ler tümör proliferasyonunda, migrasyonunda ve anjiyogenezinde etkili olduğu bilinen pek çok büyüme faktörü salgırlar. Ayrıca, MKH'lerin ekzosom ve mikropartikül salgıladıkları da yeni bilgiler arasındadır. Mikropartiküller hücreler tarafından salgılanan lipid vezikülleridir, protein veya RNA içerikleri ile komşu hücreler arası intraselüler ilişkiyi düzenlerler (Kozanoğlu et al. 2009).

2.6.2.6. Sitotoksik Tedavide Tümör Cevabının Modülasyonu

Yapılan çalışmalarla MKH'lerin tümör hücrelerini kemoterapiden koruduğu gösterilmiştir. Kemik iliğinde bulunan MKH'lerin akut ve kronik miyeloid lösemide etkileşimleri ile lösemi hücrelerinin canlılığını desteklediği bulunmuştur. MKH ile AML hücrelerinin ko-kültürü, antiapoptotik bcl-2 ekspresyonunda artış ile sonuçlanmıştır (Konopleva et al. 2002).

MKH'ler yüksek oranda leptin salgırlar ki bu da adipojenik farklılaşma sırasında anti-apoptotik özellik gösterir. MKH kökenli adipositler lösemik apoptozisini düşürürler (Salazar et al. 2009).



Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücre ve kanser arasındaki ilişki (1) Farklı kaynaklardan izole edilen MKH'ler multi-lineage (adipojenik, osteojenik, kondrojenik) prekürsör hücreleri oluşturabilme özelliğine sahip multipotent hücrelerdir. (2) Sahip oldukları immünbaskılayıcı, anti-apoptotik, proliferatif ve rejeneratif özellikleri ile çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilirler. A) MKH'ler neo-perisit, neo-endotel ve neo-fibroblast hücrelerine farklılaşarak tümör stromasının oluşumuna destek olurlar. B) MKH'ler savaşçı hücreleri baskılayarak tümör hücrelerinin immün-sistemden kaçmasına yardımcı olurlar. C) Salgıladıkları büyüme faktörleri ve sitokinlerle kanser hücreleri için uygun niş oluştururlar. D) Neo-anjiyogenezisi indükleyerek yeni damar oluşumuna ve metastazlara sebep olurlar (Karaöz ve Akpınar 2013).

Çizelge 2.3. MKH'lerin tümör gelişimini desteklediğini gösteren çalışmalar (Klopp et al. 2011).

<i>MKH Kaynağı</i>	<i>Deney Modeli</i>	<i>Bulgular</i>	<i>Kaynaklar</i>
Kİ-MKH	Meme kanser hücre hattı	Tümör boyutu ve metastazda artış	(Karnoub et al. 2007)
Kİ-MKH	Kolon kanser hücre hattı	Proliferasyon ve anjiyogeneze artış	(Zhu et al. 2006)
Fare Kİ-MKH	Melanoma (B16)	Tümör oluşumunda artış	(Djouad et al. 2003)
Yağ dokusu MKH	Meme kanser hücre hattı	Tümör boyutunda artış	(Muehlberg et al. 2009)
Fare yağ dokusu MKH	Meme kanser hücre hattı	Tümör boyutunda ve oluşum oranında artış	(Galie et al. 2008)
Yağ dokusu MKH	Prostat kanser hücre hattı (PC3)	Tümör boyutunda ve oluşum oranında artış	(Lin et al. 2010)
Yağ dokusu MKH	Prostat kanser hücre hattı	Tümör boyutunda artış	(Prantl et al. 2010)
Yağ dokusu MKH	A549	Tümör hacminde artış	(Jeon et al. 2010)

Çizelge 2.4. MKH'lerin tümör gelişimini baskıladığını gösteren çalışmalar (Klopp et al. 2011).

<i>MKH Kaynağı</i>	<i>Deney Modeli</i>	<i>Bulgular</i>	<i>Kaynaklar</i>
MPC1cE MKH (hazır hücre hattı)	Rat kolon kanser hücre hattı	Tümör boyutunda azalma	(Ohlsson et al. 2003)
Fetal deri hücreleri	Karaciğer kanser hücre hattı	Tümör boyutunda azalma	(Qiao et al. 2008)
Fetal deri hücreleri	Meme kanser hücre hattı	Metastaz ve tümör boyutunda azalma	(Qiao et al. 2008)
Yağ dokusu MKH	Pankreas kanser hücre hattı	Tümör boyutunda azalma	(Cousin et al. 2009)

2.7. Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri (KKH) tümörün başlangıcından sorumlu olan ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. Aynı özgü sinyal ileti sistemleri KKH'lerin ve normal kök hücrelerinin kendini yenileme ve farklılaşmasında fonksiyonel rol oynarlar. Aralarındaki başlıca fark; KKH'lerde aynı sinyal ileti sistemlerinin düzenlenmesi değişmektedir. Son çalışmalarla KKH'lerin ilaç ve radyasyon tedavisine dirençli oldukları gösterilmiştir. Gelecekteki çalışmalar kanserin tedavisi için KKH'leri hedef alan tedavilerin geliştirilmesine öncülük edecektir (Tuna 2009).

Kanser kök hücre teorisine göre, KKH'ler kanser hücrelerinin kendilerini yenileme ve farklılaşma özelliği olan alt gruplarıdır. Yalnız bu iki özelliğe sahip hücreler “Kanser Kök Hücresi” (KKH) olarak adlandırılır. Kanser kök hücresi “kanseri başlatan hücre” olarak da adlandırılmaktadır. Son zamanlarda kan, meme, beyin, dalak, baş ve boyun, kolon, deri ve over kanserlerinde KKH'lerin olduğu yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Tuna 2009).

Tümör dokusunda bulunan kanser hücreleri heterojen yapıya sahiplerdir. Buradaki heterojenite daha çok tümördeki kanser hücrelerinin farklılığı anlamında kullanılmaktadır. İmmün yetersiz farelerde yapılan çalışmalar tümörde, yalnızca belli grup hücrelerin tümör büyümesini sağladığını, diğer hücrelerin ise sağlamadığını göstermektedir. Bu da kanser kök hücrelerinin iki ana görevi olduğunu göstermektedir; kendini yenileme ve farklılaşma. Oluşan tümörler farklı kanser kök hücre gruplarından (heterojenite) kaynaklanabilir. Heterojenitenin nedeni, farklılaşmış kanser hücrelerinin ya farklı kök hücrelerinden kaynaklanmasından ya da farklı mutasyon profillerin yansımalarından kaynaklanabilir. Bu farklılıklar, hücrelerin moleküler profilleri ile belirlenebilir. Bu da kanserin önlenmesi ve uygun tedavi stratejisinin geliştirilmesi için doğru hedefin seçilmesini kolaylaştırabilir (Tuna 2009).

2.8. Kronik Miyeloid Lösemi

Kronik myeloid lösemi (KML), kronik granülositik lösemi olarak adlandırılır. KML, primitif pluripotent kök hücrenin klonal bir hastalığıdır. Kemik iliğinde aşırı miyeloid hiperplazi, çevre kanında olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı (bazofili ile birlikte) ve splenomegali ile karakterizedir. Akut lösemide varolan patolojik tablonun aksine, lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir. KML, myeloproliferatif hastalıklar grubu içinde sınıflandırılır. KML, üç fazlı bir hastalıktır. KML klinikopatolojik seyri; kronik faz, akselere faz, ve blastik faz olarak adlandırılır (Haznedaroğlu).

KML klinik bulguları farklılık gösterir. Tanı sırasında vakaların %30'u asemptomatik olabilir. KML hastalarını %10'u akselere fazda, %10'u da blastik fazda teşhis edilmektedir. Kromozom anomalisinin gelişmesi ile klinik bulguların ortaya çıkması arasında yaklaşık 6 yıl vardır (Haznedaroğlu).

KML tedavisinde başlangıçta hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen hücre azaltıcı sitotoksik tedaviler (başlıca hidroksiüre ve busulfan) kullanılmıştır. Sonraki dönemde

biyolojik yanıt düzenleyici ilaçlar (interferon ve interferon/ ARA-C kombinasyonu) sitogenetik remisyon sağlama amaçlı olarak kullanılmıştır. Lökosit sayısı çok yüksek KML hastalarında hiperviskosite sendromu bulguları varsa lökoferez uygulanır (Haznedaroğlu).

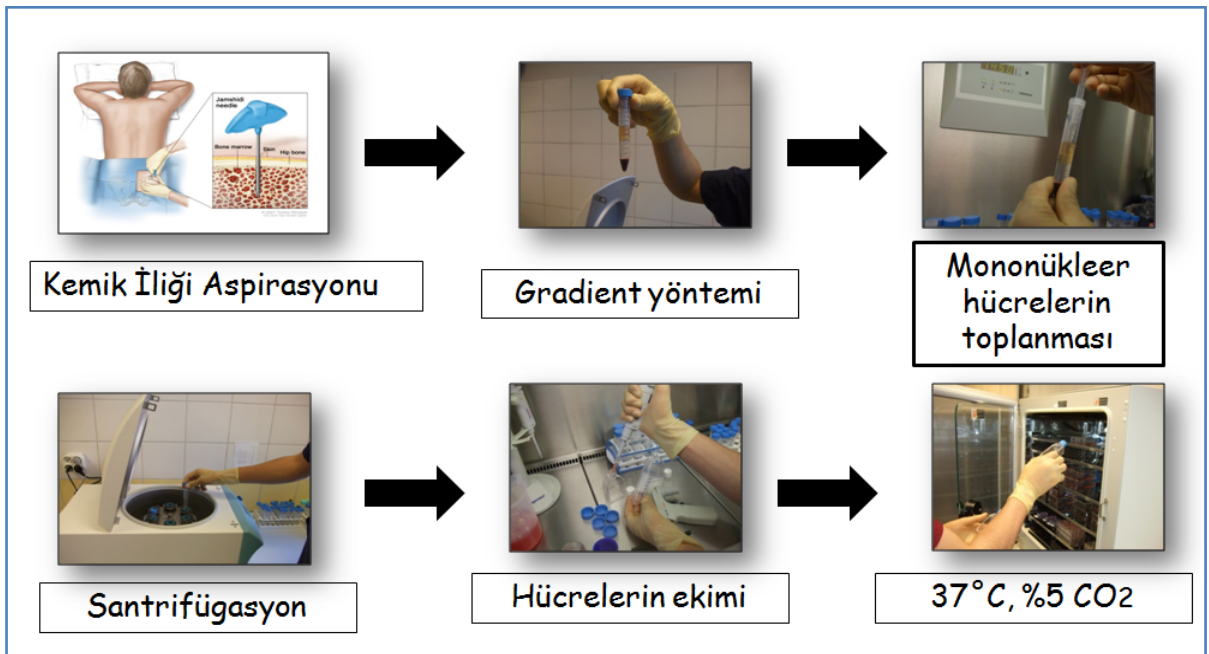
1998 yılında spesifik bcr/abl tirozin kinaz inhibitörü imatinib mesilat (STI571, Glivek) bir ilaç olarak klinik uygulamaya girdikten sonra KML tedavisinde “İmatinib Dönemi” başlamıştır. İmatinib, 400 mg/gün dozunda özellikle Kronik Fazda hematolojik, sitogenetik hatta moleküler remisyon (BCR-ABL füzyon transkriptinin kaybolması) sağlayabilmektedir. İmatinib, oral olarak çok iyi tolere edilir. Tedavi, mevcut verilere göre yaşam boyu verilmelidir. Ödem, cilt döküntüleri, sitopeniler gibi yan etkileri vardır. Ancak diğer KML tedavilerine göre bu yan etkiler çok daha iyi tolere edilir. Bununla birlikte tedavi maliyeti oldukça yüksektir. Akselere fazda ve Blastik fazda KML hastalarında da 600-800 mg dozlarında imatinib kullanılmaktadır. Fakat hastalığın ileri evrelerinde başarı şansı daha düşüktür. İmatinib döneminde yapılan KML tedavisinde hastanın hematolojik, sitogenetik, ve moleküler olarak izlenmesinin önemi çok fazladır (Haznedaroğlu).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:

