

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI İNSAN DOKULARINDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMA POTANSİYELLERİNİN
İMMÜNOFENOTİPİK VE GEN EKSPRESYON DÜZEYİNDE
İNCELENMESİ**

Gülay ERMAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Yusufhan YAZIR

KOCAELİ
2018

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(Tez Onay Sayfası)

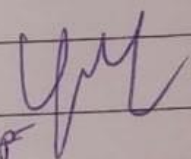

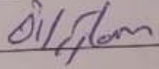
Tez adı: Farklı İnsan Otoklorından Elde Edilen Mezentimal Kök Hücrelerin farklılaşma Potansiyellerinin İmmünotipik ve Gen Ekspresyon Düzeyinde İncelenmesi

Tez yazarı: Gülay Eiman

Tez savunma tarihi: 0806.18

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yusufhan YAZIR

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalı.. Bilim.. Ders.. tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri		İmzası
Ünvanı Adı Soyadı		
Üye	Doç. Dr. Yusufhan YAZIR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Serap Mert	
Üye	Dr. Öğr. Ü. Ötlem Sarıçam Uçur.	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

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

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Farklı İnsan Dokularından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İmmünojenotipik Ve Gen Ekspresyon Düzeyinde İncelenmesi

Amaç: Mezenkimal kök hücreler(MKH) günümüzde yenileyici tıp veya hücrenel tedavilerin önemli biyolojik ajanlarıdır. Çeşitli dokulardan türetilen MKH'lerin kullanımını içeren klinik öncesi ve klinik çalışmalar halen devam etmektedir. Bununla birlikte, farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin eşzamanlı olarak farklılaşma potansiyellerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda farklı dokulardan izole edilen insan-MKH'lerin farklılaşma potansiyellerini gen ifadesi düzeyinde ve immünojenotipik özelliklerini, karşılaştırmalı olarak incelemeyi amaçladık.

Yöntem: İnsan adipoz doku (iAD), kemik iliği (Kİ), göbek bağı Wharton jeli (WJ), süt dişi ve 20 yaş dişi dental pulpası (DP) ve kıl folikülü (KF) kaynaklı MKH'ler uygun yöntemlerle kültüre edilmiş, pasaj 3'e gelen hücreler flow sitometrik ve immünohistokimyasal yöntemlerle karakterize edilmişlerdir. Tüm kaynaklardan elde edilen MKH'ler osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaştırma için kimyasal uyarılmışlardır. Farklılaşan hücrelerin gerçek zamanlı-PZR, ELİZA ve immünohistokimyasal analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Tüm kaynaklara ait MKH'ler, MKH'ye özgü yüzey belirteçlerini ifade etmektedir. DP ve KF kaynaklı MKH'ler diğerlerinden farklı olarak CD117 ifade etmektedirler. Kondrojenik farklılaşma için WJ, KF ve DP, adipojenik farklılaşma için WJ, KF ve AD ve de osteojenik farklılaşma için WJ, DP ve Kİ kaynaklarından elde edilen MKH'ler diğer gruplara göre daha iyi farklılaşma potansiyeli göstermişlerdir.

Sonuç: MKH gruplarının hepsi immünojenotipik ve morfolojik olarak benzerlik göstermektedir. Bununla beraber kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri elde edilen kaynaklara göre farklılıklar göstermektedir. Bu sonuçlar, klinik ve pre-klinik çalışmalara uygun MKH kaynağı seçimi için önemli bilgiler sağlamaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar gelecekte yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar sözcükler: *Mezenkimal kök hücre, farklılaştırma, yüzey belirteçler, İnsan adipoz doku, kemik iliği, Wharton jeli, süt dişi ve 20 yaş dişi dental pulpası, kıl folikülü*

ABSTRACT

Investigation of Differentiation Potentials of Mesenchymal Stem Cells Obtained From Different Human Tissues by Immunophenotypic And Gene Expression Levels

Objectives: Recently, Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are important biological agents in regenerative medicine and cellular therapy. Pre-clinical and clinical studies which involve the use of MSCs derived from various tissues are still in progress, consequently. However, there is no study on examining simultaneously differentiation of the potentials of MSCs derived from different sources. We intended to examine comparatively the differences in expression levels of surface markers and the immunophenotypic and genotypic characteristics of differentiation potentials of human-MSCs isolated from different tissues in our study.

Methods: For this purpose, MSCs from human adipose, bone marrow, umbilical cord Wharton's jelly, exfoliated deciduous teeth, wisdom teeth and hair follicle were cultured until third passaged by using suitable methods and characterized by flow cytometry and immunohistochemistry methods. MSC derived from each source were induced to differentiate to the osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. After differentiation, MSC's were analyzed by Real Time-PCR, ELISA and immunocytochemistry.

Results: Each individual cell population expresses the MSC-specific cell surface markers. On the other hand, unlike the others, dental pulp and hair follicle-MSC's express CD117. Wharton's jelly, hair follicle and dental pulp for chondrogenic differentiation, Wharton's jelly, hair follicle and adipose tissue for adipogenic differentiation, Wharton's jelly, dental pulp and bone marrow for osteogenic differentiation have higher potential than other sources.

Conclusions: Morphological and immunophenotypic characteristics of MSCs are similar. Differentiation capacities of stem cells show differences according to the resources of them. These results provide important information about selecting the suitable source of MSCs for pre-clinical and clinical studies. It is believed that the results of in our study will shed light the future studies on.

Keywords: *Mesenchymal Stem Cells, differentiation, cell surface markers, adipose tissue, bone marrow, Wharton's jelly, exfoliated deciduous teeth, wisdom teeth, hair follicle*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilgilerinden, deneyimlerinden yararlandığım ve tüm desteklerini benden esirgemeyen danışman ve bölüm başkanı sayın hocam **Doç.Dr. Yusufhan YAZIR**'a . Kök hücreyle beni tanıştıran tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım, her türlü yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam **Prof.Dr.Erdal KARAÖZ**'e;

Yüksek lisans ve çalışma dönemim boyunca manevi desteklerini, emeğini ve bilgi birikimlerini hiç çekinmeden bana sunan hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU** ve **Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR**'a;

Sadece tezimle kalmayıp tanıştığımız andan bu yana her türlü destek ve yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim, insanın hayatı boyunca karşılaşılabileceği nadir dostlardan olan hocalarım ve çalışma arkadaşlarım **Dr. Öğr. Üyesi Z.Seda ÜNAL HALBUTOĞULLARI** ve **Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR**'a; insana huzur veren arkadaşlığıyla **Araş. Gör. Ayşegül AÇIKSARI**'ya ve gerek laboratuvarında bilimsel olarak gerekse arkadaşlıklarından büyük haz duyduğum **Uz. Bio. Gizem TURAÇ**, **Uz. Bio. Cansu SUBAŞI**'na ve adı geçmeyen diğer tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca attığım her adımda güçlerini arkamda hissettiğim, sundukları sonsuz sevgileri ve fedakârlıkları için annem **Fatma BAYAZIT**'a babam **Memet BAYAZIT**'a ve kardeşlerime;

Üniversiteye hazırlıkta yapamadığım sorularıma yardım ederken bugün tezimi bitirmemde çok büyük desteği olan, yüksek öğrenime başladığım andan itibaren bitmeyen öğrencilik serüvenimizde birlikte yol aldığım, bu yoldaki zorlukları birlikte aştığım, her işte motivasyon kaynağım olan, desteğini sevgisini her zaman hissettiğim can yoldaşım **Sertaç ERMAN**'a tüm kalbimle sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

..../..../2018

Gülay ERMAN



Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2017/8.36 Proje No: 2017/178 Tarih: 07/06/2017
	Doç. Dr. Yusufhan YAZIR sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyoistatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	İLİŞKİLİ
Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* Gerekçe ve öneriler:

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kök Hücreler	1
1.1.1. Embriyonik Kök Hücreler	2
1.1.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	3
1.1.3. Mezenkimal Kök Hücreler	4
2. AMAÇ	12
3. YÖNTEM	13
4. BULGULAR	21
4.1. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen MKH'lerin Kültürü	21
4.1.1. İnsan Kemik İliği-MKH'lerin Kültürü	21
4.1.2. İnsan Wharton Jeli-MKH'lerin Kültürü	22
4.1.3. İnsan Kıl Folikülü-MKH'lerin Kültürü	23
4.1.4. İnsan Süt Dişi ve 20-Yaş Diş Pulpası Kaynaklı MKH'lerin Kültürü.....	24
4.1.5. İnsan Adipoz Doku-MKH'lerin Kültürü	26
4.2. İzole Edilen MKH'lerin Akım Sitometrik Karakterizasyonu	27
4.3. İzole Edilen MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonları	30
4.3.1. İnsan Kemik İliği-MKH'lerinin İmmünofenotipik Karakterizasyonu	30
4.3.2. İnsan Wharton Jeli-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu	31
4.3.3. İnsan Kıl Folikülü-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu	32
4.3.4. İnsan 20 Yaş dişi DP-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu.....	33
4.3.5. İnsan Süt Dişi DP-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu.....	34
4.3.6. İnsan Adipoz Doku-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu	35
4.4. Farklı Kaynaklarından İzole Edilen Kök hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin Karşılaştırılması.....	37
4.4.1. İzole Edilen Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi ..	37
4.4.1.1. İmmunohistokimya yöntemiyle osteojenik farklılaştırma.....	37
4.4.1.2. ELİSA yöntemi ile osteojenik farklılaşma	40
4.4.1.3. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile osteojenik farklılaştırma	41

4.4.2. İzole Edilen Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi .	42
4.4.2.1. Morfolojik olarak adipojenik farklılaştırma	42
4.4.2.2. ELİSA yöntemi ile adipojenik farklılaştırma	45
4.4.2.3. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile adipojenik farklılaştırma	46
4.4.3. İzole Edilen Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi.....	46
4.4.3.1. İmmünohistokimya yöntemi ile kondrojenik farklılaştırma.....	46
4.4.3.2. ELİSA yöntemi ile kondrojenik farklılaştırma.....	49
4.4.3.3. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kondrojenik farklılaştırma.....	50
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR DİZİNİ	59
ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μm	: Mikrometre
ABMSCs	: Alveolar kemik kaynaklı mezenkimal kök hücreler
AD	: Adipoz doku
ADFP	: Adipoz farklılaşma ilişkili protein
ADP	: Adiponektin
APKH	: Apikal papilla kök hücreleri
BMP	: Kemik morfojenik protein 2
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
cm^2	: Santimetrekare
CO_2	: Karbondioksit
COLL1	: Kollajen tip I
COLL2	: Kollajen tip 2
C_p	: Crossing point
DFPCs	: Dental folikül progenitör hücreler
DFPH	: Dental folikül progenitör(öncü) hücreleri
DP	: Dental pulpa
DPKH	: Diş pulpası kök hücreleri
EDTA	: Ethilen daimin tetra asetik asit
EKH	: Embriyonik kök hücre
FBS	: Fetal sığır serumu
GFP	: Yeşil flouresan protein

GK	: Göbek kordonu
GMSCs	: Gingiva mezenkimal kök hücreleri
H&E	: Hematoksilin-Eosin
HBSS	: Hanks'ın dengeli tuz çözümü
ITP	: İmmün/İdiopatik trombositopenik purpura
KF	: Kıl folikülü
Kİ	: Kemik iliği
LEP	: Leptin
MKH	: Mezenkimal kök hücre
mL	: Mililitre
mm ³	: Milimetre küp
OPN	:Osteopontin
P	: Pasaj:
PBS	: Fosfat tamponu
PDLKH	: Periodontal ligament kök hücreleri
PDLSCs	: Periodontal ligament kök hücreleri
PH	: Parkinson hastası
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SCAP	: Apikal papilla kök hücreleri
SHED	: Çekilmiş/sürmüş süt dişi
TGPCs	: Diş germ progenitör hücreler
WJ	: Wharton jeli

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Kök hücre sınıflandırması	2
Çizim 1.2 Embriyonik kök hücrelerin eldesinin şematik gösterimi	3
Çizim 1.3 İnsan dental doku kaynaklı MKH'lerinin elde edildikleri niş.....	6
Çizim 1.4 Kıf Folikülü kaynaklı MKH'lerin yerleşimi.....	7
Çizim 1.5 Göbek kordonunun yatay kesiti.....	8
Çizim 4.1 iKİ-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri.....	22
Çizim 4.2 iWJ-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri.....	23
Çizim 4.3 iKF-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri.....	24
Çizim 4.4 iDP(süt dişi)-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri.....	25
Çizim 4.5 iDP(20 yaş)-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri.....	25
Çizim 4.6 iAD-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri.....	26
Çizim 4.7 İnsan Kİ, iWJ, iKF, iDP (süt ve 20 yaş), iAD kaynaklı MKH'lerin, mezenkimal kök hücre belirteçleri ifadesinin akım sitometrik analiz	27
Çizim 4.8 İnsan Kİ, iWJ, iKF, iDP (süt ve 20 yaş), iAD kaynaklı MKH'lerin, hematopoetik hücre belirteçlerinin flow sitometrik analizi.....	28
Çizim 4.9 İnsan Kİ, iWJ, iKF, iDP (süt ve 20 yaş), iAD kaynaklı MKH'lerin, hematopoetik hücre belirteçlerinin flow sitometrik analizi.....	29
Çizim 4.10 İnsan Kİ, iWJ, iKF, iDP (süt ve 20 yaş), iAD kaynaklı MKH'lerin, CD10, CD13, CD71, CD146 ifadesinin flow sitometrik analizi.....	29
Çizim 4.11 İnsan Kİ, iWJ, iKF, iDP (süt ve 20 yaş), iAD kaynaklı MKH'lerin, CD29,CD106, HLA-ABC ve HLA-DR ifadesinin flow sitometrik analizi.....	30
Çizim 4.12 iKİ-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi	31