3.1. Kemik İliği Materyalinden MKH İzolasyonu, Kültürü Ve Karakterizasyonu

3.1.1. Kemik İliği Materyalinden MKH İzolasyonu

Etik kurul onayları dahilinde, hasta bilgilendirme ve onam formunun imzalatılması sonrasında, hematologlar tarafından tanı için alınan kemik iliği örneği laboratuvarımıza alınarak izolasyon çalışmaları başlatıldı. Alınan kemik iliği 50 mL'lik falkon tüplerde (BD Biosciences) 1:1 oranında %5 lik Penisilin/streptomisin (Gibco) içeren HBSS (Gibco) ile sulandırıldı. 15 mL'lik falkonlarda 5 mL fikol (GE Healthcare) üzerine 5 mL kemik iliği solusyonu yavaş bir şekilde yayıldı ve 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası orta bölümde bulunan bulutsu tabaka (mononükleer hücrelerin bulunduğu tabaka) pipet ile toplanarak, HBSS ile yıkama işleminin ardından T25 flasklara (BD Biosciences), %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren LDMEM (Gibco) hazır besiyeri kullanılarak ekim işlemi gerçekleştirildi. Üç günlük kültürün ardından besiyeri dökülerek, eritrositler ve tabana yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı ve mikroskop incelemesi ile fibroblastik morfolojide hücrelerin yüzeye yapıştığı gözlemlendi. Her üç günde bir besiyeri ortamı değiştirilerek mikroskopik gözlem yapıldı.



Şekil 3. 1. KI-MKH'lerin izolasyon basamakları.

3.1.2. MKH Kültürü ve Pasajlanması

Hücreler, kültür kabının yüzeyinde %70-80 konflüente ulaştığında besiyeri dökülerek yapışmayan hücrelerden uzaklaştırıldı. Flask yüzeyi 5 mL Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen PBS (Gibco) ile yıkandı. 1 mL %0,25 tripsin-EDTA (Gibco) solusyonu eklenerek, 37°C,%5 CO₂ basınçlı inkübatörde (Sanyo) 3 dakika inkübe edildi. Mikroskopta bütün hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlendikten sonra tripsin inaktivasyonu için 1 mL hazır besiyeri flasklara eklendi. Pipetaj yapılarak hücreleri içeren solüsyon 15 ml'lik falkona alındı ve 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Thoma lamında hücreler sayılarak, T75 flasklara 5x10⁵ hücre olacak şekilde ekildi ve 3 günde bir besiyeri değiştirildi.

3.1.3. MKH'lerin Akım Sitometri Cihazı İle Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi

Hücreler üçüncü pasaja geldiklerinde akım sitometri cihazı (BD Biosciences FACS Calibur) ile CellQuest™ yazılımı (BD Pharmingen) kullanılarak hücrelerin yüzey antijenleri CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA ABC, CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR monoklonal antikorlar kullanılarak karakterize edildi.

3.1.4. MKH'lerin Farklılaştırılması

3.1.4.1. Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaştırma için 6-kuyucuklu plakaların içindeki Tip 1 kollajen kaplı lamellere 3000 hücre/cm² olacak şekilde ekim yapıldı. Adipojenik farklılaştırmayı indüklemek için MEM besiyerine %10 oranında FBS, 0.5mM oranında isobutilmetilksantin (IBMX), 10⁻⁶ M oranında deksametazon, 10µg/ml oranında insulin, 200µM oranında indometazin ve %1 oranında penisilin/streptomisin eklendi ve hücreler bu besiyeri ortamında 4 hafta süre ile kültüre edildi. Üç günde bir adipojenik farklılaşma besiyeri değiştirildi. 4 haftalık sürenin sonunda farklılaşan hücrelerde biriken lipidler histokimyasal olarak Oil Red O boyaması ile tespit edildi.

Oil Red O boyaması için; tip 1 kollajen kaplı lameller %4'lük Paraformaldehit (PFA) ile 15dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından PBS ve distile su ile yıkandı. %60 izopropanol ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Lamele sabitlenen hücreler, 1:3 oranında hazırlanan izopropanol ve Oil Red O stok solüsyonu, 3:2 distile su ile

seyreltikten sonra, bu solusyon ile 40 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 3 kere PBS ile yıkandı. Kurutulduktan sonra lam kapatılarak mikroskopta incelendi.

3.1.4.2. Osteojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaştırma için 6-kuyucuklu plakalara 3000 hücre/cm² olacak şekilde Tip 1 kollajen kaplı lamellere ekim yapıldı. Adipojenik farklılaştırmayı indüklemek için MEM besiyerine %10 oranında FBS, 10⁻⁸M deksametazon, 50 µg/ml askorbat-2-fosfat, 10mM β- gliserofosfat ve %1 oranında penisilin/streptomisin eklendi ve hücreler bu besiyeri ortamında 4 hafta süre ile kültüre edildi. 4 haftalık sürenin sonunda farklılaşan hücreler de hücre dışı kalsifikasyon histokimyasal olarak Alizarin kırmızısı boyaması ile tespit edildi.

Alizarin kırmızısı boyaması için; tip 1 kollajen kaplı lameller %70'lik alkol ile 5 dk + 4°C'de bekletilerek sabitlendi. distile su içersinde %2 Alizarin Red (Fluka) olacak şekilde Alizarin Red çözeltisi hazırlandı. Boyanın pH'sı 4.1-4.3 arasında bir değere ayarlandı ve hücrelerin üzerine eklenerek 45 dk oda sıcaklığında bekletildi, üzerine lam kapatılarak mikroskopta incelendi.

3.2. K562 (İnsan Kronik Miyeloid Lösemi Hücre Hattı) Kültürü ve Ko-Kültür Deney Sistemlerinin Oluşturulması

3.2.1. K562 Hücre Kültürü

Hazır hücre hattı olarak temin edilen K562 hücre serisi, kültür ortamında yüzeye yapışmamakta yani solusyon kültür ile çoğalabilmektedir. T75 flasklara 1x10⁶ hücre olacak şekilde ekimi yapılan hücreler, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren HDMEM hazır besiyerinde kültüre edildi. 3 günde bir besiyeri ortamı değiştirildi.

3.2.2. MKH'lerin IL-2 İle Uyarılması

Karakterizasyonu tamamlanmış MKH'ler, K562 hücreleri ile ortak kültür sistemine alınmadan önce apoptotik sinyal yollarını aktive etmek için IL-2 (Millipore) solusyonu ile 50ng/ml konsantrasyonunda 24 saat boyunca kültüre edilerek uyarıldılar. IL-2'nin sistemik uygulamasında yan etkilere rastlanmıştır. Bu nedenle MKH'leri IL-2 ile muamele edip sonra ko-kültüre IL-2'siz devam edildi.

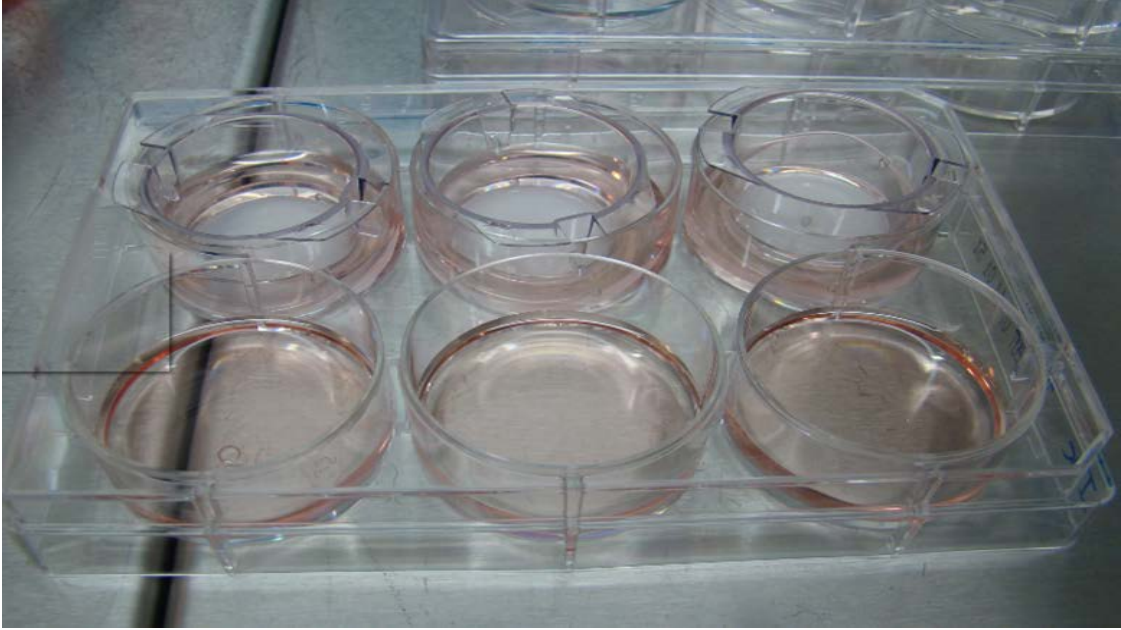
6-kuyucuklu plakalara 1×10^5 hücre olacak şekilde MKH ekildikten sonra yüzeye yapışmaları için 8 saat beklendi. Mikroskop incelemesi ile hücrelerin yapıştığı doğrulandıktan sonra besiyerine 50ng/ml olacak şekilde IL-2 eklendi. %5 CO₂, 37°C inkübatörde 24 saat bekletilerek uyarılmaları tamamlandı.

3.2.3. Uyarılmış Kİ-MKH'lerin K562 Hücreleri İle Direkt ve İndirekt Ko-Kültürü

IL-2 uyarılmasının ardından besiyeri değişimi yapılırken, ko-kültür deneylerinin başlaması için K562 hücreleri 1:1 oranında MKH'ler ile aynı kültür kabına alındılar. Direkt ko-kültür sisteminde, uyarmak amacıyla 6-kuyucuklu plakalara (BD Biosciences) önceden ekilmiş olan 1×10^5 MKH'ler üzerine 1×10^5 K562 hücreleri ekildi ve üzerlerine 3 ml hazır besiyeri eklendi. Direkt ko-kültür sisteminde hücrelerin birbiriyle doğrudan teması gerçekleşmektedir.

İndirekt ko-kültür sisteminde, uyarma amacıyla 6-kuyucuklu plakalara önceden ekilmiş olan MKH'ler üzerine, hücrelerin birbirileri ile doğrudan temasını engellemede kullanılan 0,4 µm por çapında ara bölmeler (insert) (BD Biosciences) dikkatli bir şekilde yerleştirildikten sonra, ara bölmelerin üzerine 1:1 oranında K562 hücreleri ekildi.

72 saat süre ile ortak kültür sistemlerine alınan uyarılmış Kİ-MKH ve K562 hücreleri için aynı deney düzenekleri WST1, CFSE ve ANNEXIN-V/PI analizleri için 6-kuyucuklu plakalarda ayrı ayrı 3'er örnek olarak hazırlandı. Kontrol grubu olarak yalnız K562 hücreleri 6-kuyucuklu plakalarda kültüre alındı.



Şekil 3.2. 6-Kuyucuklu Plakalarda Direkt Ve İndirekt Ko-Kültür Deney Sistemi.