Çizim 4.13 iWJ -MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi.....	32
Çizim 4.14 iKF-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi.....	33
Çizim 4.15 iDP(20yaş)-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi.....	34
Çizim 4.16 iDP(süt dişi)-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi.....	35
Çizim 4.17 iAD-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi.....	36
Çizim 4.18 iKİ-MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları.....	38
Çizim 4.19 iWJ-MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları.....	38
Çizim 4.20 iKF -MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları.....	39
Çizim 4.21 iDP(20 yaş) -MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları.....	39
Çizim 4.22 iDP(süt dişi) -MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları.....	40
Çizim 4.23 iAD -MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları.....	40
Çizim 4.24 iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dişi) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin osteojenik farklılaştırma sonrası OPN elisa sonuçları.....	41
Çizim 4.25 iKİ, iWJ, iKF, iDP (20yaş), iDP (süt dişi) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin osteojenik farklılaştırma sonrası COLL1 elisa sonuçları.....	41
Çizim 4.26 iKİ, iAD, iDP(süt dişi), iDP(20yaş), iWJ, iKF, ve kaynaklı MKH'lerinin osteojenik farklılaştırma sonrası BMP2, OPN ve cFos gen ifadelerinin karşılaştırılması.....	42
Çizim 4.27 iDP iKİ-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları	43
Çizim 4.28 iWJ-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları	43
Çizim 4.29 iKF-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları	43

Çizim 4.30 iDP(20 yaş)-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları	44
Çizim 4.31 iDP(süt dişi)-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları	44
Çizim 4.32 iAD-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları	44
Çizim 4.33 iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dişi) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin adipojenik farklılaştırma sonrası ADP elisa sonuçları.....	45
Çizim 4.34 , iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dişi) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin adipojenik farklılaştırma sonrası LEP elisa sonuçları.....	45
Çizim 4.35 iKİ, iAD, iDP(süt dişi), iDP(20yaş), iWJ, iKF, ve kaynaklı MKH'lerinin adipojenik farklılaştırma sonrası ADFP gen ifadelerinin karşılaştırılması	46
Çizim 4.36 iKİ-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları	47
Çizim 4.37 iWJ-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları	47
Çizim 4.38 iKF-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları	48
Çizim 4.39 iDP (20 yaş)-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları	48
Çizim 4.40 iDP (süt dişi)-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları	49
Çizim 4.41 iAD-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları	49
Çizim 4.42 iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dişi) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin kondrojenik farklılaştırma sonrası Coll 2 elisa sonuçları.....	50
Çizim 4.43 iKİ, iAD, iDP(süt dişi), iDP(20yaş), iWJ, iKF, ve kaynaklı MKH'lerinin kondrojenik farklılaştırma sonrası COLL2 gen ifadelerinin karşılaştırılması.....	51

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1. İmmünohistokimya ve immünoflouresan antikorlarının dilüsyon oranları ve kaynağı	18
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri.....	20
Çizelge 4. 1 Tüm MKH gruplarının immünohistokimyasal özelliklerinin gösterilmesi.....	36



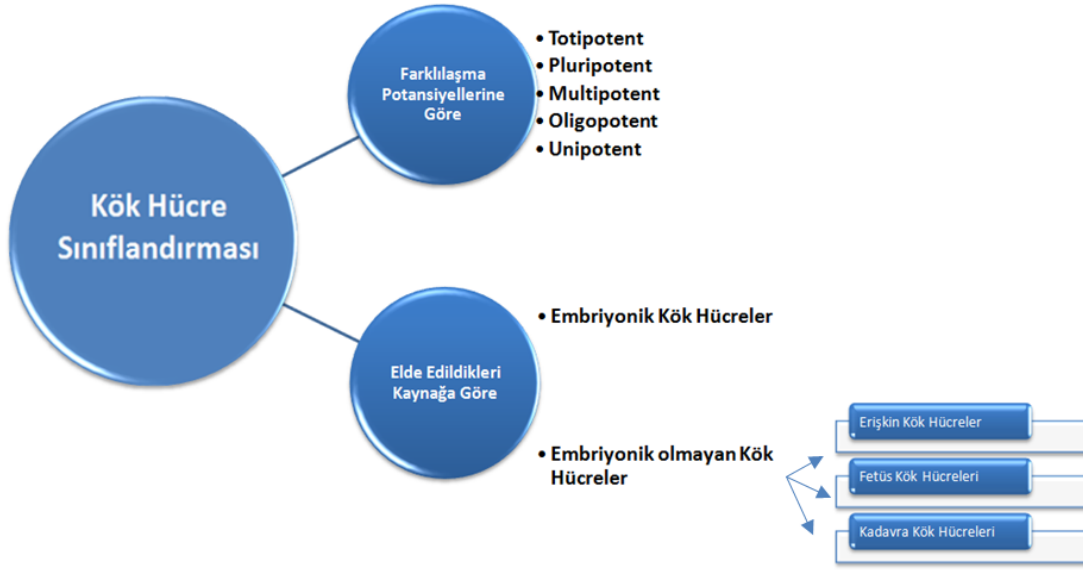
1. GİRİŞ

Kök hücrelerin kendini yenileme, hasarlı bölgeye göçü (migrasyonu) ve dokuyu oluşturan fonksiyonel hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneği bu hücrelerin yenileyici tıp (rejeneratif tıp) veya hücresele tedaviler için heyecan verici bir kaynak oluşturmasının yanı sıra hücresele tedavilerde bu hücrelerin kullanılmasına yönelik artan bir talebi de doğurmuştur. Ayrıca TÜBİTAK'ın yayınladığı 2003-2023 Teknoloji Öngörü Çalışması'nda, Türkiye'de kök hücre teknolojilerinin geliştirilmesi ve kök hücrelerin özellikle rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılabilir duruma gelmesi gerekliliği vurgulanmaktadır (Türkiye Bilimsel ve Teknik Arastırma Kurumu Kasım, 2004).

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler kendini yenileme yeteneğine sahip özelleşmemiş hücreler olup, kök hücrelerden elde edilen yavru hücreler özelleşmiş hücrelere öncülük edebilir. Kök hücreleri elde edildikleri kaynaklara ve farklılaşma potansiyellerine göre başlıca iki şekilde gruplandırabiliriz (çizim 1.1).

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent olarak adlandırılır. Ancak son zamanlarda oligopotent ve unipotent kavramları da bu sınıflandırma dahilinde ele alınmaktadır. Kök hücreler birden fazla hücre tipine farklılaşırlar. Bunun örneklerini insanı oluşturan ilk hücre olan döllenmiş yumurta hücresi ya da zigottan itibaren görebiliyoruz. Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olan bu ilk embriyonel hücreye her şeyi yapabilen anlamında “**totipotent kök hücre**” denmektedir. Vücudun endoderm, ektoderm ve mezoderm denilen üç embriyonik tabakasından köken alan pek çok farklı hücre çeşidine kaynaklık edebilme özelliğine sahip kök hücrelere, “**pluripotent kök hücreler**” denir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal dönemde), hücreler potensleri azalarak biraz daha özel görevlere sahip olur ve erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Bu kök hücreler, tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler ve “**multipotent kök hücreler**” olarak adlandırılırlar. Örneğin; fibroblastlara, osteoblastlara, kondroblastlara, tenositlere ve adipositlere farklılaşan mezenkimal kök hücreler vardır (Karaöz ve Ovalı 2004). Bazı kök hücreler farklılaşarak buldukları dokuya özel sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilen “**oligopotent hücre**” lere dönüşürler (Ateş 2016). Multipotent kök hücre ve bu hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan ve tek bir yönde farklılaşma üzere programlanan hücrelere “**unipotent hücreler**” denir (Kansu 2005).



Çizim 1.1. Kök hücre sınıflandırması

Kök hücreler esas itibariyle iki farklı kaynaktan elde edilirler (İnan ve Özbilgin 2009).

A- Embriyonik kök hücreler

B- Embriyonik olmayan kök hücreler

a- Erişkin kök hücreler

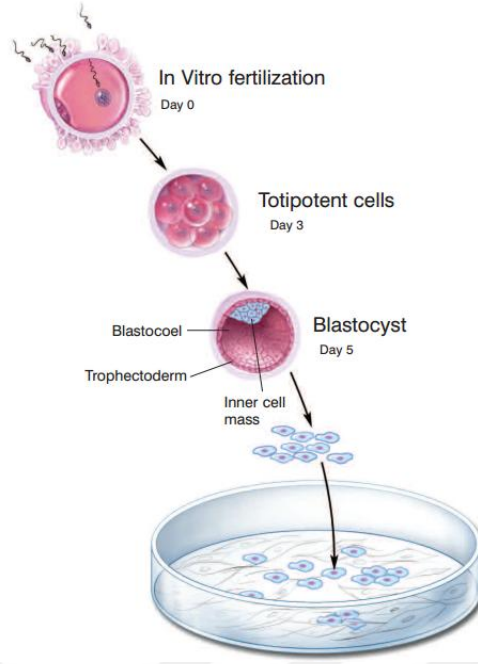
- Hematopoetik kök hücreleri (kemik iliği, kordon kanı ve periferik kan kök hücreleri)
- Mezenkimal kök hücreler
- Organlardaki kök hücreler

b- Fetüs kök hücreleri

c- Kadavra kök hücreleri.

1.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH), memeli blastosistindeki iç hücre kitlesinden elde edilen özel pluripotent hücrelerdir (çizim 1.2). Fertilizasyondan sonra içi sıvı dolu küre şeklindeki blastosist yapısı bir dış hücre tabakası bir de iç hücre kitlesinden oluşur. Dış hücrelerden trofoektoderm ve daha sonra da plasenta ve diğer destek dokuları meydana gelir. İç hücre kitlesi hücreleri ise vücuttaki tüm dokuları oluşturacaklardır ve bu nedenle pluripotenttirler (Özel 2008). Besleyici bir fibroblast tabaka üzerinde ve LIF (lösemi inhibitör faktör) varlığında pluripotent özelliklerini çok uzun süre devam ettirebilirler (Evans ve Kaufmann 1981, Martin 1981).



Çizim 1.2. Embriyonik kök hücrelerin eldesinin şematik gösterimi Yu ve Thomson (2006)'dan alınmıştır.

EKH'ler pluripotent hücreler için tanımlanmış olan spesifik yüzey belirteçleri ve transkripsiyon faktörlerine sahiptirler. EKH'leri tanımlamada kullanılan yüzey belirteçleri SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60 VE TRA 1-81'dir. EKH'lerin pluripotensi özelliklerinden sorumlu olan transkripsiyon faktörleri ise Nanog, Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc ve Lin 28 olarak tanımlanmıştır (İsan ve diğ. 2016).

1.1.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Embriyonik kök olmayan kök hücreler birçok kaynakta şu şekilde gruplandırılırlar:

- a) Erişkin kök hücreleri (Doku özgün kök hücre, postnatal kök hücre)
- b) Fetüs kök hücreleri
- c) Kadavradan elde edilen kök hücreler (Sağsöz ve Ketani 2008)

Embriyonik olmayan kök hücreler genel olarak multipotent özelliktedir ve bu kaynağın hücreleri "Erişkin Kök Hücreler" olarak da isimlendirilir. Erişkin kök hücreler, plasenta, göbek bağı, amniyon sıvısı ya da fetusun doku-organlarından (**fetal kök hücreler**) elde edilebileceği gibi kadavradan da elde edilebilir. Ancak fetusdan kök hücre eldesi ve araştırmalarda kullanılması buna yönelik fetus kaynaklarının oluşturulabileceği gibi etik sorunlar doğurabilir. Erişkin bir kök hücre, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre 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 (Karaöz ve Ovalı 2004). Erişkin kök hücreler dokuya özgü olması, teratom oluşturma riski taşımaması ve etik sorunların olmaması nedeniyle, yenileyici tıpta tedaviye yönelik araştırmalarda sık olarak tercih edilmektedir. Dokularda nadir bulunurlar ve buldukları dokuda hasar meydana geldiğinde kısmen dokuyu tamir etme yeteneğinde olan hücrelerdir. Bu hücreler somatik kök hücreler olarak da adlandırılırlar ve özel koşullar altında farklılaşma göstererek diğer dokulara ait hücre tiplerine de dönüşebilirler. Başta kemik iliği olmak üzere pek çok organda, gerektiğinde çoğalabilen, farklılaşabilen hücrelerdir (Özen ve Sancak 2014). Bu hücreler genellikle damardan zengin organların stromasında yerleşik ve fibroblast benzeri yapısal özellikleri olan mezenkimal kök hücre olarak adlandırılan hücrelerdir. Çalışmamızda farklı erişkin kök hücre kaynaklarından elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır.

1.1.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), ilk olarak Fridenstein ve diğ. (1974) tarafından kemik iliğinden izole edilmiştir ve adherent fibroblast benzeri hücreler olarak isimlendirilmiştir (Fridenstein ve diğ. 1974a, Fridenstein ve diğ. 1974b). Daha sonra Caplan (1991) isimli araştırmacı bu hücreleri Mezenkimal Kök Hücre olarak isimlendirmiş ve halen bu şekilde isimlendirilmektedir. MKH'ler adesyon yeteneği, spesifik yüzey belirteçleri ekspresyonu ve özellikle osteojenik, kondrojenik ve adipojenik olmak üzere farklılaşma kapasitelerine sahip non-hematopoetik hücreler olarak karakterize edilirler (Pittenger ve diğ. 1999, Caplan 1991, Dominici ve diğ. 2006). İlk olarak kemik iliğinde tanımlanmasının yanı sıra, adipoz doku (Zuk ve diğ. 2002), diş pulpası (Karaöz ve diğ. 2009), kordon kanı, göbek bağının Wharton jeli (Chen ve diğ. 2015), plasenta, amniyon sıvısı (Pievani ve diğ. 2014), pankreatik adacık (Karaöz ve diğ. 2010) ve kıl folikülü (Wang ve diğ. 2013) gibi çeşitli dokulardan MKH'lerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu hücrelerin izolasyon ve kültür koşulları farklı olmasına rağmen Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society of Cellular Therapy, ISCT) MKH'lerin tanımlanması için gerekli kriterleri belirlemiştir. Buna göre, mezenkimal kök hücreler normal kültür koşullarında plastik kültür kaplarına yapışma özelliği gösterir, CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerini ifade ederken, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 ve HLA-DR gibi hematopoetik belirteçleri ifade etmezler (Dominici ve diğ. 2006). Ayrıca MKH tanımlamada α -SMA (Alfa Smooth Muscle Actin, fibronektin, nestin, desmin ve vimentin gibi belirteçler de kullanılmaktadır (Karaöz ve diğ. 2011, Hoppo ve diğ. 2004).

Çalışmamızda insan adipoz doku (AD), göbek kordon-warthon jeli (WJ), kıl folikülü (KF), süt ve 20 yaş dişi dental pulpası (süt DP ve 20 yaş DP), kemik iliği (Kİ), MKH kaynağı olarak kullanılmıştır.

1.1.3.1. Adipoz doku kaynaklı MKH'ler

Adipoz doku kemik iliği ile benzer kökenden yani mezenşimden orijinlenmektedir. Vücudumuzda en fazla bulunan dokular arasında yer aldığı düşünüldüğünde MKH'ler için zengin bir kaynak olduğu aşıkardır. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH'ler) sağlıklı vericilerden yağ aldırma yöntemiyle deri altı yağ dokusundan laboratuvar koşullarında izole edilmektedir (Öznel 2010).

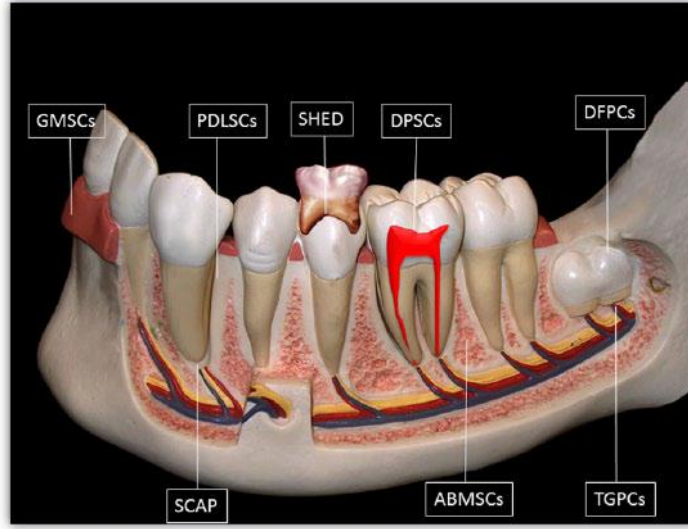
Uzun yıllardır, yağ dokusunun hiperplastik (hücre sayı, ve büyüklük artışı) büyümesinin unipotent progenitör hücre populasyonlarının yani pre-adipositlerin varlığına bağlı olduğuna inanılmaktadır (Ergün 2003). Ancak Zuk ve diğ. (2001), yağ dokusunda kendini yenileyen fibroblast benzeri hücrelerin ve bu hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma yeteneğinde yani multipotent kapasiteleri olan hücrelerin varlığını göstermişlerdir (Zuk 2001). Adipoz kaynaklı kök hücreler, Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından önerilen MKH'lerin tipik özelliklerini göstermektedir (Dominici ve diğ. 2006). Böylece yağ dokusu hücre bazlı tedavilerde kullanılmak üzere bir MKH kaynağı olarak düşünülmektedir.

1.1.3.2. Dental pulpa kaynaklı MKH'ler

Dental kök hücre nişi çeşitli araştırma gruplarının odak noktasında yer almaktadır. Farklı dental dokudalarda başlıca altı dental kök hücre tipi; Diş pulpası kök hücreleri (DPKH), çekilmiş/sürmüş süt dişleri (süt-DPKH), periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH), dental folikül progenitör (öncü) hücreleri (DFPH), apikal papilla kök hücreleri (APKH) ve süt dişi periodontal ligament hücreleri şeklinde isimlendirilmişlerdir (Çizim 1.3). Bu alt-tiplerden aslında sadece üçü diş pulpasına aittir; DPKH'leri, süt-DPKH'leri, APKH'leri (Perlea ve diğ. 2016).

DPKH'leri ilk olarak Gronthos ve diğ. tarafından izole edilip karakterizasyonları yapılmıştır. Bu hücrelerin koloni oluşturduğu ve kolonideki her hücrenin fibroblast benzeri morfoloji sergilediğini rapor etmişlerdir (Gronthos ve diğ. 2000). DPKH'lerinin izolasyonu enzimatik ve eksplant olmak üzere iki farklı yöntemle yapılmış ve her iki yöntemle izole edilen DPKH'leri arasında çoğalma oranları, koloni oluşturma ve de yüzey belirteçlerinin ifadesinde farklılık olmadığını göstermişlerdir (Hilkens ve diğ. 2013). Ayrıca bu hücrelerin

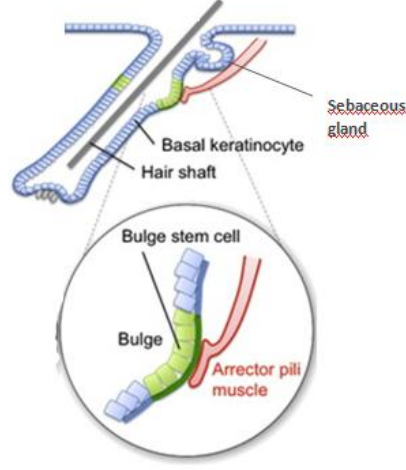
osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşabildiğini de ifade etmişlerdir (Hilkens ve diğ. 2013).



Çizim 1.3. İnsan dental doku kaynaklı MKH'lerinin elde edildikleri nişi gösteren şematik çizim Chalisserry ve diğ.(2017)'den alınmıştır. ABMSCs: Alveolar kemik kaynaklı mezenkimal kök hücreler, DFPCs: Dental folikül progenitör hücreler, DPSCs: dental pulpa kaynaklı kök hücreler; GMSCs: Gingiva mezenkimal kök hücreleri, PDLSCs: periodontal ligament kök hücreleri, SCAP: apikal papilla kök hücreleri, SHED: çekilmiş/sürmüş süt dişi, TGPCs: diş germ progenitör hücreler.

1.1.3.3. Kıl folikülü kaynaklı MKH'ler

Kıl folikülü kaynaklı kök hücreler (KF-MKH'ler) çıkıntı (bulge) adı verilen niş içinde yer alırlar (çizim 1.4). Çıkıntı erekteör pili kasının bağlanma yeri ile sebace bez arasında bulunmaktadır (Joulai ve diğ. 2017) (çizim 1.4). Bulge hücreleri her ne kadar kıl folikülü ile ilişkili kök hücreler isimlendirilseler de (hair follicle-associated-pluripotent (HAP) stem cells) KF-MKH'lerin kıl veya epidermis dışında adiposit, osteosit ve kas hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir (Amoh ve Hoffman 2017). Çıkıntı kök hücrelerinin MKH morfolojisine ve plastik kültür kaplarına yapışma yeteneğine sahip olduğu, aynı zamanda MKH karakterizasyonunda kullanılan yüzey belirteçlerinin varlığı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Coelho de Oliveira ve diğ. 2017). Dolayısıyla bu hücreler de mezenkimal kök hücre kaynakları arasında yerini almıştır.

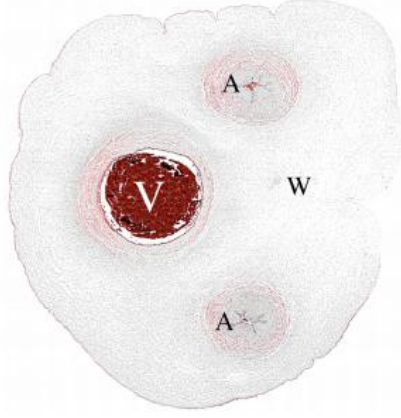


Çizim 1.4. Kıl folikülü kaynaklı MKH'lerin yerleşimi Fujiwara ve diğ. (2011)' den alınmıştır.

1.1.3.4. Wharton jeli kaynaklı MKH'ler

Hamilelik sırasında fetus ile planksenta arasındaki dolaşımı sağlayan bağlantıyı göbük kordonu (GK) oluşturur. Anatomik olarak GK'nu iki arter ve bir ven'den oluşmaktadır. Bu damarlar Warton Jeli (peltesi) (WJ) olarak bilinen proteoglikanlarca zengin matriks içine gömülüdür ve en dışta amniyotik epitelyum ile kaplıdır (Witkowska-Zimny ve Wrobel 2011) (Çizim 1.5). GK-Wharton Jeli ilk olarak 1956 yılında Thomas Wharton tarafından ilkel bağ dokusu olarak tanımlanmıştır (Taghizadeh ve diğ. 2011). Daha sonra McElreavey ve diğ. (1991) tarafından bu dokudan fibroblast benzeri hücrelerin elde edilebildiği ve kültürlerinin mümkün olduğu rapor edilmiştir. Böylelikle WJ, kök hücre kaynakları arasında yerini almıştır.

Birçok kaynakta WJ-MKH'lerin, MKH'ye özgü yüzey belirteçleri olan CD105, CD90, CD44, CD73, CD29 ve CD166 ifadesinin varlığını ve hematopoetik belirteç olan CD45, CD14, CD34 ifadesinin ise bulunmadığı rapor edilmiştir (Kim ve diğ. 2013, Frausin ve diğ. 2015). Ayrıca WJ-MKH'lerinin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir (Frausin ve diğ. 2015, Wang ve diğ. 2004).



Çizim 1.5. Göbek kordonunun yatay kesiti. W –wharton jeli, A- umbilikal arter, V- umbilikal ven. Harvey ve Kilman (2006)'dan alınmıştır.

MKH'lerin postnatal büyüme ve gelişim, doku onarımı, rejenerasyon ve homeostazisin sağlanmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. MKH'lerin kendini yenileme ve dokuyu oluşturan fonksiyonel hücre tiplerine farklılaşma yeteneğinden dolayı hücre bazlı tedaviler için heyecan verici bir kaynak oluşturmaktadır. Bu yüzden, MKH'ler doku onarımı ve rejeneratif tıpta ümit verici bir tedavi aracı olarak kullanılabilceği kabul edilir (Caplan 2009, Sensebe ve Bourin 2009). MKH'lerin bu özelliklerinden yola çıkılarak hücre bazlı tedaviler için yapılan çalışmaların başlıcaları nörodejeneratif hastalıklar, müsküler hastalıklar, ortopedi, kardiyoloji olarak göze çarpmaktadır (Yanbakan 2015).

Santral sinir sistemi hücrelerinin rejenerasyon (kendini yenileme) yeteneğinin olmadığı 1928 yılında Ramon ve diğ. tarafından belirtilmişse de uzun yıllar kabul gören bu görüşe rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar ile yetişkin travmatize edilmiş insan hipokampusunda da yeni nöronların geliştiği gözlemlenmiştir (Hess ve Borlongan 2008). İnsan hipokampusunda dentat girusta yeni nöronların varlığını göstermiştir (Eriksson ve diğ. 1998). Lindvall ve diğ. (1992) iki parkinson hastasına fetal mezensefalik dokudan doku nakli yapmışlar ve bu hastaların motor fonksiyonlarındaki gelişimi göstermişler. Kefalopoulou ve diğ. (2014) yaptıkları olgu sunumunda, fetal mesensefalik doku nakledilen iki parkinson hastasındaki gelişimleri 15-18 yıl gözlemlemişler. Hastaların pozitron emisyon tomografi (bilgisayarlı tomografi) (PET) göstergelerinde dopaminerjik alanları göstermişler ve dopaminerjik ilaç kullanmaksızın günlük işlerini kendilerinin yapabildiklerini söylemişlerdir. Ancak bu dokuların nörodejeneratif hastalıklarda kullanılması elde edilmesinin zorluğu ve etik kurallardan dolayı çok da kullanılabilir bir yöntem gibi gözükmemektedir.

Nörodejeneratif hastalıklarda farmakolojik uygulamalar ise kardinal semptomların iyileşmesine etki eden faktörlerin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Ancak bu uygulamaların hiçbiri tedavi edici değildir. Bu sebeple araştırmacılar hücrel tedavilere yönelmişlerdir. Dolayısıyla daha önce bahsedilen MKH özellikleri de göz önünde bulundurulduğunda, daha kolay ulaşılabilir MKH kaynaklarına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Parkinson modeli geliştirilen ratlarda insan Kİ-MKH kullanılmış ve ratların beslenmeleri ile ilgili ve apomorfin kaynaklı kontralateral rotasyonlarında kademeli azalmanın yanı sıra motor testlerinde davranışsal iyileşme gözlenmiştir. Ayrıca alınan histolojik kesitlerde aşılana hücrelerin hayatta kaldığı insana özgü astrosit belirteçleri ile gösterilmiş ve aynı zamanda terminal sinir sistemi dopaminerjik hasarın rejerasyonunda bu hücrelerin etkili olduğunun kanıtlanmıştır (Bahat-Stroomza ve diğ. 2009). Yedi parkinson hastasına otolog Kİ-MKH uygulanmış ve bu hastaların Parkinson hastalığı için kullandıkları ilaç dozlarını düşürdükleri görülmüş (Venkataramana ve diğ. 2010). Yine omurilik hasarlı 10 hastada otolog Kİ-MKH uygulaması ile bu hastaların günlük aktivitelerindeki motor güçleri gelişmiş, MR ve elektrofizyolojik skorlarında önemli değişimler gözlenmiştir (Karamouzian ve diğ. 2012, Saito ve diğ. 2012). Giordano ve diğ. (2014) faz 1 çalışması olarak progresif supranükleer palsi (PSP) hastalarına otolog kemik iliği kaynaklı MKH tedavisi tasarlamışlardır. Tedaviden bir yıl sonra yapılan tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT) ve PET görüntülerinde dopamin taşıyıcıların yoğunluğunu ve metabolik süreçlerin normaleştiğini göstermişler. Mini mental durum muayenesi (MMSE) ile nöropsikolojik ölçümde (sözel anlama, algısal örgütlenme, anı bellek, gecikmiş hafıza, kelime listesi tanıma, dil dikkat / konsantrasyon, görsel yetenek, işlem hızı, yürütme işlevi) skorun tedavi öncesine göre arttığı gösterilmiştir.