3.2.4. Uyarılmamış MKH'lerin K562 Hücreleri İle Direkt ve İndirekt Ko-Kültür

Uyarılmamış MKH'ler ile K562 hücreleri 1:1 oranında ko-kültür sistemlerine alındılar. Direkt ko-kültür için 6-kuyucuklu plakalara önceden ekilmiş olan MKH'ler üzerine 1×10^5 K562 hücreleri ekildi ve üzerlerine 3 ml hazır besiyeri eklendi. İndirekt ko-kültür için, 6-kuyucuklu plakalara ekilmiş olan MKH'ler üzerine hücrelerin birbirileri ile doğrudan etkileşimini engellemek için 0,4 μm por çapında ara bölmeler dikkatli bir şekilde yerleştirildi, ara bölmeler üzerine 1:1 oranında; 1×10^5 K562 hücreleri ekildi.

72 saat süre ile ortak kültür sistemine alınan MKH ve K562 hücreleri için aynı deney düzenekleri WST1, CFSE ve ANNEXIN-V/PI analizleri için 6-kuyucuklu plakalarda ayrı ayrı 3'er örnek hazırlandı. Kontrol grubu olarak yalnız K562 hücreleri 6-kuyucuklu plakalarda kültüre alındı.

3.3. 72 Saat Ko-Kültür Sonrasında K562 Hücreleri İçin Canlılık ve Çoğalm Testleri

MKH'lerin K562 hücreleri üzerine anti-proliferatif etkilerini tayin etmek amacıyla WST-1 (Roche) ve CFSE (Invitrogen) hücre çoğalm/canlılık testleri yapıldı.

3.3.1. WST-1 Testi

WST-1 testinde canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz hücresel enzimiyle WST-1 yapısındaki tetrazolyum tuzları formazan kristallerine dönüşmektedir. Canlı hücre sayısındaki artışa bağlı olarak hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz

aktivitesinde de artış olur ve bu da formazan kristallerinin miktarını arttırarak daha koyu renkte ayraç oluşumuna neden olur. Oluşan formazan kristallerinin miktarındaki artış metabolik olarak aktif hücre sayısıyla doğru orantılıdır.

WST-1 için; 6-kuyucuklu plakalardan toplanan K562 hücreleri 15ml'lik falkonlara alınarak 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü, pelet 100 µl hazır besiyeri ile birlikte 96-kuyucuklu plakalara ekildi. Her kuyucuğa 10 µl WST-1 eklendi, ışık almaması için, 96-kuyucuklu plaka folyo ile sarılıp 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 3-4 saat bekletildi. Ardından mikropate okuyucu (VersaMax) kullanılarak 480 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu.

3.3.2. CFSE Testi

Direkt ve indirekt ko-kültür sonrası MKH'lerin K562 hücrelerinin proliferasyonuna etkisini tespit etmek için WST-1 testine ek olarak CFSE testi uygulandı. DMSO ile dilue edilen karboksifloresan diasetat süksinimid ester (CFSE) bir sitoplazmik floresan boyasıdır ve yoğunluğu hücre bölünmesiyle ters orantılı olarak azalmaktadır. Hücre içine yayılan ve başlangıçta renksiz olan boyanın asetat grupları hücre içindeki esterazlara bağlandığında yüksek oranda karboksifloresan süksinimid ester oluşturmakta, oluşan süksinimid ester grupları hücre içi aminleriyle reaksiyona girerek floresan konjugatları oluşturmakta ve 488 nm.de akım sitometre cihazında ölçülmektedir.

CFSE için; 72 saatlik ko-kültürün sonunda, K562 hücreleri pipet ile toplanarak 15ml'lik falkonlara alındı. 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pelet %1 BSA (sığır serum albumin) içeren 1 ml PBS ile resüspanse edildi. Hücrelerin üzerine 5mM stok CFSE solusyonundan 2 µl eklendi, 37 °C'de 10 dk inkübe edildi . 5 ml hazır soğuk besiyeri eklendi , 5 dk +4°C'de bekletildi. 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü, pelet 0,5 ml hazır besiyeri ile resüspanse edildi, akım sitometre cihazında 488 nm dalga boyunda okutuldu.

3.4. 72 Saat Sonrasında K562 Hücreleri İçin Sitotoksisite Analizi

MKH'lerin K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini tayin etmek amacıyla Annexin-V/PI (apoptozis belirleyici kit) (BD Pharmingen) kiti uygulandı. 72 saatlik ko-kültürün sonunda K562 hücreleri 15ml'lik falkonlarda toplanarak 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşturulan hücre peleti üzerine kit içinde hazır bulunan, 0,4 ml bağlanma tamponu eklendi. Üzerine 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl PI (propidyum iyodid) eklendikten sonra 15

dk oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda akım sitometre cihazında analiz edildi.

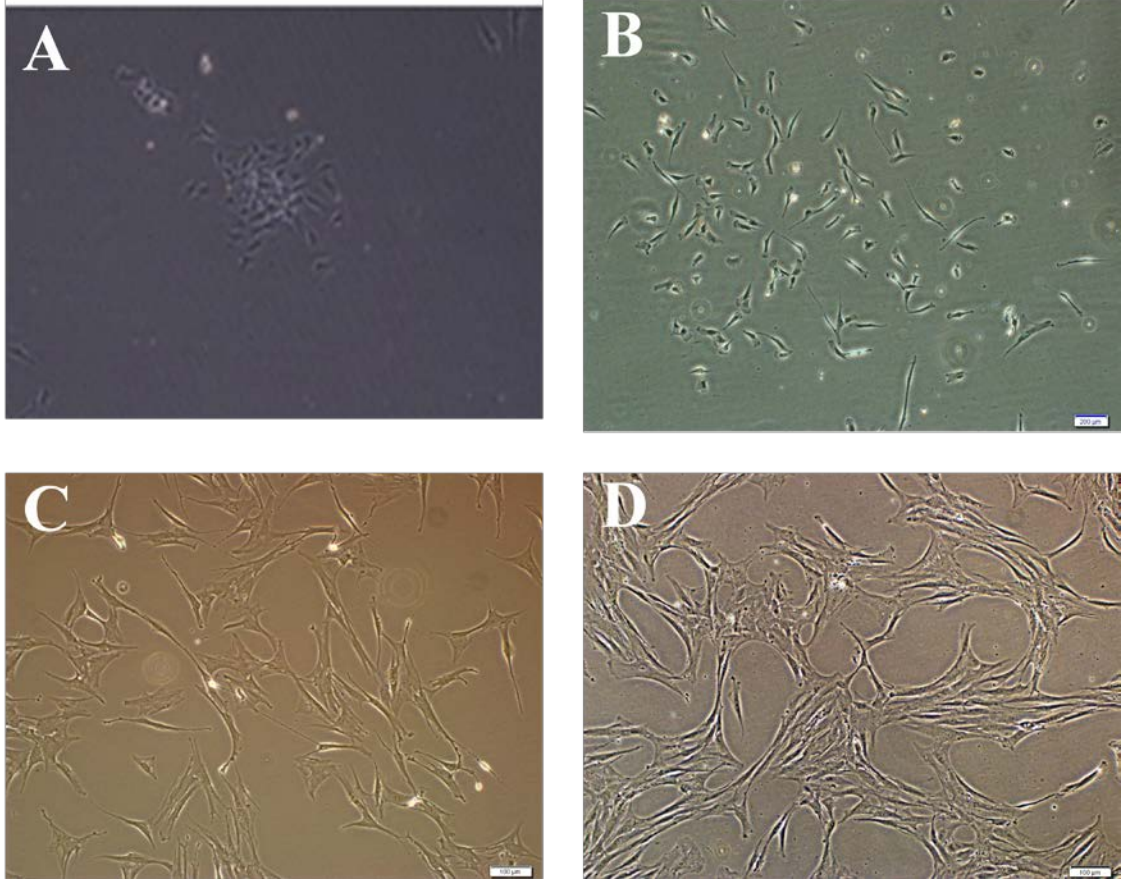
3.5. Direkt Ko-Kültürlerin Zamana Bağlı Görüntülenmesi

Hücre hücre temasının olduğu direkt ko-kültür deney ortamında uyarılmış Kİ-MKH'lerin K562 hücrelerini fagosite edip etmediğini ya da öldürüp öldürmediğini gözlemleyebilmek amacıyla Kİ-MKH'lerini $1 \times 10^5/100\mu\text{l}$ hücre olacak şekilde 35 mm'lik petriye (BD Biosciences) yayarak, bir gün süreyle hücrelerin tabana yapışması için beklendi. 1. günün sonunda petriye Kİ-MKH hücreleri üzerine $1 \times 10^5/100\mu\text{l}$ hücre olacak şekilde K562 hücreleri ekildi ve petri ko-kültür başladıktan 4 saat sonra istenilen sürede zaman aralıklı fotoğraf çekebilen ve bunu akıcı filme dönüştürebilen (time lapse) kameraya sahip olan inverted mikroskoba 24 saat boyunca 2 dakikada bir fotoğraf çekilmek üzere koyuldu.

4. BULGULAR

4.1. Kİ-MKH ve K562 Kültürü

İnsan kemik iliği örneğinden izolasyonu yapılan hücrelerin, kültüre alındıklarında (P0'da), invert mikroskop ile yapılan incelemelerinde fibroblast benzeri, iğsi fenotipte hücrelerin oluşturduğu populasyonlar gözlemlendi.

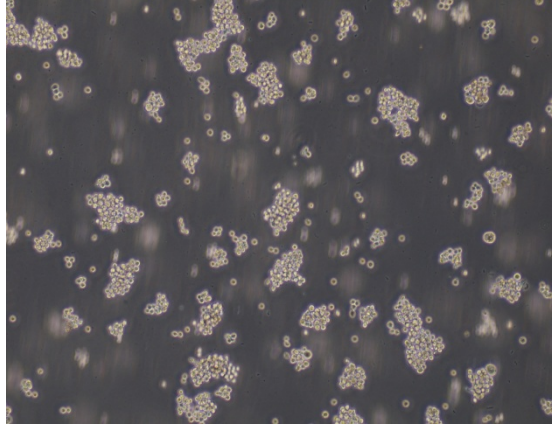


Şekil 4. 1. Kİ-MKH'lerin morfolojik görünüşleri. **A**-P0-3üncü gün, **B**P0-8nci gün, **C**-P2-1inci gün, **D**- P3-8inci güne ait invert mikroskop görüntüleri

İzolasyonun 3üncü gününde mezenkimal davranışı olan koloni oluşumu gözlemlendi. Pasaj ilerledikçe hücreler tipik fibroblastik morfolojilerine ulaştılar. Deney için gerekli hücre sayısına ulaşabilmek için hücreler pasajlandı ve çoğalım potansiyelleri invert mikroskopta gözlemlendi. (Şekil: 4.1. A, B, C, D)

Kültüre alınan K562 hücrelerinin invert mikroskopta yüzeye yapışmadıkları gözlemlendi. Besiyeri değiştirilmesinde, hücreler flasklardan falkon tüplere toplandı,