Müsküler distrofi hastalarının çoğunda tedavi edici bir uygulama seçeneği bulunmamaktadır. Yapılan uygulamaların çoğu hastalık seyrini yavaşlatmaya yöneliktir. Bu sebeple kas hastalıklarında kök hücre tedavisi önem kazanmaktadır. Bu çalışmalardan birkaç tanesi şu şekildedir; Lee ve diğ. (2015) adipoz kaynaklı kök hücrelerinin Duchenne Müsküle Distrofi model farelerin (mdx fare) kas hasarında rejeneratif etkisini olduğunu söylemişler ve de in-vitro deneylerde GFP işaretledikleri adipoz kaynaklı kök hücrelerinin distrofin eksprese eden mikrotübüllere farklılaştığını göstermişler.

Alexeev ve diğ. (2014) insan adipoz kök hücrelerinin, ekstraselüler matriks proteinlerini sentezleyen genleri eksprese ettiklerini göstermişler ve bu hücreleri kollagen 4-yetersiz farelere enjekte etmişler. Daha sonra bu farelerdeki kas, hücreler arası matriks oluşumu ve ilgili genlerin ifadesi ile gösterilmiştir. Müsküler distrofili 150 hastaya kemik

iliği mononükleer hücrelerinin intramuskuler ve intratrakeal enjekte edilmiş ve bu hastalardaki kas aktivitesini MRI ve EMG ile sergilenmiştir (Sharma ve diğ. 2013). Çalışmanın sonuçları bu tedavinin güvenli ve etkili olduğunu ve ayrıca musküler distrofi hastaların yaşam kalitesini iyileştirdiğini göstermektedir.

Kalp hastalıklarında tedavi durumu nörodejeneratif ve musküler hastalıklardakine benzer şekilde rejenerasyona yönelik değildir. Mevcut yöntemler kardiyomyosit kaybı ve kalp yetmezliği sorununu çözememektedir. Benzer sebeplerle kardiyolojik hastalıklarda da MKH araştırmaları devam etmektedir. Kalp krizi sonrası hasarın onarımında ya da kardiyomyopatilerin tedavisinde kök hücre kullanımı için klinik araştırmalar devam etmektedir. Bu araştırmalar genellikle kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kullanımına yöneliktir (Lee ve diğ. 2011, Guijarro ve diğ. 2014, Bolli ve diğ. 2018).

Ortopedi de ise özellikle diz eklemlerini etkileyen akut travma veya osteoartrit gibi eklem kıkırdağı lezyonları, bu dokuların zayıf olan rejeneratif özelliklerinden dolayı büyük ölçüde çözümlenemeyen klinik sorunlar olmaya devam etmektedir. Klinisyenler açısından hasarlı eklem yüzeyini onarmak için çeşitli seçenekler mevcut olsa bile ömür boyu yapılan fiziksel aktiviteler sırasında karşılaşılan mekanik etkilere, dokunun dayanma gücü sınırlıdır ve hiçbiri doğal kıkırdak bütünlüğünü geri kazandırabilmede yeterli olmamaktadır. Kıkırdak dokusuna destek olabilen kök hücrelerin uygulamasına dayalı stratejiler, hastalarda kıkırdak lezyonlarında etkili tedaviler sağlayabilir (Gözen ve diğ. 2015). Kıkırdak dokusunun tamiri için en uygun kök hücre kaynağının seçimi ise kolay ulaşılabilir, işlenebilir olması ve de kıkırdak doku farklılaşmasındaki başarısına bağlı olabilir. Bu amaçla kemik iliği kaynaklı MKH'lerin in-vivo kullanımı, eklem kıkırdağı hasarı ve osteoartrit oluşturulmuş hayvan modellerinde (sıçan, tavşan, domuz, koyun, at) lezyon onarımının gelişimi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak çalışılmış ve MKH uygulanan gruplardaki gelişim gösterilmiştir (Al Fageh ve diğ. 2012, Yan ve diğ. 2007).

Yine MKH kaynağı olarak kemik iliği seçilen klinik araştırmalar Retinitis pigmentosa için yapılmaktadır. Otolog Kİ-MKH uygulaması yapılan bu çalışmalar faz I aşamasındadır. Behçet Hastalığında ortaya çıkan oküler lezyonların tedavisi için de otolog Kİ-MKH verilmiş ve bu hastalarda lezyon gelişiminin ve retinal hasarın kademeli olarak durduğu ayrıca vasküler hasarın onarıldığı rapor edilmiştir (Davatchi ve diğ. 2015).

Kök hücrelerin, çoğalma, morfolojik ve immünojenotipik özellikleri, farklılaşma kapasiteleri, elde edildikleri kaynaklara göre farklılıklar gösterebilir. Bu yüzden farklı kök hücre kaynaklarından elde edilen kök hücrelerin biyolojik özelliklerinin analizi ve yenileyici ve onarıcı tıp için en uygun ve kullanılabilir kök hücre kaynaklarının tayini

önem taşımaktadır. Yıllarca deneysel ve klinik uygulamalarda Kİ MKH'si ana kaynağı olarak kabul edilmiş olmasına rağmen Kİ-MKH'lerin kullanımı bazı dezavantajlara sahiptir. Öncelikle, hasta veya donerden kemik iliğı toplama prosedürü oldukça ağırlı ve invazivdir, ayrıca Kİ'den elde edilen MKH'lerin sayısı, çoğalması ve farklılaşma potansiyeli donörün yaşıyla ters orantılıdır (Caplan 2009). Bu durum dikkate alındığında kemik iliğine alternatif MKH kaynağının ya da kaynaklarının tespiti önem arz etmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda insan adipoz doku, göbek kordon-warthon jeli, kıl folikülü, süt ve 20 yaş dişı, kemik iliğı MKH kaynağı olarak kullanılmıştır.



2. AMAÇ

MKH'ler günümüzde yenileyici ve onarıcı tıpta kullanılan hücresele tedavilerin önemli biyolojik ajanlarıdır. Bu amaçla çeşitli kaynaklardan elde edilen MKH'lerin kullanılmasına yönelik klinik öncesi ve klinik çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalarda birçok kaynaktan elde edilen kök hücreler yine birçok hastalığın tedavisinde kaynak olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin farklılaşma potansiyellerini inceleyen çalışmalar son derece kısıtlıdır. Kök hücrelerin, çoğalma, morfolojik ve immünojenotipik özellikleri, farklılaşma kapasiteleri, elde edildikleri kaynaklara göre farklılıklar gösterebilir. Dolayısıyla farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin biyolojik özelliklerinin analizi, yenileyici ve onarıcı tıp için en uygun ve kullanılabilir kök hücre kaynağının tayini büyük önem taşımaktadır.

MKH'lerin ilk olarak elde edildiği kaynak kemik iliğidir. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler iyi tanımlanmış ve birçok çalışmada kullanılan ana kök kaynağı olmasına rağmen kemik iliği toplama yöntemi oldukça ağırlı ve invaziv bir yöntemdir. Ayrıca Kİ-MKH'lerin sayısı, çoğalması ve farklılaşma yeteneği donörün yaşı ile ters orantılıdır. Bütün bu olumsuzluklar göz önüne alındığında kemik iliğine alternatif MKH kaynaklarının tespiti önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılması öngörülen MKH'ler için en uygun kaynağın seçimine ışık tutmak amaçlanmıştır. Bu amaçla ulaşılması diğer kök hücre kaynaklarına oranla daha uygun ve kolay elde edilebilir olan insan adipoz doku, göbek kordon-warthon jeli, kıl folikülü, süt dişi, 20 yaş dişi ve kemik iliği kaynak olarak kullanılmıştır. Bu kaynaklardan elde edilen MKH'lerin daha önce eş zamanlı ve karşılaştırmalı olarak karakterizasyonları yapılmıştır. Bu hücrelere adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma işlemleri uygulanmış ve farklılaşma potansiyelleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak yukarıda bahsedilen kök hücre kaynaklarından elde edilen kök hücrelerin, kök hücre karakterleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş, hangi tür hücre tipine farklılaşma potansiyelinin daha iyi olduğu hakkındaki bilgiye ulaşmak hedeflenmiştir.

3. YÖNTEM

Bu çalışmada Kocaeli Üniversitesi KÖGEM’de daha önceki çalışmalar için doku kaynağına uygun izole edilmiş olan ve hücre kütüphanesine kazandırılan hücrelerden insan adipoz doku, süt dişi ve 20 yaş diş pulpası, kıl folikülü, göbek bağı Wharton Jeli ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin kullanımına yönelik etik kurul onayı KÜ GOKAEK 2017/8.36 no’lu karar ile alınmıştır. İzole edilen bu kök hücrelerin karakterizasyonları akış sitometri, immunohistokimya ve immunofloresan yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonu gerçekleştirilen MKH’lerin farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi için kimyasal uyarımla osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaştırmaları gerçekleştirilmiştir. Farklılaştırma sonrası, hücrelerin farklılaştığını gösterebilmek için farklılaşmaya özgü proteinlerin analizi ELİSA yöntemi ile yapılmıştır. Farklılaşmadan sorumlu genlerin ifadesi ise Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile gösterilmiştir.

3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

3.1.1. İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

Standart cerrahi insizyon ile sezaryen sırasında sağlıklı annelerin deri altı dokusundan adipoz dokusu alınmıştır. Alınan doku %10 penisilin/streptomisin içeren HBSS (Hanks’ balanced salt solution) içerisine alınarak laboratuvara getirilmiştir. Doku, kan ve atıkların uzaklaştırılması amacıyla %10 penisilin/streptomisin içeren HBSS (Invitrogen/Gibco) ile birkaç kez yıkanmıştır. Doku mekanik olarak parçalamak üzere bistüri yardımıyla yaklaşık 10 mm³lük parçalara ayrılmıştır. Enzimatik ayrıştırma amacıyla parçalanmış yağ dokusu 50 mL’lik tüplere alınıp üzerine %0.075 kollejenaz enzimi içeren HBSS solüsyonu eklenmiştir. Sonrasında 37 °C çalkalamalı su banyosunda 60 dakika enzimatik parçalanmanın gerçekleşmesi için bekletilmiştir. Süre bitiminde hücreler 70 µm porlu hücre süzgeci ile süzülerek üzerine %1 penisilin/streptomisin ve %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen/Gibco) içeren 10 mL Eagle’s besiyeri (Invitrogen/Gibco,) eklenmiştir. Hücre süspansiyonu 10 dakika 300 x g’de santrifüj edilmiştir. Adipoz doku hücreleri birkaç kez MEM (Minimal Essential Medyum) (Invitrogen/Gibco) ile yıkanıp 25 cm²’lik hücre kültür kaplarına ekilmiş ve 37 °C’de %5 CO₂’e sahip nemli ortamda kültüre edilmiştir. Üç gün sonrasında yine aynı içeriğe sahip yeni besiyeri ile besiyeri değişimi gerçekleştirilmiştir. Mikroskop ile kontrol edilen

hücreler kültür kabının tabanını %70 oranında kapladığında %0.25 trypsin-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (Invitrogen/Gibco) ile 5 dakika bekletilmiştir. Bu şekilde kültür kabına yapışan hücreler kültür kabından kaldırılıp yeniden kültüre edilmiştir. Bu işlem alt-kültür (pasaj) (P) olarak değerlendirilmiştir. Tripan mavisi boyası ile sayımı yapılan $0,5-1 \times 10^6$ hücrenin kültür kaplarına (T75) (BD Biosciences Labware, Le Pont De Claix, France) ekimi yapılmıştır.

3.1.2. İnsan Süt Dişi Dental Pulpası ve 20-Yaş Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

İnsan süt dişi ve 20-yaş diş pulpası kök hücrelerinin elde edilebilmesi için; diş hekimliğinde kullanılan steril frezler ile kronun kökten ayrılması ile pulpa dokusu ortaya çıkarılmış ve bu dokudan pulpa kök hücreleri elde edilmiştir. Kullanılan dişlerin hiçbirinde çürük ve dolgu olmamasına dikkat edilmiştir. Alınan dokular, %10 penisilin/streptomisin içeren HBSS içinde çözülmüş olan 2 mg/ml tip 1 kollejenaz (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA) içinde 37 °C'de 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Süre bitiminde pulpa materyalini içeren solüsyon 70µm' lik porları olan süzgeçten (BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA) geçirilmiştir. Süzülen hücreler 2-3 kez PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkandıktan sonra 15 ml'lik tüpe (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA) alınmış üzerine 4 ml HBSS konulmuş ve 1800 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst sıvı kısım (süpernatant) atılmış ve bir kez daha PBS ile yıkanmıştır. Son yıkama işleminden sonra elde edilen hücreler %1 penisilin/streptomisin (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA) ve %15 FBS (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA) içeren MEM-Earle besiyerinde (Biochrom AG, Berlin, Germany) T-25 kültür kaplarında 37 °C'de %5 CO₂'e sahip nemli ortamda (inkübatör) kültüre edilmiştir. Yaklaşık 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek kültür kabının tabanına yapışmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Sonraki günlerde inverted mikroskop ile düzenli olarak kontrol edilip haftada 2 kez olmak üzere besiyerleri değiştirilmiştir. Kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücrelerle kaplandığında (yaklaşık 16-18 gün sonra) %0.25'lik tripsin-EDTA (Gibco Invitrogen) ile pasajları yapılmıştır. Hücre sayımı tripan mavisi boyası ile yapılmış olup, $0,5-1 \times 10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

3.1.3. İnsan Kıl Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü

Micropunch tekniği ile yetişkin erkek saç derisi dokusundan elde edilen kıl kökleri serum fizyolojik içinde 50 mL'lik tüplere alınarak laboratuvara getirilmiştir. Laminar flow kabin altında, serum fizyolojik kıl köklerinden uzaklaştırılmış ve içerisinde %10 penisilin/streptomisin eklentisi bulunan HBSS ile petri kaplarına alınmıştır. Kıl kökleri bistüri kullanılarak ayrılmıştır. Ayrılan kıl kökleri %20 FBS ve %1 penisilin-streptomisin eklentisi içeren DMEM/F12 (Gibco Invitrogen) besiyeri içinde 37 °C'de %5 CO₂'e sahip nemli ortamda kültüre edilmiştir. Kültürün yaklaşık 16. gününde kıl folikülü etrafında ilk hücrelerin çoğalması ve migrasyonu gözlenmiştir. Kültürün 27. gününde kültür kabından kıl folikülü uzaklaştırılmış ve kültür kabına tutunan hücreler pasajlama işlemine alınmıştır.

3.1.4. İnsan Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü

Miyadında doğmuş bebeklerin atılacak olan göbek kordonu, steril bir makasla 12-13 cm kesilerek alınmış ve PBS içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Uygun koşullar altında alınan dokudan kan, doku ve pıhtı artıkları temizlenmiştir. Göbek bağından damar yapıları çıkarılmıştır. Göbek bağının iç kısmında kalan jelimsi kısım bistüri yardımı ile yaklaşık 0,5-1 cm'lik parçalara ayrılmıştır. Enzimatik olarak parçalanması amacıyla doku parçaları 37 °C'de 2-3 saat kollejenaz/tripsin karışımı (1:1) ile reaksiyona sokulmuştur. Süre bitiminde, pulpa materyalini içeren solusyon 70 µm porlu süzgeçten geçirilmiştir. Süzülen hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra 15 ml'lik tüpe alınıp 1800 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış ve pelet bir kez DMEM ile yıkanmış ve %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde %10 FBS içeren DMEM besiyerinde kültüre edilmiştir. Hücrelerin hücre kültür kabının tabanına yapışıp çoğalmaya başladığı invert mikroskop ile kontrol edilmiştir. Kültür kabının tabanını %70 kaplayan hücreler tripsin ile kaldırılarak pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.1.5. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü

İmmün/İdiopatik trombositopenik purpura (ITP) tanısı konulan hastaların *iliak krestinden* 2-4 ml kemik iliği aspire edilmiştir. Akım sitometri analizi ile bu hastaların sağlıklı olduğu gösterildikten sonra işleme alınmıştır. Kemik iliği 1:1 oranında serum

fizyolojik ile seyreltilmiştir. Karışım, 1:2 oranında Ficoll-Paque PLUS gradient (1.077 g/ml) (STEMCELL Technologies, Inc.) üzerine yayılmıştır. 15 dakika 500g de santrifüj edilmiştir. Ficoll ile serum arasında kalan bulutsu tabaka (düşük yoğunluktaki mononükleer hücreler) toplanarak iki kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler %1 penisilin/streptomisin ve %15 FBS içeren MEM-Earle besi yerinde, 1×10^6 hücre/cm² olacak şekilde T-25 kültür kabına alınmıştır ve 37 °C'de %5 CO₂'e sahip nemli ortamda kültüre edilmiştir. İstedığımız hücreler üç gün kültüre edildikten sonra mezenkimal kök hücrelerin kültür kabına yapışma özelliğinden yararlanılarak izole edilmiştir. Üçüncü gün eskiyen besiyeri hem yapışma özelliği göstermeyen hücreleri uzaklaştırmak hem de MKH'leri beslemek üzere taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Adherent hücreler kültür kabının tabanını %70 kapladığında tripsin ile kaldırılarak pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2. Hücrelerin Çözülerek Karakterizasyona ve Farklılaşmaya Hazırlanması

Kültür kabı yüzeyinin %70'ini kaplayan kök hücreler Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen PBS ile yıkanmış ve sonrasında yüzeyden tripsin yardımı ile kaldırılmıştır. Thoma lamı ile hücre sayısı belirlendikten sonra bir kriyovialde 3×10^6 olacak şekilde %60 bazal besiyeri, %35 FBS ve %5 DMSO (Dimetilsülfoksit) oranlarında hazırlanan dondurma besiyerinin içerisinde direk olarak -152 °C'de dondurularak saklanmışlardır.

Daha önceki çalışmalarda izole edilmiş olup fazlası KÖGEM hücre kütüphanesinde bulunan hücreler bu tez çalışması için çözüldü. Hücre çözmek için vialler dondurucudan çıkarıldıklarında hızlı bir şekilde 37 °C su banyosu içerisinde 1-2 dk karıştırılarak eritildi ve ardından serum içeren besiyeri ile muamele edildi. Hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek pelet haline getirildikten sonra Thoma lamında Tryphan Blue ile boyanarak canlılık oranları belirlendi ve T75 kültür kabına $0,5-1 \times 10^6$ canlı hücre olacak şekilde ekildi. Kültür kabının tabanını %70 kaplayan hücreler tripsin ile kaldırılarak pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Pasaj 3'de uygun koşullarda kültürüne devam edilen hücrelerin karakterizasyon ve farklılaştırma işlemlerine başlandı.

3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

3.3.1. Akım (Flow) Sitometrisi Yöntemi ile Karakterizasyon

Hücreler kültürde P3'e ve yeterli sıklıkta (konfluent) (%70) ulaştığında tripsin ile kaldırıldı. Hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra PBS ile iki kez

yıkandı. PBS içinde homojenize edilen hücelere izotiyosiyonat (FITC) ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikorlar (CD10, CD13, CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, HLA-ABC, CD7, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD106, HLA-DR, HLA-G ve CD117) ve uygun izotip kontrollerinden 10'ar µl eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilen hücelere yıkama solüsyonu (% 0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edildi (5 dk. 500g). Santrifüj sonrasında supernatant dökülüp, pelet 500 µl hücre yıkama solüsyonuyla yeniden karıştırıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında okutuldu. Analizi *BD Cell Quest TM software* programı ile gerçekleştirildi.

3.3.2. İmmunohistokimya/İmmunofloresan Yöntemi ile Karakterizasyon

MKH'ler P3'e geldiğinde immünohistokimyasal yöntemlerle karakterizasyonu yapılmak üzere poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Culture-Chamber-slide-8 well (24/pk)) 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücreler kültür kabına tutunmasının sağlanması için bir gece 37 °C'de ve %5 CO₂'e sahip nemli ortamda kültüre edildiler. İlk olarak hücreler metanolla +4 °C'de 5 dk fikse edildi. Fiksasyon sonrasında PBS ile 2 kere yıkanan hücreler %1,5 normal blok serum içeren PBS'de 30 dk. inkübe edildi. Antibody Diluent ile uygun oranlarda (Çizelge 3.1.) dilue edilen primer antikorlar (A-SMA, CD34, fibronektin, CD45, netsin, desmin, CD44, CD105 ve vimentin) eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. PBS ile 3x5dk yıkama işlemi yapıldı. Sonrasında immunfluoresans çalışmalar için uygun fluoresans (FITC) işaretli sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi. Nükleer boya ihtiva eden kapatma medyumu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatılarak fluoresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

İmmunohistokimya çalışmaları için streptavidin–peroxidase yöntemi (UltraVision Plus Large Volume Detection System Anti-Polyvalent HRP immunostaining Kit; Thermo Scientific, Cheshire, UK) kullanıldı. Hücreler %0,3 hidrojen peroksitli metanol içerisinde buz üzerinde 5 dk bekletildi ve 15 dk kuruması için bekletildi. PBS ile yıkanan hücreler Ultra V Blok ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında primer antikor ile (dilüsyon oranları Çizelge 3. 1'de verildi) 4°C'de bir gece bekletildi. Diğer gün primer antikor uzaklaştırıldıktan sonra hücreler biyotinlenmiş sekonder antikor ile 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 15 dk oda sıcaklığında streptavidin peroxidaz uygulanan hücrelerin AEC kiti (Zymed Laboratories) ile sinyalleri tespit edildi ve çekirdek boyası olarak H&E (Hematoksilin-Eosin) kullanıldı.

Çizelge 3.1. İmmünohistokimya ve immünofluoresan antikorlarının dilüsyon oranları ve kaynağı

Belirteç adı	Dilüsyon oranı	Kaynağı
α -SMA	1:800	Thermo Scientific
CD34	1:150	Santa Cruz Biotechnology
CD44	1:150	Thermo Scientific
CD45	1:150	Santa Cruz Biotechnology
CD105	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Desmin	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Fibronectin	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Nestin	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Vimentin	1:100	Santa Cruz Biotechnology

3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

3.4.1. Osteojenik Farklılaştırma

MKH'ler kültür kabının cm^2 ' sine 3000 hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Hücreler 4 hafta boyunca 100 nM deksametazon, 0.05 μM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate, %1 penisilin/streptomisin ve %10 FBS eklentili MEM besiyerinde CO_2 inkübatöründe kültüre edildi. Farklılaşma süresi sonunda hücreler Alizarin Red S ile boyandı.

3.4.2. Adipojenik farklılaştırma

MKH'ler kültür kabının cm^2 ' sine 3000 hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Hücreler üç hafta boyunca %10 FBS, 0,5 mM isobutyl-methylxanthine, 10^{-6}M deksametazon, 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 200 μM indomethacin ve 1% penisilin/streptomisin eklentili MEM besiyerinde kültüre edildi. Kültür sonrası hücre içi lipid vakuolleri mikroskopik olarak incelendi ve görüntüledi.

3.4.3. Kondrojenik farklılaşma

Kondrojenik farklılaştırma için mikropellet solüsyon tekniği kullanıldı. Bu yöntemde 5×10^6 hücre pellet halinde 15 ml'lik konik tabanlı tüpte ve 10×10^6 hücre peleti 10

mm'lik tek kuyucuklu petri gözünün ortasına küçük damlacık halinde koyularak kültüre edildi. Hücrelerin yapışmaları için 37°C de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler üç hafta 10 ng/ml dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1; Biosource PHG0021), 50 μ g/ml ascorbate-2-phosphate, 0.1 μ M deksametazon, 100 μ g/ml sodyum piruvat, 40 μ g/ml prolin, 50 mg/ml ITS premiks, 1% antibiyotik/antimikotik eklentili yüksek glikozlu DMEM besiyerinde kültüre edildi. Bu süre sonunda petride bulunan pelet Alsian mavisi boyası ile boyandı ve mikroskopik olarak incelenerek görüntülendi.

3.5. Farklılaşma Sonrası Analizler

3.5.1. ELİSA

Kültüre edilen hücrelerin besiyerleri toplanarak farklılaşma esnasında salınan osteojenik, adipojenik ve kondrojenik belirteçlere özgü proteinler ELİSA yöntemiyle tespit edildi. Osteojenik farklılaşma için; osteopontin (OPN) ve kollajen tip I (COLL1) (Bioassay Technology Laboratory ELISA kit) tayini yapıldı. Adipojenik farklılaşma için; adiponectin ve Leptin (Bioassay Technology Laboratory ELISA kit), kondrojenik farklılaşma için; kollajen tip II (COLL2) (Bioassay Technology Laboratory ELISA kit) tayini yapıldı. Öncelikle çalışmaya başlamadan önce bütün solüsyonlar oda ısısına getirildi. Her örnekten 40 μ l alınarak kitin içerisinde bulunan plakanın kuyucuklarına eklendi. İlgili antikorlardan 10'ar μ l ve 50'şer μ l streptavidin-HRP ilgili kuyucuklara eklendikten sonra 60 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 5x1 dk. yıkandı. Kit ile birlikte gelen substrate solution A ve substrate solution B sıvılarından her kuyucuğa 50 şer μ l eklenip 10 dk. 37°C'de ve karanlıkta inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50 μ l stop solution ilave edildikten sonra 450 nm dalga boyunda microplaka okuyucuda absorbansı ölçüldü.