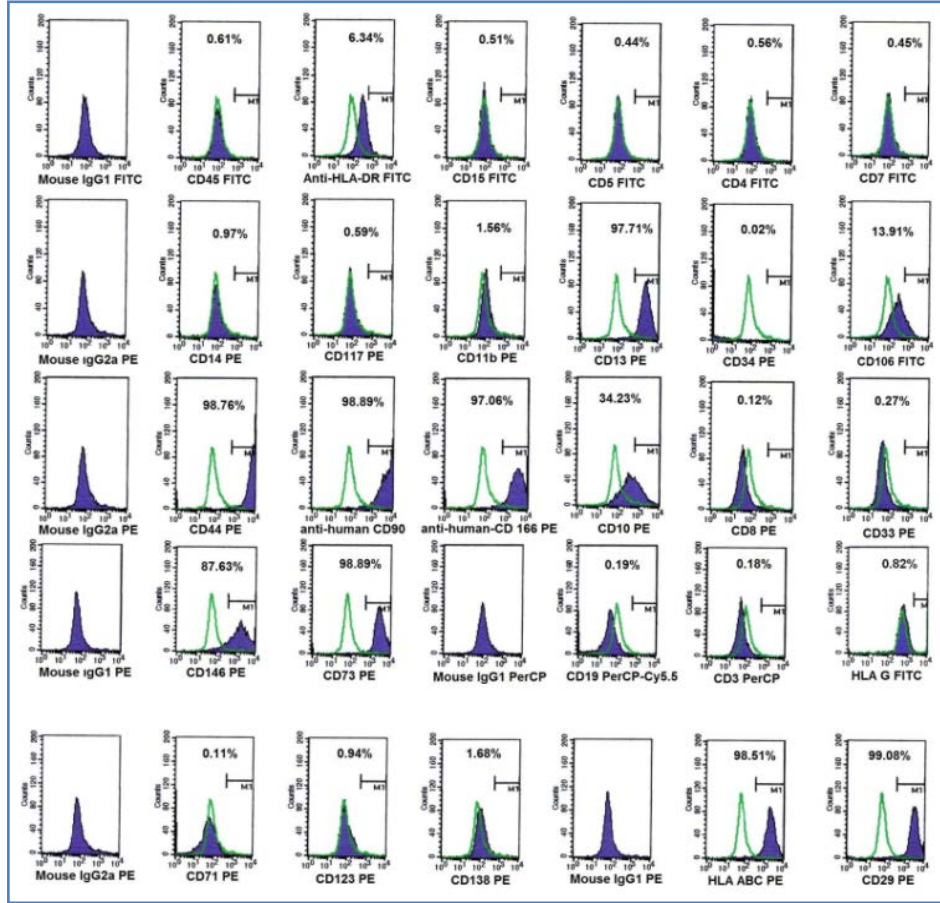
santrifüj ile pelet oluşturuldu ve yeni flaska taze besiyeri ile ekimi gerçekleştirildi. (Şekil 4.2)



Şekil 4. 2. K562 solüsyon hücre kültürünün invert mikroskop görünümü.

4.2. MKH'lerin Akım Sitometri Cihazı İle Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi

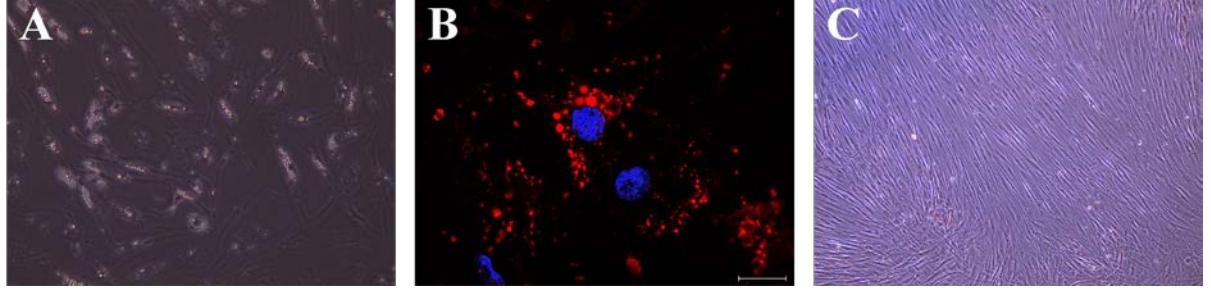
Yapılan akım sitometre analizi sonucunda Kİ-MKH'lerin CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, CD73, CD146 ve HLA ABC gibi MKH belirteçlerini ekspresse ettikleri; CD106, CD11b, CD14, CD15, CD34, CD45, CD71, CD117 ve HLA-G gibi hematopoetik hücre belirteçlerini ekspresse etmedikleri tespit edildi.



Şekil 4. 3. İnsan kemik iliği materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) akım sitometri cihazında saptanan immunofenotipik özellikleri.

4.3. Adipojenik Farklılaşma

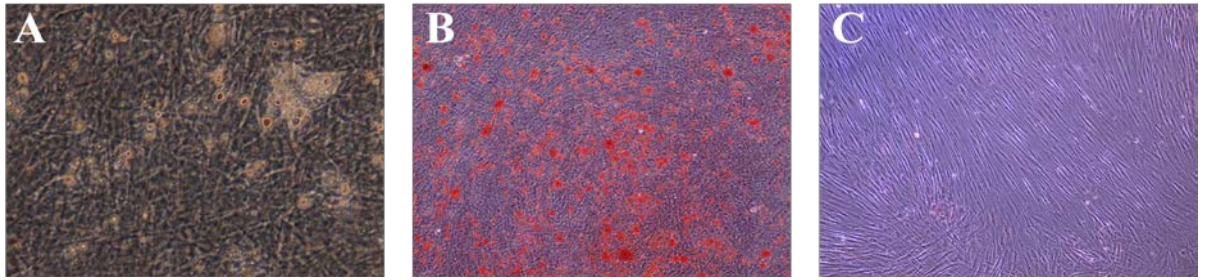
Adipojenik farklılaşma besiyerinde 4 hafta kültüre edilen Kİ-MKH'lerin adiposit benzeri farklılaşma gösterdiği gözlemlendi. Adipojenik farklılaşma besiyeri ile adipojenik farklılaşması uyarılan Kİ MKH'lerin sitoplazmalarında, yağ hücrelerinde gözlenen yağ damlacıkları görüldü (Şekil 4.4 A). 28 günlük kültürün sonunda hücrelerin fiksasyonu yapılarak Oil Red O ile boyandığında, oluşan yağ veziküllerinin Oil Red O boyası ile kırmızı renk verdiği (Şekil 4.4.B), herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan Kİ-MKH'lerin ise adipojenik farklılaşmadığı ve dolayısıyla da Oil Red O boyası ile renk vermediği görüldü (Şekil 4.4.C).



Şekil 4. 4. İnsan kemik iliği materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) adipoz farklılaşmalarının görüntülenmesi. **A-** İnvirt mikroskop görüntüsü ile yağ damlacıklarının gözlenmesi **B-** Adipojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş Kİ-MKH'ler (Oil Red O Boyama). **C-** Kontrol.

4.4. Osteojenik Farklılaşma

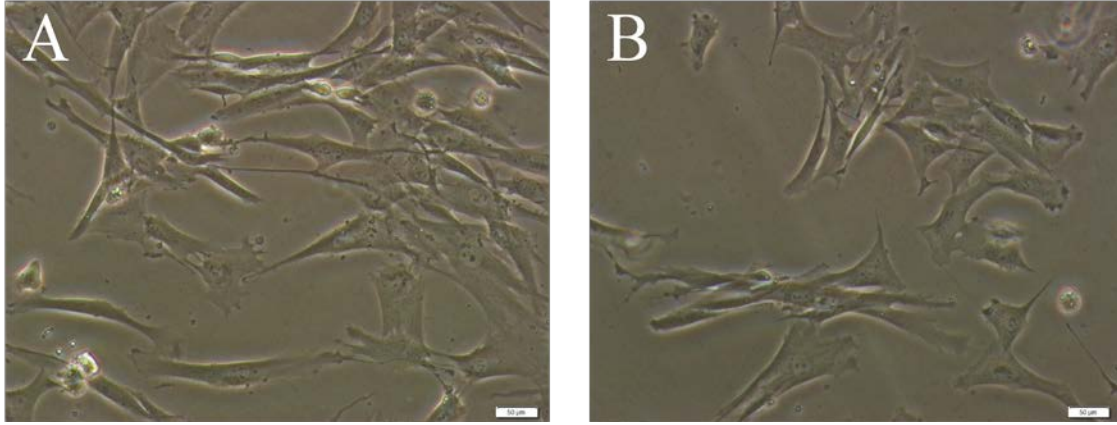
Osteojenik farklılaşma besisi yerinde 4 hafta kültüre edilen Kİ-MKH'lerin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlemlendi. Osteojenik farklılaşma besiyeri ile osteojenik farklılaşması uyarılan Kİ-MKH'lerin kültür ortamlarında kalsiyum fosfat nodüllerinin oluştuğu görüldü (Şekil 4.5. A). 28 günlük kültürün sonunda hücreler sabitlenerek Alizarin Red ile boyandığında, kalsiyum fosfat nodüllerinin Alizarin Red boyasının kemik nodüllerine özgü rengi olan kırmızıya boyandığı saptandı (Şekil 4.5.B), herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan Kİ-MKH'lerin ise osteojenik farklılaşmadığı ve dolayısıyla da Alizarin Red boyası ile renk vermediği görüldü (Şekil 4.5.C).



Şekil 4. 5. İnsan kemik iliği materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) osteojenik farklılaşmalarının görüntülenmesi. **A-** İnvirt mikroskop görüntüsü ile kalsiyum fosfat nodüllerinin gözlenmesi **B-** Osteojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş Kİ-MKH'ler (Alizarin Red Boyama). **C-** Kontrol.

4.5. MKH'lerin IL-2 ile Uyarılması

Karakterizasyonu tamamlanmış MKH'ler, K562 hücreleri ile ortak kültür (ko-kültür) sistemine alınmadan önce apoptotik sinyal yollarını aktifleştirmek için IL-2 solusyonu ile 72 saat boyunca kültüre edildiler. IL-2 ile uyarılma işleminin Kİ-MKH'lerini morfolojik olarak değişikliğe uğratmadığı invert mikroskop ile gözlemlendi. (Şekil 4.6)

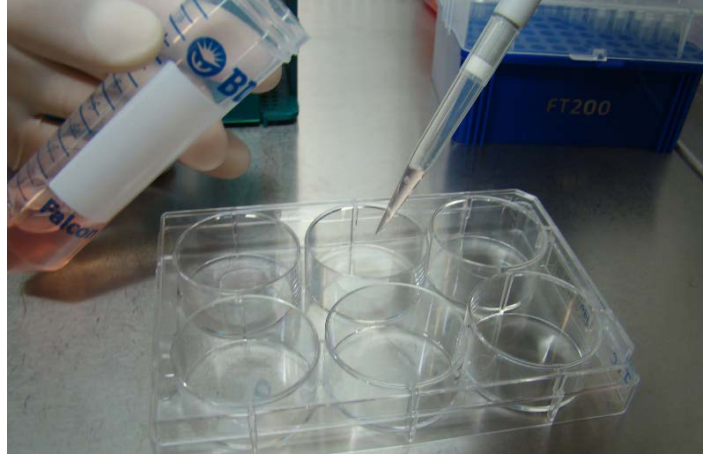


Şekil 4. 6. İnsan kemik iliği materyalinden izole edilmiş MKH'lerin 72 saat IL-2 uyarılmalarının ardından morfolojik olarak incelenmeleri. **A-** Uyarılmış Kİ-MKH, **B-**Uyarılmamış Kİ-MKH

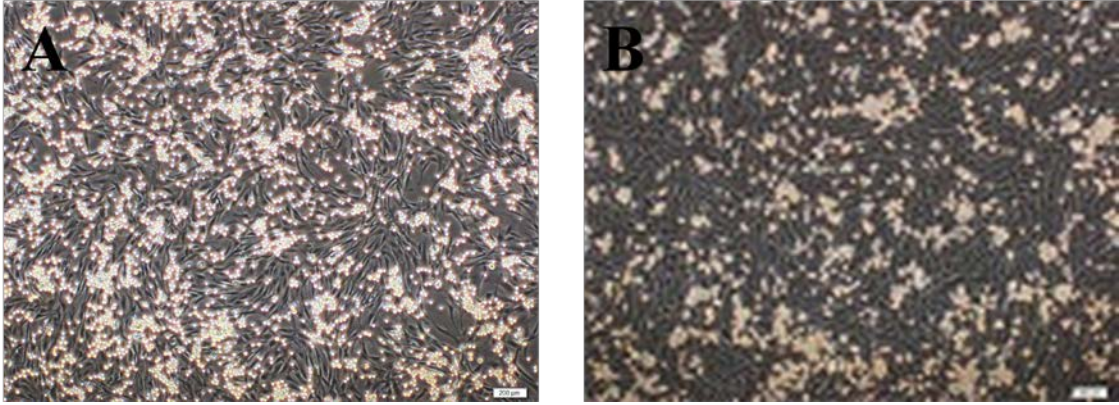
4.6. Kİ-MKH'lerin K562 Hücreleri ile Direkt Ve İndirekt Ko-Kültürü

Direkt ve indirekt ko-kültür sisteminde, 6-kuyucuklu plakalara 1×10^5 MKH'ler ekildi. Hücrelerin yüzeye yapışmaları için 8 saat %5 CO₂, 37°C inkübatörde bekletildi. Her deney için 3 ayrı 6-kuyucuklu plakalar oluşturuldu. (Şekil 4.7)

Direkt ko-kültür sisteminde, uyarılmamış ve uyarma amacıyla 6 kuyucuklu plakalara 24 saat önceden ekilen Kİ-MKH'lerin üzerine 1×10^5 K562 hücreleri ekildi ve üzerlerine 3 ml hazır besiyeri eklendi. Oluşturulan plakalar, WST1, CFSE, ANNEXIN-V/PI deneylerinin uygulanacağı zamana kadar 72 saat süre ile %5 CO₂, 37°C inkübatörde bekletildi.