3.5.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Farklılaşmalar esnasında hücrelerde gen düzeyinde meydana gelen değişimlerin saptanabilmesi için Real Time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile hücrelerin gen ifadeleri incelendi. Farklı insan dokularından elde edilen MKH'lerin adipojenik farklılaşma süreci sonrasında adipojenik farklılaşma belirteci olan ADFP, osteojenik farklılaşma sürecinden sonra osteojenik belirteçler olan BMP2, OPN ve cFOS, yine aynı şekilde kondrojenik farklılaşma süreci sonrası da Kollagen 2, referans gen olarak

da β -actin genlerinin ifade seviyelerine bakıldı (Çizelge 3.2). Hesaplamalar crossing point (Cp) değerine göre grafiklendi ve karşılaştırıldı.

iAD, iKİ, iKF, WJ, iSD-DP, i20y-DP kaynaklı MKH'ler osteojenik farklılaşma için 28. gün, adipojenik, ve kondrojenik farklılaşma ve kontrol grubu hücreleri kültürün 22. gününde tripsin ile kaldırıldı ve RNA izolasyon kiti ((High Pure RNA Isolation Kit, Roche) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Real Time PCR cihazında (Lightcycler 480, Roche) sıcaklık, enzim aktivasyonu için 95°C'de 10 dakika, denaturasyon 95°C'de 30 saniye, bağlanma için 55°C'de 30 saniye ve 60°C'de 1 dakika uzama olacak şekilde ayarlanarak 45 siklus (döngü) uygulandı.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri

GEN	PRİMER DİZİSİ
ADFP	ACACCCTCCTGTCAACATC
	AAGGGACCTACCAGCCAGTT
Collagen II	GGGAGTAATGCAAGGACCAA
	ATCATCACCAGGCTTTCCAG
Osteopontin	TGAAACGAGTCAGCTGGATG
	TGAAATTCATGGCTGTGGAA
BMP2	CCCCTTGGAGGAGAAACAA
	GCTGTTTGTGTTTGGCTTGA
cFos	AGAATCCGAAGGGAAAGGAA
	CTTCTCCTTCAGCAGGTTGG
B-actin	TGGCACCACACCTTCTACAATGAGC
	GCACAGCTTCTCCTTAATGTCACGC

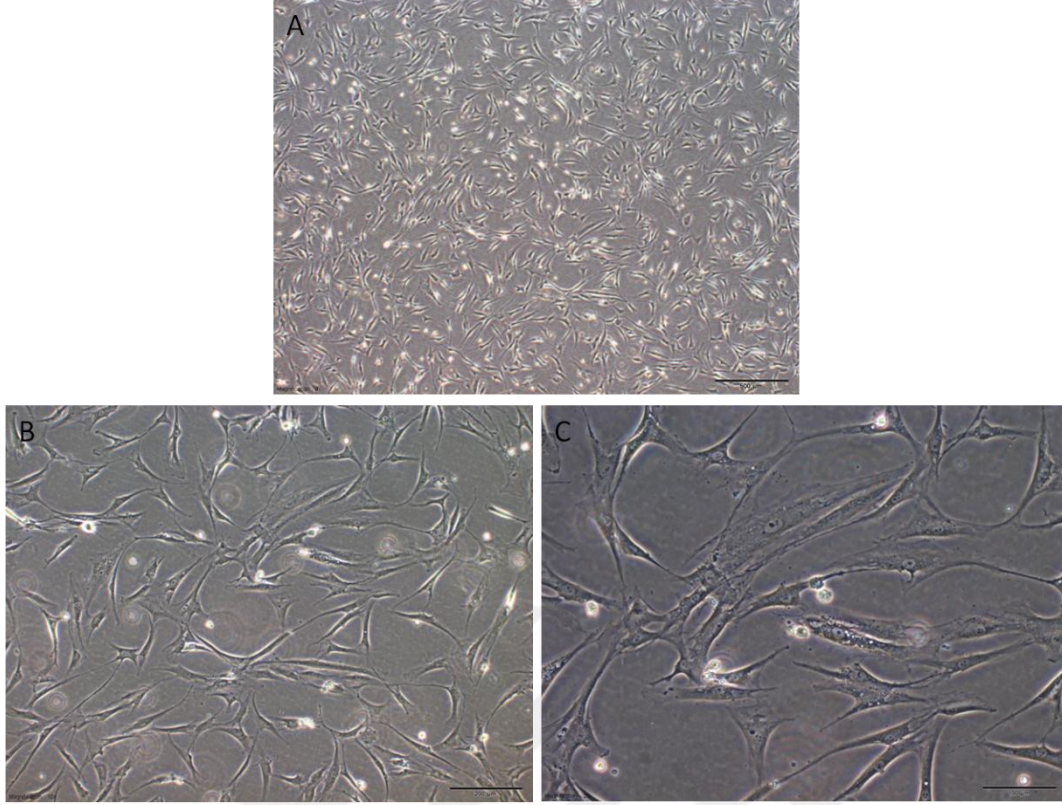
4. BULGULAR

Çalışmada klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılması planlanan uygun MKH kaynak ya da kaynakların seçiminde yol gösterici olmak amaçlanmıştır. Bu doğrultuda diğer kök hücre kaynaklarına göre daha kolay elde edilebilmesi ve uygulanabilirliğinin bulunması göz önünde bulundurularak insan adipoz doku, göbek kordon-warthon jeli, kıl folikülü, süt ve 20 yaş dişi, kemik iliği kaynak olarak kullanılmıştır. Bu kaynaklardan elde edilen MKH'ler eş zamanlı ve karşılaştırmalı olarak adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaştırmaya kimyasal yöntemlerle yönlendirilmiş ve farklılaşma potansiyelleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

4.1. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen MKH'lerin Kültürü

4.1.1. İnsan Kemik İliği-MKH'lerin Kültürü

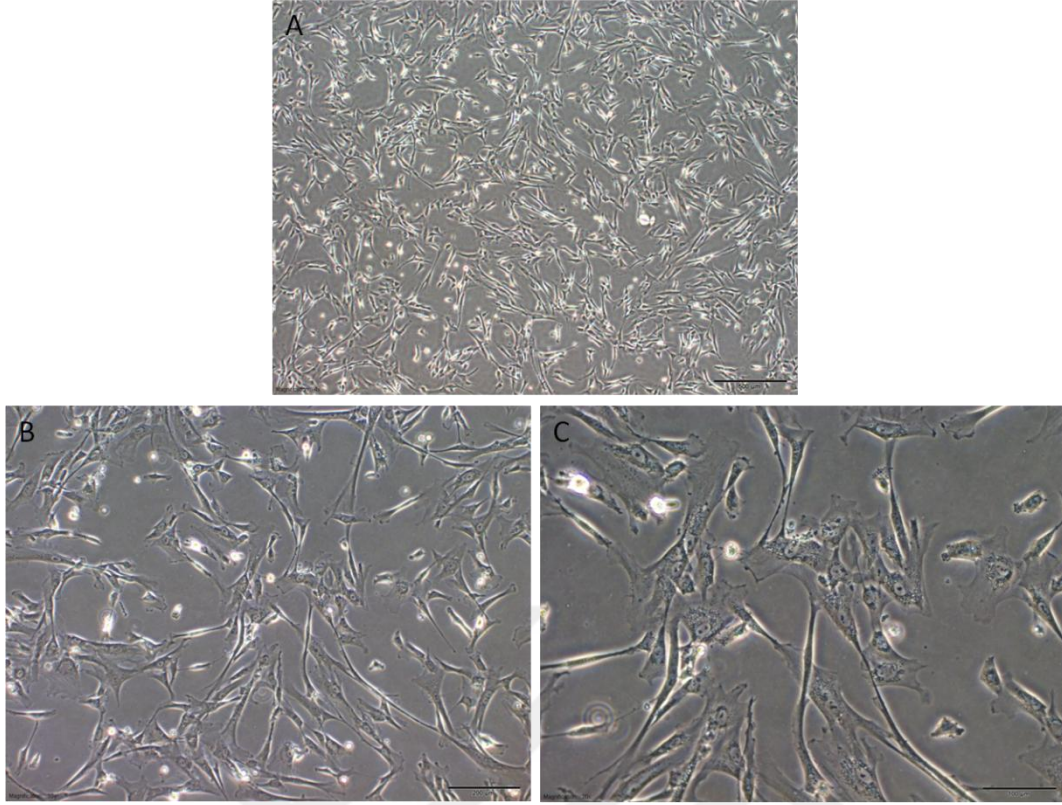
ITP tanısı konulan hastaların *iliak krestinden* aspire edilen kemik iliğinden, KÖGEM laboratuvarlarında ficoll-gradient (yoğunluk farkı) yöntemi ile ayrıştırılan mononükleer hücreler %15 FBS içeren kültür ortamında üç gün bekletildiklerinde MKH'lerin kültür kabına yapıştığı (adhere olduğu) gözlemlendi. Hücrelerin %70-80 oranında kültür kabını kapladığında pasajları yapılmış ve P2'ye gelen hücreler yöntemde anlatıldığı gibi dondurulmuştur. Bu çalışma için uygun yöntemle çözülen ve kültür kaplarına ekilen Kİ-MKH'leri 3 gün sonra tekrar kültür kabına yapışıp gerekli konfluensiye ulaştığında P3'e geçildi. Çözme sonrasında kök hücreye özgü morfolojilerinin yani iğsi yapı da denilen ince uzun fibroblast benzeri yapı gösterdiği görüldü (Çizim 4.1).



Çizim 4. 1 iKI-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri (Ölçü çubuğu: A 500µm, B 200 µm, C 100µm)

4.1.2. İnsan Wharton Jeli-MKH'lerin Kültürü

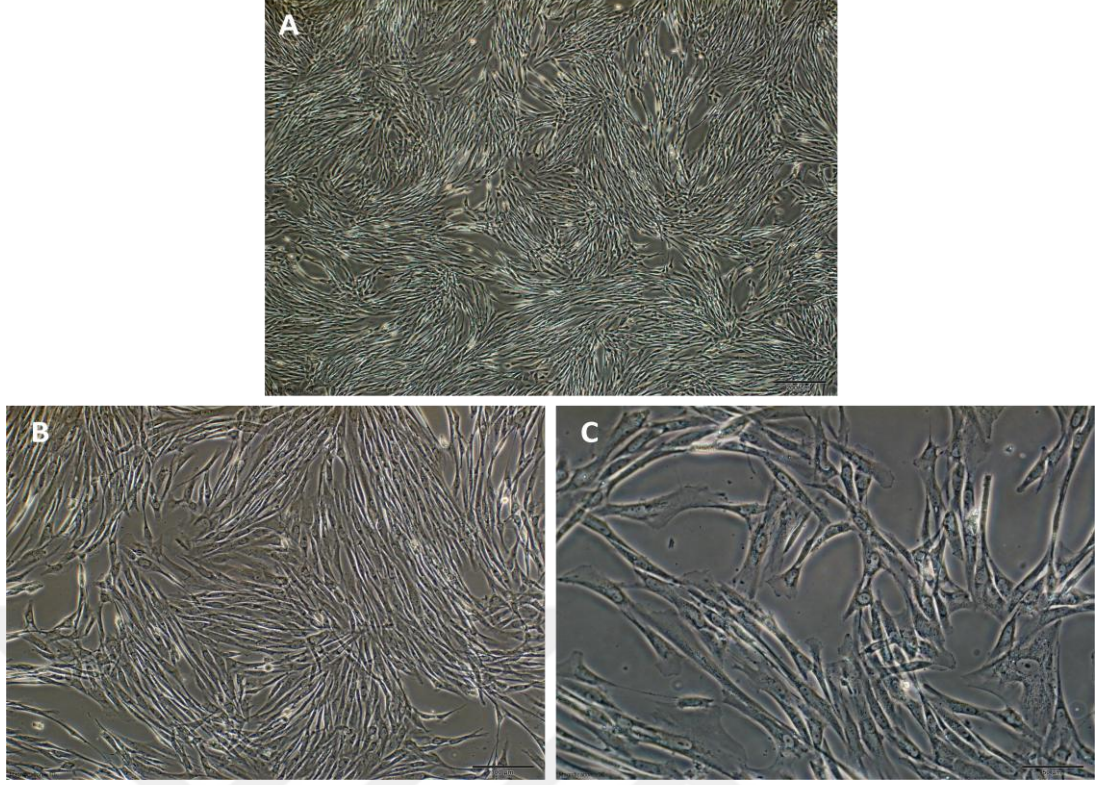
Miyadı tamamlanmış doğum sonrası elde edilen göbek bağı (kordon) dokusu kan, doku, pıhtı ve damar yapılarından ayrılmıştır. İç kısmında kalan jelimsi kısım çıkarılıp küçük parçalara ayrıldıktan sonra enzimatik yöntem ile izolasyonu gerçekleştirilmiştir. %10 FBS içeren kültür ortamında hücrelerin 4-5 gün sonra kültür kabına yapıştığı gözlemlenmiştir. Bu şekilde izole edilen hücreler dondurulmuş olup bu çalışma için uygun yöntemlerle çözüldü. Üçüncü günde kültür kabını kaplayan hücrelerin pasajlama işlemi sonrasında P3'e gelen hücrelerin morfolojisinin MKH'lerin tanımında da kullanılan fibroblast benzeri yapı gösterdiği inverted mikroskopta görüntülendi (Çizim 4.2).



Çizim 4. 2 iWJ-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri (Ölçü çubuğu: A 500 μm , B 200 μm , C 100 μm)

4.1.3. İnsan Kıl Folikülü-MKH'lerin Kültürü

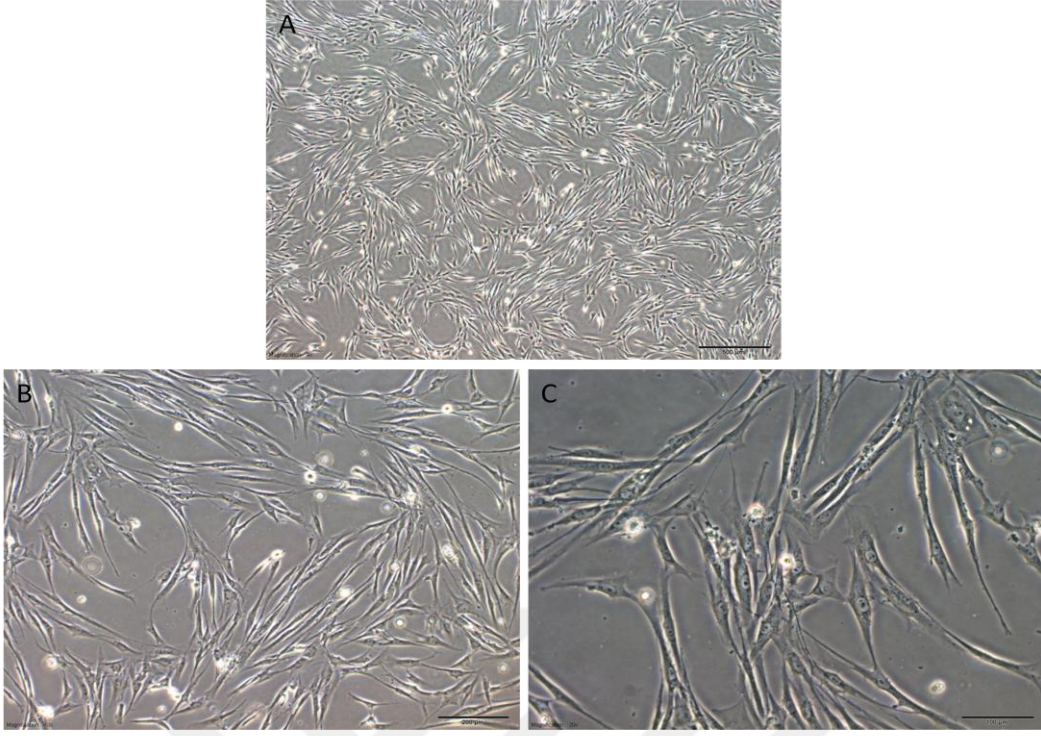
Micropunch yöntemi ile yetişkin erkek saç derisinden elde edilen saçlı deriden kıl kökleri bistüri yardımı ile ayrıştırılmıştır. İzole edilen kıl kökleri %20 FBS içeren besiyerinde kültüre edilmiştir. Kültürün yaklaşık onaltıncı gününde kıl folikülü etrafında ilk hücreler gözlenmiş ve de kültürün yirmiyedinci günü kıl folikülü kültür kabından uzaklaştırılmıştır. İzole edilen KF-MKH'leri dondurulmuş ve çalışma için uygun yöntemle tekrar çözülmüştür. Çözülme sonrası 4. günde gerekli konfluensiye ulaşan hücreler pasajlandı ve P3'e gelen hücrelerin dondurup çözülme sonrası fibroblast benzeri morfolojik görüntüsü inverted mikroskopta görüntülendi (Çizim 4.3).



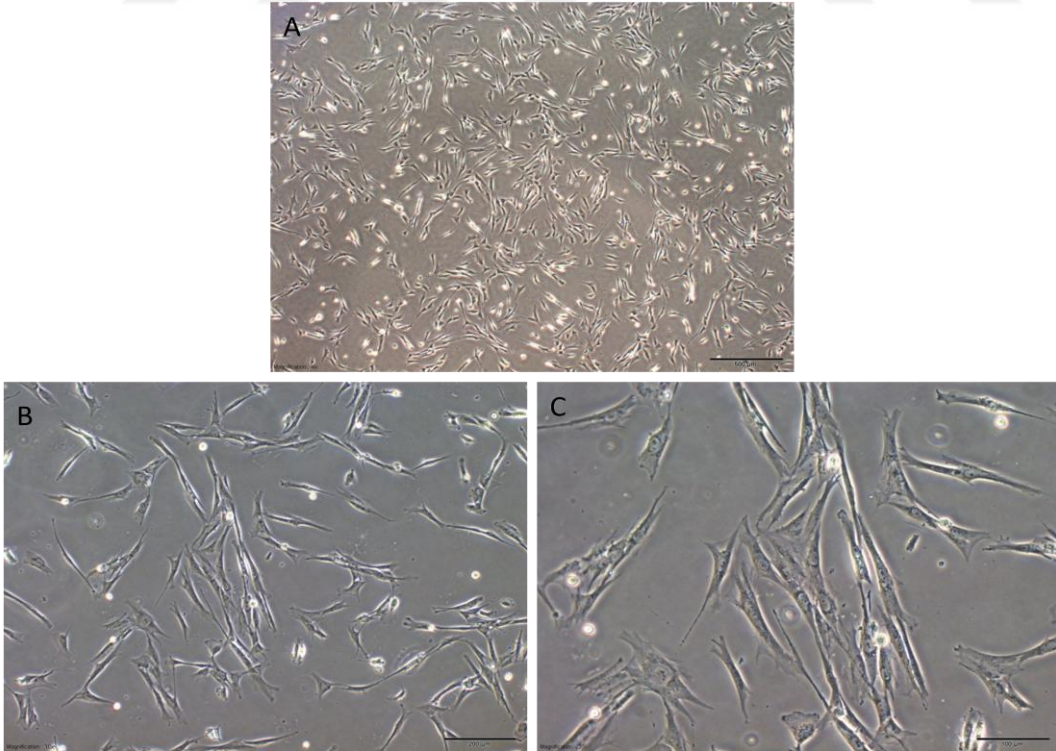
Çizim 4. 3 iKF-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri (Ölçü çubuğu: A 200 µm, B 100 µm, C 50 µm)

4.1.4. İnsan Süt Dişi ve 20-Yaş Diş Pulpası Kaynaklı MKH'lerin Kültürü

İnsan süt dişi ve 20-yaş dişlerinin kronun kökten ayrılmasıyla pulpa dokusu elde edilmiştir. Elde edilen dokulardan enzimatik yöntemle hücreler izole edilmiştir ve önceki çalışmalar için izole edilen hücrelerin fazlası dondurulmuştur. Bu tez çalışması için çözülen hücreler %15 FBS içeren besi ortamında kültüre alındı ve yaklaşık 4-5 gün sonra kültür kabına tekrar yapıştığı gözlemlendi daha sonra %70-80'ini kaplamasıyla pasajlandı. Çözünme sonrası da sağlıklı görünen hücrelerin P3'te fibroblast benzeri MKH'ye özgü morfolojileri inverted mikroskopta görüntülendi (Çizim 4.4 ve 4.5).



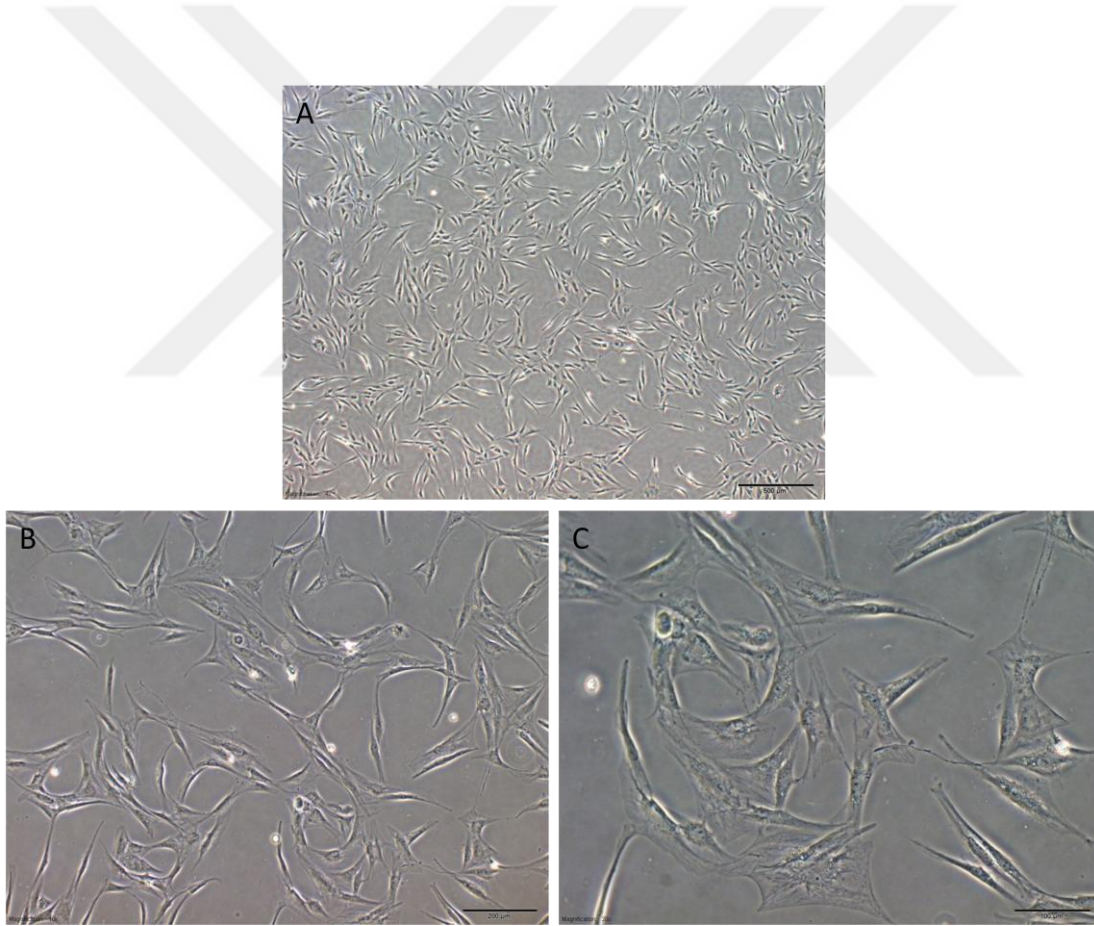
Çizim 4. 4 iDP (süt dişi)-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri (Ölçü çubuğu: A 500 μ m, B 200 μ m, C 100 μ m)



Çizim 4. 5 iDP (20 yaş)-MKH'lerin kültür kabındaki morfolojik görüntüleri (Ölçü çubuğu: A 500 μ m, B 200 μ m, C 100 μ m)

4.1.5. İnsan Adipoz Doku-MKH'lerin Kùltürü

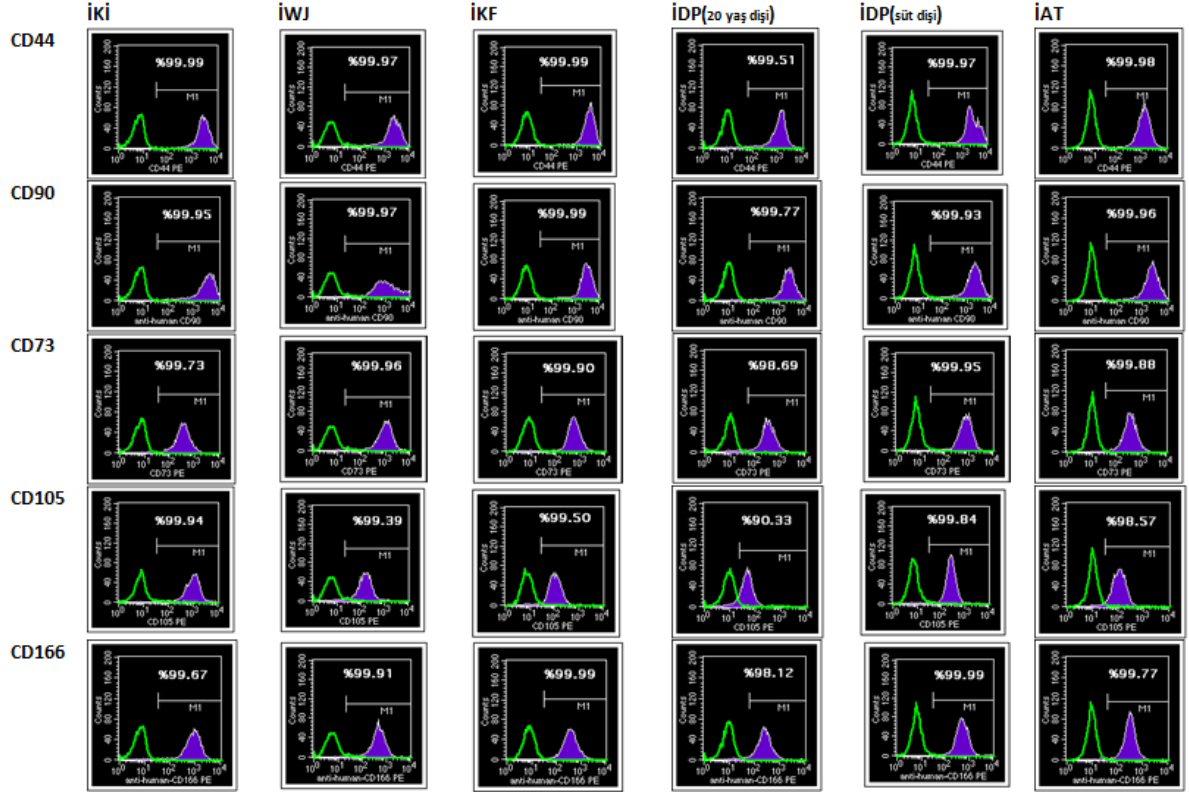
Sezaryen sırasında sağlıklı annelerin deri altı dokusundan standart cerrahi insizyon ile alınan doku, kan, doku ve diğer atıklardan uzaklaştırıldıktan sonra önce mekanik olarak parçalama işlemine tabi tutulmuş daha sonra da enzimatik olarak ayrıştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen hücreler %10 FBS içeren besi yerinde kùltüre alınmıştır. Önceki çalışmalar için fazla olup dondurulan iAD-MKH'leri bu çalışma için çözüldü. Yaklaşık 4 gün sonra hücreler %70 kùltür kabını kapladığında pasaj işlemi gerçekleştirildi. Pasaj 3'e gelen hücrelerin morfolojik görüntüsü inverted mikroskopla alındı (Çizim 4. 6). Adipoz dokusundan elde edilen hücrelerin morfolojisinin fibroblast benzeri yani MKH morfolojisini gösterdiği çözüldükten sonra hücrelerin zarar görmediği görüldü.