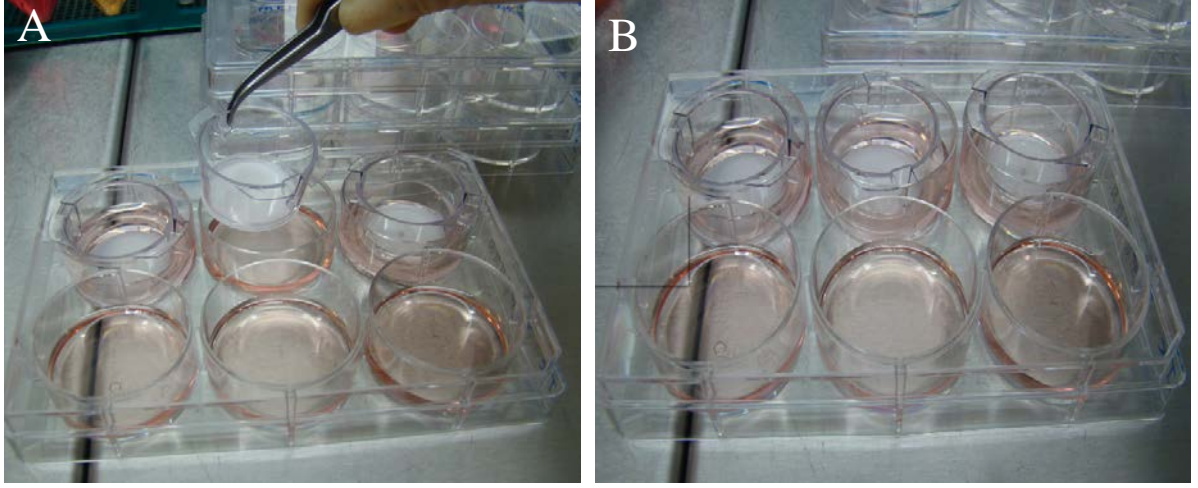
Şekil 4.7. Kİ-MKH'lerin 6-kuyucuklu plakalara ekimi.



Şekil 4.8. Direkt ko-kültür sisteminde Kİ-MKH ile K562 hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü. (A-Uyarılmış, B-Uyarılmamış Kİ-MKH)

İndirekt ko-kültür sisteminde, uyarılmamış ve uyarma amacıyla 6-kuyucuklu plakalara önceden ekilmiş olan Kİ-MKH'ler üzerine, hücrelerin birbirileri ile doğrudan temasını engellemeye kullanılan 0,4 µm por çapında ara bölmeler (insert) dikkatli bir şekilde yerleştirildi. (Şekil 4.8-A) Ara bölmelerin üzerine 1:1 oranında K562 hücreleri ekildi. (Şekil 4.8-B)

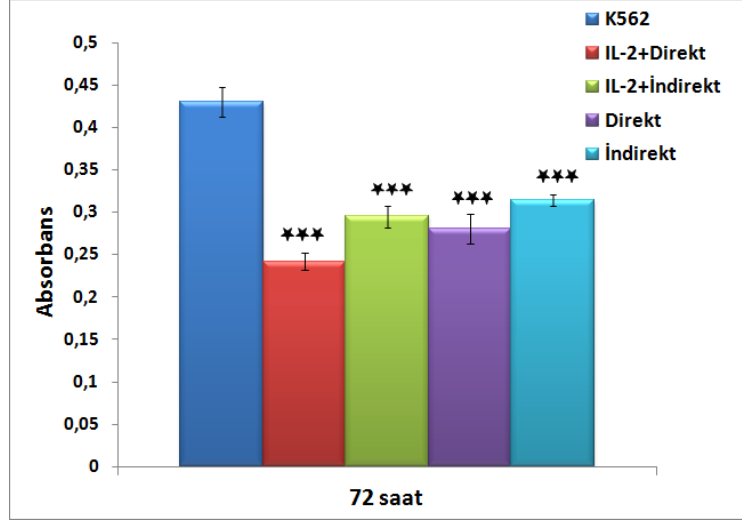
İndirekt ko-kültür sisteminde, uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'lerin üzerine ara bölmeler yerleştirildi, 1×10^5 K562 hücreleri ekildi ve üzerlerine 3 ml hazır besiyeri eklendi. Oluşturulan plakalar, WST1, CFSE, ANNEXIN-V/PI deneylerinin uygulanacağı zamana kadar 72 saat süre ile %5 CO₂, 37°C inkübatörde bekletildi.



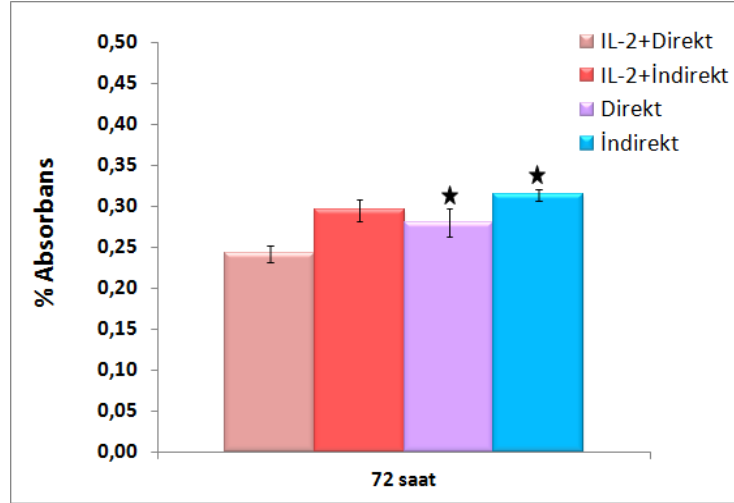
Şekil 4.9. A- Kİ-MKH'lerin 6-kuyucuklu plakalara ekiminin ardından ara bölmelerin yerleştirilmesi. B- Ara bölmelerin üzerine K562 hücrelerinin ekilmesi.

4.7. 72 Saat Ko-Kültür Sonrasında K562 Hücreleri İçin Canlılık Ve Çoğalm Testleri

Kİ-MKH'lerin, K562 hücrelerinin proliferasyonları üzerinde baskılayıcı özelliklerinin olup olmadığını anlamak amacıyla WST-1 testi uygulandı. 72 saat boyunca ortak kültür sisteminde Kİ-MKH'ler ile kültüre alınan K562 hücrelerinin proliferasyonlarının uyarılmamış ve IL-2 ile uyarılmış Kİ-MKH'ler tarafından baskılandığı WST-1 testi ile belirlendi (Şekil 4.9). IL-2 uyarımı Kİ-MKH'lerin her iki kültür sisteminde de anti-proliferatif özelliklerini arttırırken, direkt ko-kültüre alınan K562 hücrelerinin, indirekt ko-kültüre alınan hücrelere kıyasla çoğalmalarının daha fazla baskılandığı görüldü (Şekil 4.10). WST-1 sonuçları SPSS programında one way ANOVA testi ile değerlendirildiğinde; direkt ve indirekt ko-kültürlerde uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'lerin K562 hücrelerinin proliferasyonlarını baskıladığı tespit edildi.



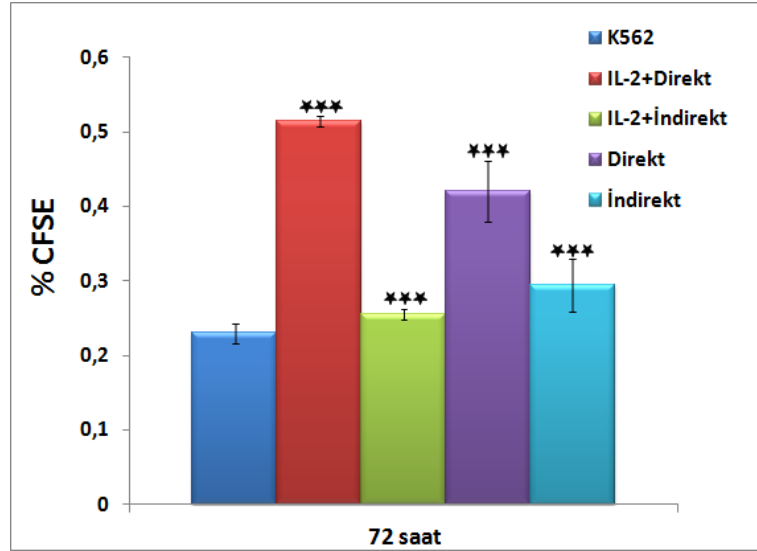
Şekil 4.10. K562 hücrelerinin Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda WST-1 testi ile proliferasyon potansiyellerinin belirlenmesi (**p<0,001).



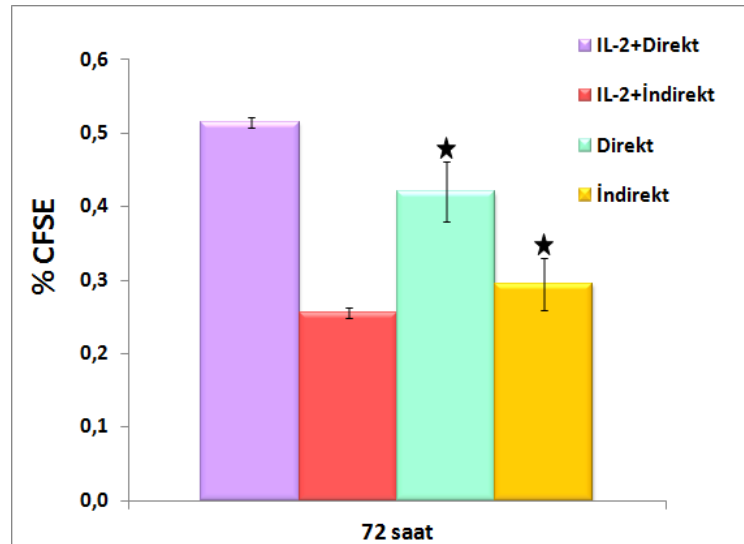
Şekil 4.11. K562 hücrelerinin uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda WST-1 testi ile proliferasyon potansiyellerinin karşılaştırılması (*p<0,05).

Kİ-MKH'lerin anti-proliferatif etkilerini belirlemek amacıyla WST-1 testine ek olarak başka bir canlılık/çoğalmı belirteci olan CFSE testi uygulandı. 72 saat boyunca ortak kültür sisteminde Kİ-MKH'ler ile kültüre alınan K562 hücrelerinin proliferasyonlarının uyarılmamış ve IL-2 ile uyarılmış Kİ-MKH'ler tarafından baskılandığı CFSE testi ile de belirlendi (Şekil 4.11). WST-1 testi sonuçlarında olduğu gibi, MKH'ler tarafından K562 hücrelerinin çoğalmaları baskılanırken, IL-2 uyarımının MKH'lerin anti-proliferatif etkisini

arttırmış olduğu sonucu çıkarıldı (Şekil 4.12). CFSE sonuçları SPSS programında one way ANOVA testi ile değerlendirildiğinde; K562 hücrelerinin uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'ler ile direkt ve indirekt ko-kültürleri sonucunda proliferasyonlarının baskılandığı tespit edildi.



Şekil 4.12. K562 hücrelerinin Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda CFSE testi ile proliferasyon potansiyellerinin belirlenmesi (***) $p < 0,001$).



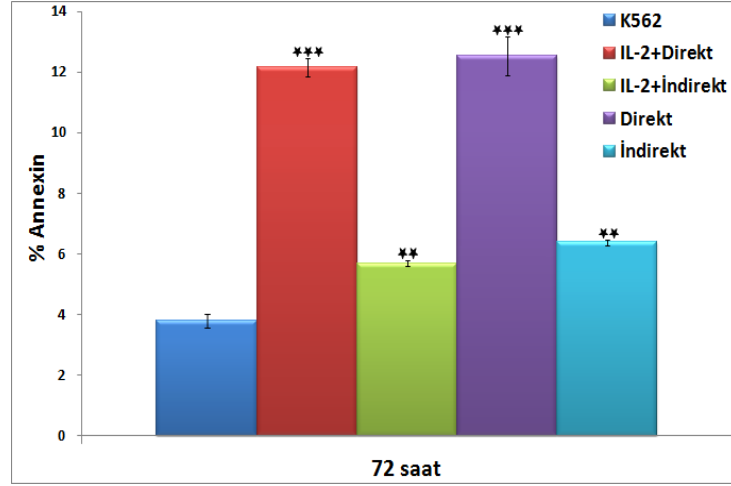
Şekil 4.13. K562 hücrelerinin uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda CFSE testi ile proliferasyon potansiyellerinin karşılaştırılması (* $p < 0,05$).

Sonuç olarak hem WST-1 hem de CFSE testi ile Kİ-MKH'lerin K562 hücreleri üzerine anti-proliferatif etki gösterdiği tespit edildi.

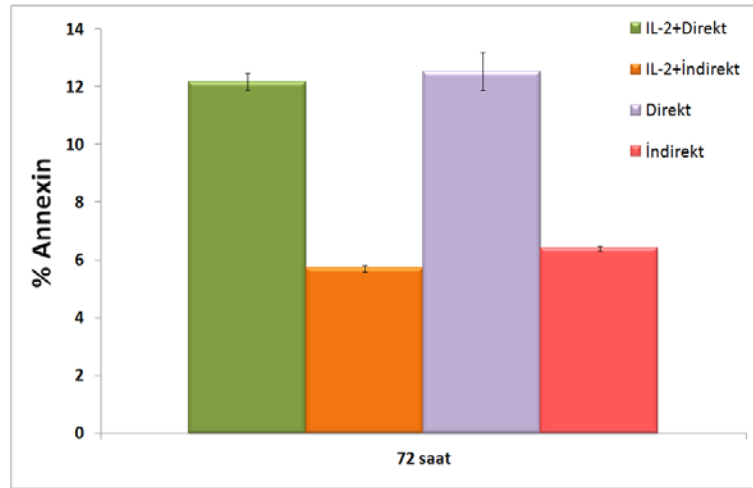
4.8. 72 Saat Sonrasında K562 Hücreleri İçin Apoptoz Analizi

Kİ-MKH'lerin, K562 hücrelerinin üzerinde apoptotik özelliklerinin olup olmadığını anlamak amacıyla Annexin-V/PI testi uygulandı. 72 saat boyunca ortak kültür sisteminde Kİ-MKH'ler ile kültüre alınan K562 hücrelerinin apoptoz yüzdelerinin Kİ-MKH'ler tarafından artırıldığı Annexin-V/PI testi ile belirlendi (Şekil 4.13). Her iki kültür sisteminde IL-2 uyarımının, Kİ-MKH'lerin apoptotik etkilerini değiştirmedığı, direkt ko-kültüre alınan K562 hücrelerinin, indirekt ko-kültüre alınan hücelere oranla apoptoz yüzdelerinin 3 kat fazla olduğu görüldü (Şekil 4.14). Annexin-V/PI sonuçları SPSS programında one way ANOVA testi ile değerlendirildiğinde; direkt ve indirekt ko-kültürlerde uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'lerinin K562 hücreleri üzerinde apoptotik etki gösterdiği tespit edildi.

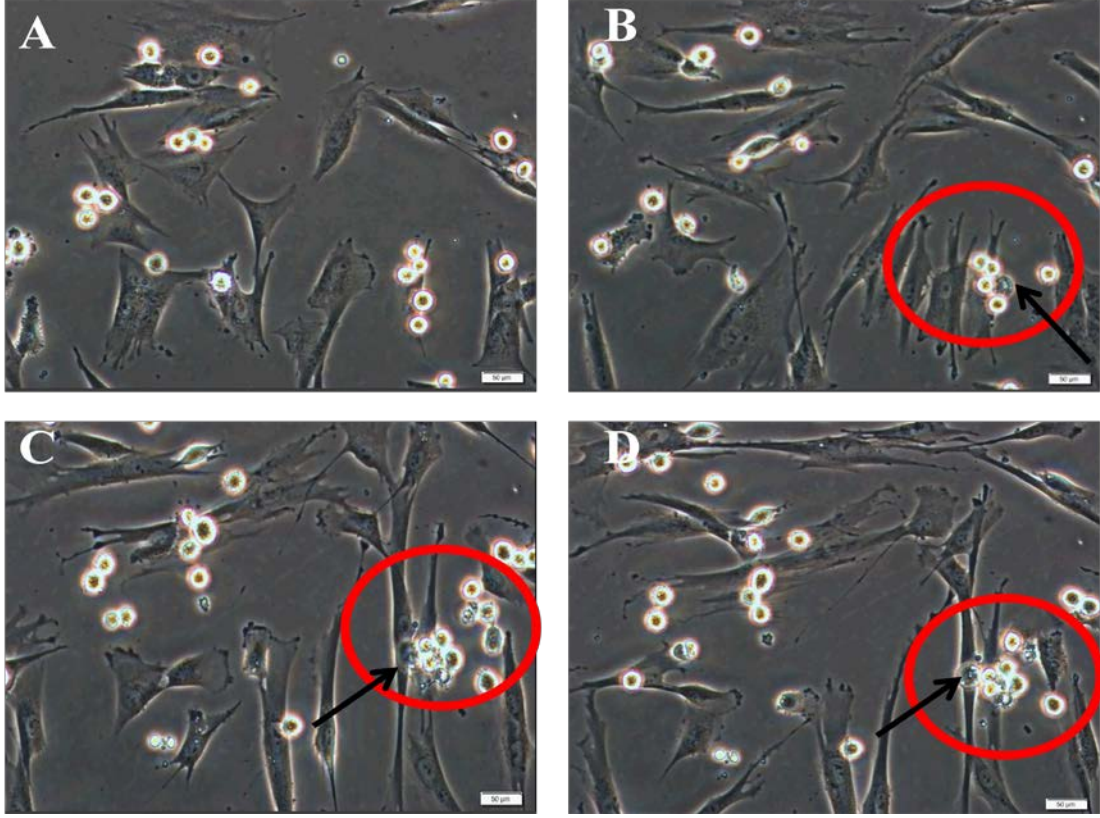
Ayrıca, hücre hücre temasının olduğu direkt ko-kültür deney ortamında uyarılmış Kİ-MKH'lerin K562 hücrelerini fagosite edip etmediğini yada öldürüp öldürmediğini gözlemleyebilmek amacıyla Kİ-MKH'lerini 35 mm'lik petride istenilen sürede zaman aralıklı fotoğraf çekebilen ve bunu video filmine dönüştürebilen (time lapse) kameraya sahip olan invert mikroskoba 24 saat boyunca 2 dakikada bir fotoğraf çekilmek üzere koyuldu. Fotoğrafların arka arkaya eklenmesi ile oluşturulan video izlendiğinde, Kİ-MKH'lerin yaklaşık olarak 4. saatten itibaren K562 hücrelerinden bazılarının canlı görünümünü (parlak) azalttığı, hayalet hücelere dönüştürdüğü yani apoptoza götürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.15 A, B, C, D).



Şekil 4.14. K562 hücrelerinin KI-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda Annexin-V/PI testi ile apoptoz yüzdelerinin belirlenmesi (***p<0,001, ** p<0,01).



Şekil 4.15. K562 hücrelerinin uyarılmış ve uyarılmamış KI-MKH'ler ile 72 saatlik ko-kültür sonunda Annexin-V/PI testi ile apoptoz yüzdelerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.16. KI-MKH'ler ile direkt ko-kültüre alınan K562 hücrelerinin invert mikroskop ile çekilmiş videolarından elde edilen fotoğraflar. **A-** 1. Saat, **B-** 4. Saat, **C-** 23. Saat ve **D-** 24. Saat'e ait görüntüleri (ok: hayalet hücreye dönüşen K562 hücreleri)

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan kök hücre çalışmalarında yeni ilaçların testi için geliştirilen ve uygulanan hücre kültürü tekniklerinin, organizma içindeki dokularda bulunan hücrelerin bulunduğu koşulları göstermekte yetersiz kalmaktadır. Çünkü organizmada bulunan hücreler, hücre-hücre etkileşimi, otokrin ve parakrin sinyaller ve 3 boyutlu hücreler arası matriks gibi çeşitli mikroçevre koşullarından etkilenmektedir. Farklı *in-vitro* ve *in-vivo* deney modelleri bu karmaşık ilişkilerin modellenmesinde kullanılmaktadır (Rizvanov 2010).

Kanser hücrelerinin, somatik hücreler veya kök hücreler ile ilişkilerini göstermek için geliştirilen sistemler; tümör başlangıcı, gelişimi ve ilaçlara olan dirençleri altında yatan mekanizmaları anlayabilmemizi sağlamaktadır (Rizvanov 2010).

Son yıllarda kök hücreler ile kanser hücreleri arasındaki ilişkileri açıklayabilmek için ortak kültüre alımlarını sağlayan farklı deney sistemleri tasarlanmış ve bu konuda pek çok çalışma yayınlanmıştır. Güncel gelişmeleri takiben bu tez çalışmasında *in-vitro* ortamda mezenkimal kök hücrelerin kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve apoptotik etkilerini göstermek için ko-kültür deney sistemi tasarlandı. Bu amaçla çalışmamızda *in-vitro* koşullarda IL-2 ile uyarılmış ve uyarılmamış Kİ-MKH'lerin K562 hücreleri üzerine anti-proliferatif ve sitotoksik (apoptotik) etkilerini direkt ve indirekt ko-kültür sistemlerinde tespit etmesi hedeflendi. Yaptığımız tez çalışması daha önce yayınlanmamış, literatürde ilk kez yer alacak çalışmadır.

Çalışmamızda kemik iliği materyalinden izole edilen MKH'ler karakterizasyon amacıyla ilk basamakta akım sitometre cihazı ile yüzey belirteçleri bakımından tayin edilmiştir. Buna göre MKH'ler CD29, CD44, CD90 gibi MKH belirteçlerini eksprese ederken, CD33, CD34, CD45 gibi kan hücrelerine ait belirteçleri ifade etmemekte ve antijenik özellikleri ile MKH karakterine sahip olduklarını göstermektedir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi kültürdeki morfolojik özelliklerinin de MKH'lere benzemesi, ayrıca yağ ve kemik hücrelerine farklılaşmaları bu hücrelerin MKH olduklarını göstermektedir (Karaöz et al. 2009, Karaöz et al. 2010).

Karakterizasyonu tamamlanmış MKH'ler ile K562 (insan kronik miyeloid lösemi hücre hattı) hücreleri, ortak kültür sisteminde 72 saat süre ile direkt ve indirekt koşullarda

kültüre edildiler. Kİ-MKH'lerin, K562 hücreleri üzerine anti-proliferatif ve apoptotik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan analizlerin sonuçları, Kİ-MKH'lerin K562 hücrelerinin proliferasyonlarını baskıladığı ve hücreleri apoptoza götürdüğünü ortaya koydu.

Çalışmamızda MKH'lerin, anti-proliferatif etkisini belirlemek amacıyla yapılan WST-1 ve CFSE sonuçlarına göre; Kİ-MKH'lerin, IL-2 ile uyarıldığında ve direkt ko-kültür şartlarında bulunduğunda K562 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin yaklaşık olarak 3 kat arttığı belirlendi. Anti-proliferatif etkide direkt ko-kültürün indirekt ko-kültüre oranla daha etkili olmasında, hücre-hücre temasının gerekli olduğu düşünülebilir. Li ve ekibi (2010) yaptıkları çalışmada Kİ-MKH'ler ile A549 (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) hücre hattını koşullandırılmış besiyeri ile indirekt ortak kültür sistemine almışlar, A549 hücrelerinin proliferasyonlarının Kİ-MKH'ler tarafından inhibe edildiğini rapor etmiştir. Bu inhibisyon mekanizmasını da Kİ-MKH'ler tarafından salgılanan sitokinler ve çözünebilir faktörler aracılığı ile olduğunu vurgulamıştır.

Wei ve ekibi (2009) tarafından yapılan başka bir çalışma da ise lösemili kemik iliğinden elde edilen MKH'ler, K562 hücreleri ile besiyeri serum içeriği bakımından farklılık gösteren ortak kültür sistemlerine alınmış ve lösemili Kİ-MKH'lerin direkt ko-kültür sisteminde daha fazla anti-proliferatif etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bizim sonuçlarımız da in-vitro çalışmalarla uyumludur.

MKH'lerin, kanser hücrelerinin çoğalmalarını baskıladığı yönünde ki başka bir diğer çalışmada Ohlsson ve ekibi (2003) tarafından sıçan kolon kanser hücrelerinin MKH'ler ile birlikte enjekte edilmesiyle oluşturulan *in-vivo* tümör modelinde ise MKH'ler ile birlikte enjekte edilen kanser hücrelerinin oluşturduğu tümör dokusunun daha küçük olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada, MKH'ler ile birlikte enjekte edildiğinde oluşturulan tümör dokusunda makrofaj ve granülosit sayısı daha yüksek oranda bulunmuş, bunun da MKH'lerin proinflamatuvar özelliklerinden kaynaklandığını düşündürmüştür. Dolayısıyla, sonuçlarımız in-vivo çalışmalar ile de uyumludur.

Çalışmamızda, MKH'lerin IL-2 uyarımıyla anti-proliferatif etkilerinde artış olduğunu WST-1 ve CFSE testleri ile tespit ettik. Aynı şekilde Kang ve ekibi de (2008) yapmış oldukları bir çalışmada, kordon kanından elde ettikleri MKH'leri IL-2 ile uyardıkları zaman U87MG (insan glioblastom hücre hattı) hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkilerinde artış olduğunu bildirmiş, uyarılmamışa kıyasla uyarılmış MKH'ler tarafından salınan immün

yanıt ile ilgili proteinlerde (IL-4 ve INF- γ) artış olduğunu göstermiştir ve çalışmamızla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

MKH'lerin anti-proliferatif etkilerinin yanında sitotoksik (apoptotik) özelliklerini de belirlemek amacıyla, Annexin-V/PI testi ile elde ettiğimiz sonuçlarda, IL-2 uyarımının MKH'lerin sitotoksik özelliklerini değiştirmedğini, ancak direkt ko-kültürlerde (uyarılmış ve uyarılmamış) indirek ko-kültüre kıyasla K562 hücreleri üzerindeki apoptotik etkinin 3 kat fazla olduğunu tespit ettik.

Kang ve ekibi 'nin (2008) yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri bulgular, IL-2 uyarımının kordon kanından elde edilen MKH'lerin sitotoksik etkilerini arttırdığı yönündedir. Bu çalışmayla karşılaştırdığımızda çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların farklı olmasının ise; kullanılan MKH'lerin farklı kaynaklardan izole edilmiş olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Tez kapsamında yapılan çalışmamızın sonuçları Kİ-MKH'lerin K562 hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu konuda yapılan çalışmalara baktığımızda, MKH'lerin kanser hücreleri üzerinde gelişimlerini baskılayıcı ya da sitotoksik etki gösterdiğini rapor eden çalışmaların (Kang et al., 2008; Li et al., 2010; Wei et al., 2009; Ohlsson et al., 2003) yanı sıra MKH'lerin tümör gelişimini desteklediğini öne süren çalışmalarda mevcuttur (Karnoub et al., 2007; Zhu et al., 2006; Muehlberg et al., 2009; Yu et al. 2008).

Bu çalışmaları da biraz daha ayrıntılı inceleyecek olursak; Karnoub ve ekibinin (2007) yaptıkları çalışmada insan Kİ-MKH'ler ile meme kanseri hücrelerini birlikte farelere enjekte ettiklerinde; MKH'lerin tümör gelişimini hızlandırdığını ve meme kanser metastazını arttırdığını rapor etmişlerdir. MKH'ler tarafından salınan kemokinlerin (CCL5) meme kanseri hücreleri üzerinde prometastatik etki gösterdiğini vurgulamışlardır. Buna ek olarak, meme kanser hücrelerinin MKH'ler ile birlikte farelere enjeksiyonu; akciğer kanseri gelişiminde 2-7 kat artış olduğunu kanıtlamışlardır. Ayrıca; benzer prometastatik etkinin, MKH'lerin kanser hücrelerinden daha uzak bölgeye enjeksiyonu yapıldığında gözlemlenmemesinden dolayı, prometastatik transformasyon için direkt kontakt olması veya parakrin faktörlerin salgılanması gerektiğini düşünmüşlerdir.

Djouad ve ekibinin (2003) yayınladıkları çalışmada B16 melanoma hücreleri yalnızca MKH'ler ile birlikte farelere enjekte edildiklerinde tümör oluştuğunu gözlemlemişler. Bu

bulgunun sebebini ise MKH'lerin immünsüpresif etkisi ile açıklanabileceğini öne sürmüşlerdir.

Muehlberg ve ekibi (2009) yağ dokusu MKH'lerini, singeneik fare modelinde, meme kanseri hücreleri ile birlikte enjekte ettiklerinde daha büyük ve daha hızlı gelişen tümörlerin varlığını kanıtlamışlardır. Yağ dokusu MKH'leri ayrıca akciğer ve glioma kanser hücreleri ile birlikte fareye verildiklerinde de benzer sonuçlarla karşılaşılmıştır (Yu et al., 2008), MKH'ler ile aynı anda verilen kanser hücrelerinden oluşan tümörler belirgin bir şekilde daha büyük ve daha fazla sayıda canlı kanser hücresi içerdiği tespit edilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda ise MKH'lerin malin transformasyon ile yeni tümörler oluşturabileceği rapor edilmiş fakat daha sonra MKH'lerin laboratuvarlarında başka projelerde kullanılan kanser hücreleri ile kontamine olduğunu bulmuşlardır (Garcia et al., 2010; Rubio et al., 2005).

Yapılan çalışmalarla çelişkili sonuçların çıkmasının altında yatan nedenlerden birisi, kullanılan MKH'lerin farklı kaynaklardan izole edilmesi olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca u çalışmalarda kullanılan in-vitro kültür ortamı; özellikle, serumlu kültür ortamları ve içeriği belirlenmiş serumsuz kültür ortamları olmak üzere başlıca iki farklı tiptedir. İn-vitro kültür sistemi bir bütün olarak düşünüldüğünde daha küçük pek çok farklılıklar da içermektedir. Yine önemli ve belirgin bir farklılık ise in-vivo hayvan deneylerinde oluşturulan hastalık modelleri arasında da farklılıklar olduğu gözlenmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmamız, Kİ-MKH'lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve IL-2 uyarımıyla K562 hücreleri üzerinde direkt ve indirekt ko-kültür sistemlerinde anti-proliferatif ve sitotoksik etkilerinin incelenmesi çalışmalarını kapsamaktadır. Yapılan *in-vitro* deneyler sonucunda MKH'lerin, kanser hücrelerinin proliferasyonlarını azalttığı ve sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Lösemi tedavisindeki asıl hedef, kanser hücre çoğalmasını baskılayabilmektir (Wei et al., 2009). Deneylemiz sonucunda IL-2 uyarımının MKH'lerin anti-proliferatif etkilerini arttırmasının tespit edilmesi, lösemi tedavisinde geliştirilebilecek yeni tedavi stratejileri için ipucu teşkil edebilir. Bunun için *in-vitro* çalışmalar devam etmeli ve bu etkilerin moleküler yolları ortaya koyulmaya çalışılmalıdır.

Tez çalışmamız kapsamında bir sonraki amacımız, belirlenen anti-proliferatif ve sitotoksik etkinin mekanizmasını anlayabilmek olacaktır. MKH'lerin, K562 hücreleri ile karşılaştığında hangi sitokinlerin ekspresyonlarında farklılıklar olduğu ortaya koyulmalı ve bunların etkileri belirlenmeye çalışılmalıdır. Tüm bu *in-vitro* çalışmalarda içeriği belirlenmiş serumsuz kültür sistemlerinin kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bulgularımızda direkt ko-kültürde ki MKH'lerin indirekt ko-kültüre kıyasla daha fazla anti-proliferatif etki göstermesi hücre-hücre temasının olması gerekliliğini düşündürmektedir. Bu kapsamda, direkt ko-kültürde hücrelerin birbirleri ile temasları sırasında MKH'ler tarafından salınan çözülebilir faktörlerin yanında hücreler arası oluşturulan bağlantılar aracılığıyla madde geçişi olabileceğini düşünmekteyiz. Direkt ko-kültür sırasında hücre temasında etkili olabilecek mekanizmalar da detaylı olarak incelenmelidir.

Ayrıca yaptığımız *in-vitro* deneylere ek olarak, sıçanlar üzerinde *in-vivo* tümör oluşturma modelleri kullanılarak Kİ-MKH'lerin *in-vivo*'daki etkileri ayrıntılı bir şekilde incelenmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Altman J. and Das GD. (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain: *Nature* , 207:953–956.
- Ankrum J, Karp JM. (2010) Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step Back: *Trends Mol Med*. May;16(5):203-9.
- Barry FP, Murphy JM. (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization: *Int J Biochem Cell Biol*. Apr;36(4):568-84.
- Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E. (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells: *Nature* 197 (4866): 452–4.
- Bianco, P., Robey P.G., Simmons P.J. (2008) Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays: *Cell Stem Cell* 2, 313–319
- Bonnet D, Dick JE. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell: *Nat Med*. Jul;3(7):730-7.
- Brooke G, Cook M, Blair C et al. (2007) Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: *Semin Cell Dev Biol*;18:846–858.
- Cibelli JB, Lanza RP, West MD, Ezzell C. (2002) The first human cloned embryo: *Sci AmJan*;286(1):44-51.
- Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, Touil I, André M, Grolleau JL, Péron JM, Chavoin JP, Bourin P, Pénicaud L, Casteilla L, Buscaïl L, Cordelier P. (2009) Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One*. Jul 17;4(7):e6278.
- Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. (2004) Use and application of stem cells in toxicology: *Toxicol Sci*. Jun;79(2):214-23.
- De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. (2007) Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy: *Nat Biotechnol*. Jan;25(1):100-6.
- Dexter T. M., T. D. Allen, and L. G. (1977) Lajtha, Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro: *Journal of Cellular Physiology*, vol. 91, no. 3, pp. 335–344,
- Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102(10):3837-44.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ. (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood: *Br J Haematol* 109: 235–42.
- Galie M, Konstantinidou G, Peroni D, Scambi I, Marchini C, Lisi V, Krampera M, Magnani P, Merigo F, Montani M, Boschi F, Marzola P, Orrù R, Farace P, Sbarbati A, Amici A. (2008) Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. *Oncogene*;27:2542–2551.
- Garcia S, Bernad A, Martin MC et al. Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2010;316:1648–1650.
- Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D., Friedman H.S., Douglas G.W., Devergie A., Esperou H., Thierry D., Socie G., Lehn P., et al. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's

anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling: *The New England Journal of Medicine* 26;321(17):1174-8.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo: *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:13625-630.

Haznedaroğlu İC. Türk Hematoloji Derneği, Moleküler Hematoloji Kursu.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. (2005) International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*; 7(5):393-5.

In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-vander Keur C. (2003) Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation: *Blood*. 102: 1548-49.

In't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. (2003) Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential: *Haematologica*. 88(8): 845-52.

Jeon ES, Lee IH, Heo SC, Shin SH, Choi YJ, Park JH, Park do Y, Kim JH. (2010) Mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis in a murine xenograft model of A549 human adenocarcinoma through an LPA1 receptor-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. Nov;1801(11):1205-13.

Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. (2004) Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis: *Arthritis Rheum*. 50(3): 817-27.

Kang SG, Jeun SS, Lim JY, Kim SM, Yang YS, Oh WI, Huh PW, Park CK. (2008) Cytotoxicity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against human malignant glioma cells. *Childs Nerv Syst*. Mar;24(3):293-302.

Karaoz E, Akpınar B. (2013) Filling the Gap in the Relationship Between Cancer and Stem Cells. K. Turksen (ed.), *Stem Cells: Current Challenges and New Directions*, *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine* 33, DOI 10.1007/978-1-4614-8066-2_11. © Springer Science+Business Media New York.

Karaoz E, Patir A, Sariboyaci AE, Okcu A, Kokturk S, Gacar G, Demircan PÇ, Kasap M, Seymen F. (2008) Characterization and Differentiation of Dental Pulp and PDL Stem Cells. Continental European Division (CED) of the International Association for Dental Research (IADR) for 4th Meeting of the Pan European Federation in London, England. p228.

Karaoz E., Aksoy A., Ayhan S., Sariboyaci A.E., Kaymaz F., Kasap M. (2009) Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.*, 132(5):533-546.

Karaoz E., Doğan B.N., Aksoy A., Gacar G., Akyüz S., Ayhan S., Genç Z.S., Yürüker S., Duruksu G., Demircan P.C., Sariboyaci A.E. (2010) Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.*, 133(1):95-112.

Karaoz E., Ovalı E. (2004) Kök Hücreler, 1-15. Türkiye:Derya Kitapevi.

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP et al. (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis: *Nature*;449: 557–563.

Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. (2004) Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy: *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; 95(5):209-14.

Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL et al. (2009) Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging: *Stem Cells*;27: 2614–2623.

- Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F (2011) Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth: *Stem Cells*. Jan;29(1):11-9.
- Kochar, P.G. (2004) What are stem Cells [online]. Cambridge Information Group, Proquest. <http://www.csa.com/discoveryguides/stemcell/overview.php> (Ulaşım: 11 Mayıs 2013).
- Konopleva M, Konoplev S, Hu W et al. (2002) Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*;16:1713–1724.
- Kozanoglu I, Boga C, Ozdogu H et al. (2009) Human bone marrow mesenchymal cells express NG2: possible increase in discriminative ability of flow cytometry during mesenchymal stromal cell identification. *Cytotherapy*;11:527–533.
- Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M et al. (2007) Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy: *Cancer Res*;67:6304–6313.
- Li L, Tian H, Chen Z, Yue W, Li S, et al. (2010) Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells: *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43: 143–148.
- Lin G, Yang R, Banie L, Wang G, Ning H, Li LC, Lue TF, Lin CS. (2010) Effects of transplantation of adipose tissue-derived stem cells on prostate tumor. *Prostate*. Jul 1;70(10):1066-73.
- Lunn JS, Sakowski SA, Hur J, Feldman EL. (2011) Stem cell technology for neurodegenerative diseases: *Ann Neurol*. Sep; 70(3):353-61.
- Martin G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells: *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec;78(12):7634-8.
- Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ et al. (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*;68:4331–4339.
- Morst (Ministry of Research Science and Tecnology) (2006). *Stem Cell Research in New Zealand; Challenges and Opportunities for the Research Sector*, New Zealand p13-16.
- Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, Seidensticker M, Ricke J, Altman AM, Devarajan E, Liu W, Arlinghaus RB, Alt EU. (2009) Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis* 30(4): 589–597.
- Nasef A, Zhang YZ, Mazurier C et al. (2009) Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Int J Lab Hematol*;31:9–19.
- Ning H, Yang F, Jiang M et al. (2008) The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia*;22:593–599.
- Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. (2003) Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix: *Exp Mol Pathol* 75:248 255.
- Ostman A, Augsten M. (2009) Cancer-associated fibroblasts and tumor growth–Bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*;19:67–73.
- Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR et al. (2007) Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*;25:1761–1768.
- Prantl L, Muehlberg F, Navone NM, Song YH, Vykoukal J, Logothetis CJ, Alt EU. (2010) Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth. *Prostate*. Nov 1;70(15):1709-15.

- Prindull G., Prindull B., Meulen N. (1978) Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood: *Acta Paediatr Scand.* Jul;67(4):413-6.
- Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, Ye L, Zhang X. (2008) Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res.* Apr;18(4):500-7.
- Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH, Zhang XD. (2008) Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* Sep 28;269(1):67-77.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes: *J Neurosci.* Nov;12(11):4565-74.
- Rizvanov AA, Yalvaç ME, Shafigullina AK, Salafutdinov II, Blatt NL, Sahin F, Kiyasov AP, Palotás A. (2010) Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuro-blastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: A novel system for modeling cancer cell micro-environment: *Eur J Pharm Biopharm.* Oct;76(2):253-9.
- Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA et al. (2009) Bone marrow-derived cells and tumor growth: Contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells: *Crit Rev Oncol Hematol*;69:187–198.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 65: 3035–3039.
- Salazar KD, Lankford SM, Brody AR. (2009) Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;297:L1002–L1011.
- Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. (2012) Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report: *Lancet.* Feb 25;379(9817):713-20.
- Shostak S. (2006) (Re)defining stem cells: *Bioessays.* Mar;28(3):301-8.
- Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. (2008) Inflammation and tumor microenvironments: Defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*;15:730–738.
- Takayama N, Eto K. (2012) Pluripotent stem cells reveal the developmental biology of human megakaryocytes and provide a source of platelets for clinical application: *Cell Mol Life Sci.* Oct;69(20):3419-28.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts: *Science.* Nov 6;282(5391):1145-7.
- Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. (2011) Clinical trials for stem cell therapies: *BMC Med.* May 10;9:52.
- Tuna M. (2009) Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücreleri: *Türk onkoloji dergisi.* 24(1):42-47
- Vey N, Blaise D, Lafage M, Olive D, Viens P, Baume D, Camerlo J, Stoppa AM, Gabus R, Brandely M, Hercend T, Maraninchi D. (1999) Treatment of chronic myelogenous leukemia with interleukin-2: a phase II study in 21 patients. *J Immunother.* Mar;22(2):175-81.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. (2004) Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord: *Stem Cells.* 22(7):1330-7.
- Watt FM, Driskell RR. (2010) The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Jan 12;365(1537):155-63.

Wei Z, Chen N, Guo H, Wang X, Xu F, Ren Q, Lu S, Liu B, Zhang L, Zhao H. (2009) Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells: *J Exp Clin Cancer Res*. Nov 3;28:141.

Wert G, Mummery C. (2003) Human embryonic stem cells: research, ethics and policy: *Hum Reprod*. Apr;18(4):672-82.

Wong RS. (2011) Mesenchymal stem cells: angels or demons: *J Biomed Biotechnol*. 2011:459510.

Yong RL, Shinojima N, Fueyo J (2009) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas: *Cancer Res* 69:8932–8940.

Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. (2008) Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev*;17:463–473.

Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. (2006) Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*. 80(3):267-74.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies: *Tissue Eng*. 7(2):211-28.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

- Adı Soyadı: Belma AKPINAR YILMAZ
- Doğum yeri ve tarihi: İstanbul, 24.10.1986
- Adresi: İstanbul Teknik Üniversitesi (İTÜ) KOSGEB Teknoloji Geliştirme Merkezi A Blok Maslak/İSTANBUL
- Telefonu: 0532 314 29 56

Eğitim

- Lisans: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2005-2010
- Yüksek lisans: Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre A.D., 2010-2014

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- MOKAD: 2011-

Bilimsel Etkinlikler

- Akpınar B, Gacar G, Duruksu G, Karaöz E, İnsan Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin K562 (İnsan Kronik Myeloid Lösemi) Hücre Dizisi Üzerine Sitotoksik Etkisinin Araştırılması. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, PP-43, S233, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sapanca/TÜRKİYE.
- Akpınar B, Gacar G, Duruksu G, Karaoz E, Investigation of Apoptotic Effects of Human Dental Pulp Derived Stem Cell. 1'st International Conference on Stem Cell Research and Applications, P74, 7-9 October 2011, Kayseri/TURKEY.

- Akpınar B, Gacar G, Duruksu G, Karaoz E, Study of Cytotoxic Effects by Stem Cell Derived From Human Dental Pulp on K562 (Human Myelogeneous Leukaemia) Cell Line. EACR-Anticancer Agents Research Congress, OP-13, P59, 13-16 October 2011, Antalya/TURKEY.
- Akpınar B, Kanser Kök Hücreleri, Kocaeli Üniversitesi Bilim Şenliği, Sözlü Sunum, 26 Ocak 2011, Kocaeli/TÜRKİYE.
- Demirtaş T, Gacar G, Gacar N, Utkan T, Akpınar B, Unal ZS, Yazır Y, Karaoz E. Resveratrol effects on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. 6th European Congress of Pharmacology (EPHAR 2012),Granada/Spain.
- Demirtaş T, Gacar G, Utkan T, Gacar N, Akpınar B, Karaoz E, Utkan Z. Potential of resveratrol in anticancer therapy. 6th European Congress of Pharmacology (EPHAR 2012),Granada/Spain.

Ödüller

- The Best Scientific Poster Award in Stem Cell Research
Akpınar B, Gacar G, Duruksu G, Karaoz E, Investigation of Apoptotic Effects of Human Dental Pulp Derived Stem Cell. 1st International Conference on Stem Cell Research and Applications, 7-9 October 2011, Kayseri/TURKEY.
- MOKAD (Molecular Cancer Research Association in Turkey) Award
Akpınar B, Gacar G, Duruksu G, Karaoz E, Study of Cytotoxic Effects by Stem Cell Derived From Human Dental Pulp on K562 (Human Myelogeneous Leukaemia) Cell Line. EACR-Anticancer Agents Research Congress, 13-16 October 2011, Antalya/TURKEY.

Kurs ve Sertifikalar

- Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kursu, Kocaeli Üniversitesi, 28 Ekim 2010, TÜRKİYE
- Uygulamalı Flow Cytometer Kullanımı Kursu, Kocaeli Üniversitesi, 13 Aralık 2010, TÜRKİYE
- XIII.Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli Üniversitesi, 13 Aralık 2010, TÜRKİYE
- Stem Cell Applications: From Bench Side to Bed Side, February 25- March 8, 2013, Kayseri