Çizim 4. 6 iAD-MKH'lerin kùltür kabındaki morfolojik görüntüleri (Ölçü çubuğu: A 500 μm , B 200 μm , C 100 μm)

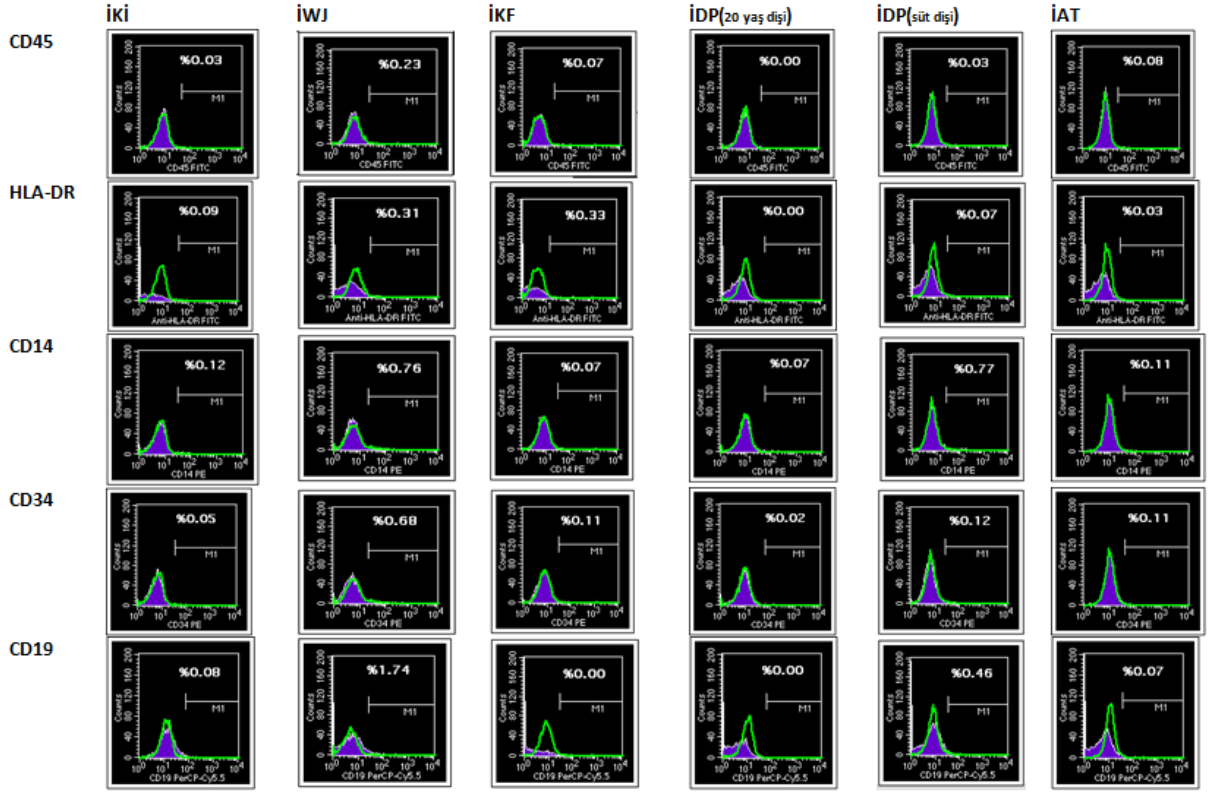
4.2. İzole Edilen MKH'lerin Akım Sitometrik Karakterizasyonu

İnsan adipoz doku, göbek kordon-warthon jeli, kıl folikülü, süt dişi, 20 yaş dişi ve kemik iliği kaynaklarından izole edilen MKH'ler taşıdıkları yüzey belirteçlerine göre karakterize edildi.



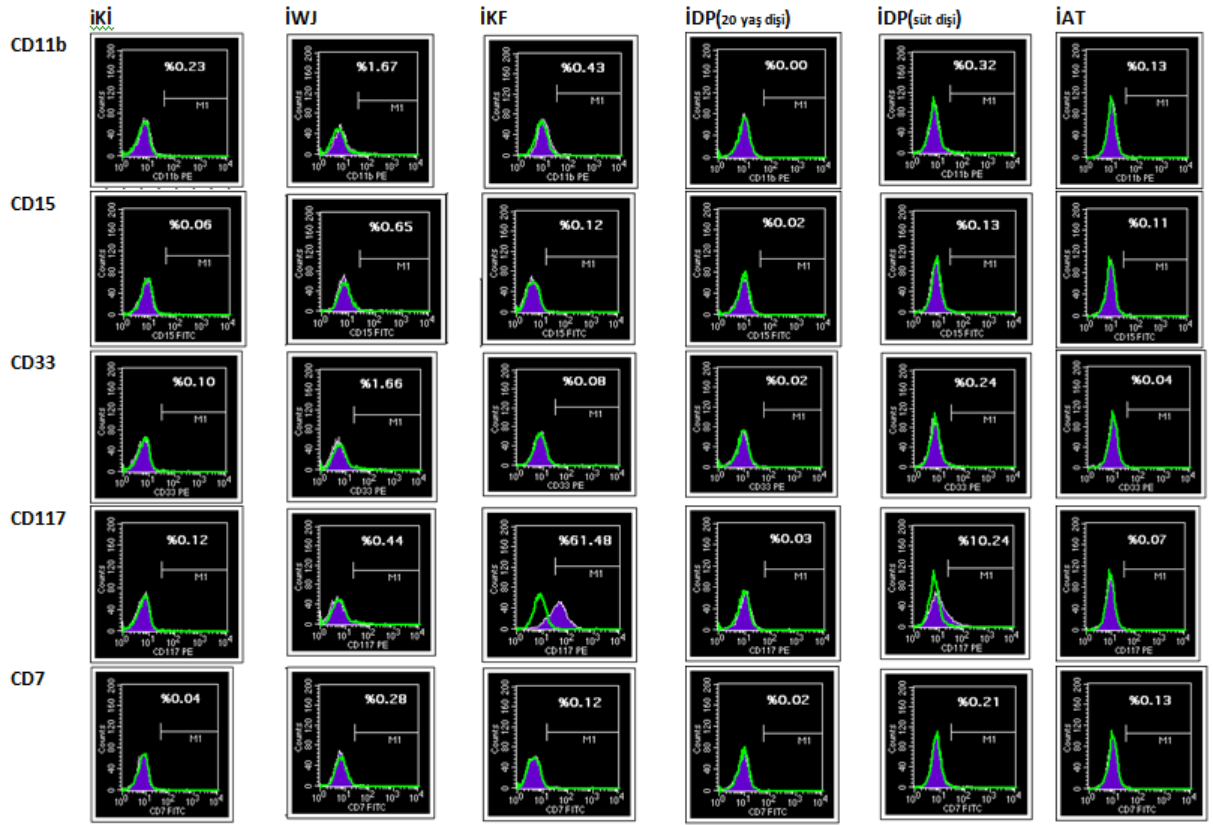
Çizim 4. 7 İnsan kemik iliği (iKi), insan göbek kordon-warthon jeli (iwJ), insan kıl folikülü (iKf), insan süt ve 20yaş dişi dental pulpa (iDP), insan adipoz doku (iAD) kaynaklarından izole edilen MKH'lerin, mezenkimal kök hücre belirteçlerinin flow sitometrik analizi. Yeşil pik: izotip kontrol, mor pik: ilgili antikora aittir.

Farklı kaynaklardan izole edilen (iKi, iwJ, iKf, iDP(20 yaş ve süt dişi), iAD) MKH'lerin tümünde CD44 için $\%99.90 \pm 0.1$, CD90 için $\%99.92 \pm 0.08$, CD73 için $\%99.68 \pm 0.4$, CD105 için $\% 97.92 \pm 3.75$, CD166 için $\%99.57$, CD29 için $\%99.88 \pm 0.16$ şeklinde ifade ettiği analiz edildi (Çizim 4.7 ve 4.11).

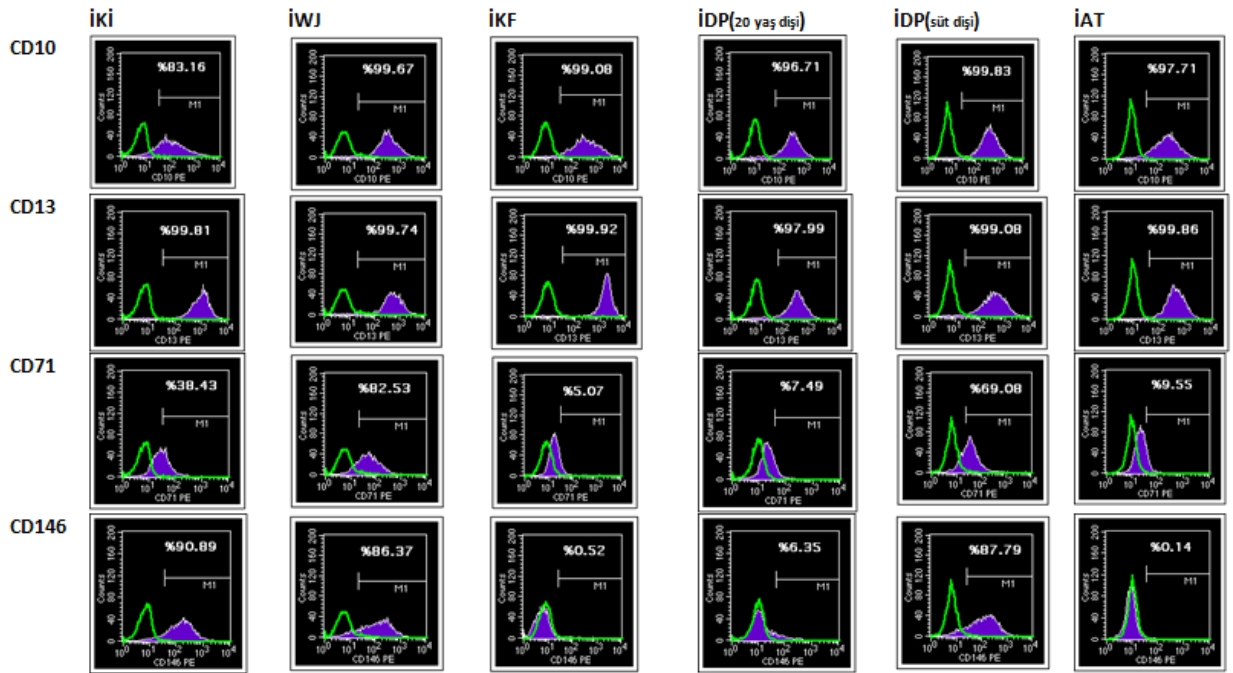


Çizim 4.8 İnsan kemik iliği (iKi), insan göbek kordon-warthon jeli (iWJ), insan kıl folikülü (iKF), insan süt ve 20yaş dişi dental pulpa (iDP), insan adipöz doku (iAD) kaynaklarından izole edilen MKH'lerin, hematopoetik hücre belirteçlerinin flow sitometrik analizi. Yeşil pik: izotip kontrol, mor pik: ilgili antikora aittir.

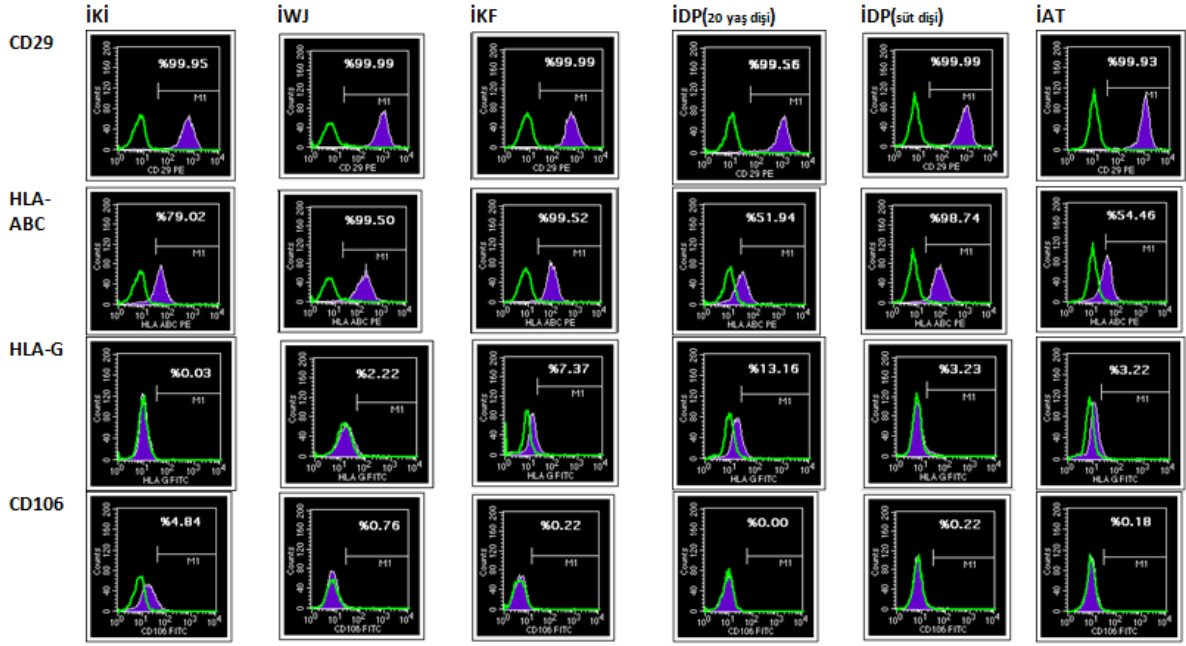
iKi, iWJ, iKF, iDP(20 yaş ve süt dişi), iAD) MKH'lerin hematopoetik belirteçlerini ifadesi şu şekildedir; CD45 0.07 ± 0.08 , HLA-DR 0.13 ± 0.14 , CD14 0.31 ± 0.34 , CD34 0.18 ± 0.24 , CD19 0.39 ± 0.68 , CD11b 0.46 ± 0.60 , CD33 0.35 ± 0.64 , CD7 0.13 ± 0.09 , CD15 0.18 ± 0.23 'dür. Ayrıca iKF ve iDP(süt dişi) hariç CD117 ifadesi %2'nin altında bulundu (Çizim 4.8 ve 4.9). İKF için CD117 ifadesi %61,48 iken süt dişi DP kaynaklı MKH'lerin CD117 ifadesi %10,24 olarak bulundu (Çizim 4.9).



Çizim 4. 9 İnsan kemik iliği (iKİ), insan göbek kordon-warthon jeli (iWJ), insan kıl folikülü (iKF), insan süt ve 20yaş dişi dental pulpa (iDP), insan adipoz doku (iAD) kaynaklarından izole edilen MKH'lerin, hematopoetik hücre belirteçlerinin flow sitometrik analizi. Yeşil pik: izotip kontrol, mor pik: ilgili antikordur.



Çizim 4. 10 İnsan kemik iliği (iKİ), insan göbek kordon-warthon jeli (iWJ), insan kıl folikülü (iKF), insan süt ve 20yaş dişi dental pulpa (iDP), insan adipoz doku (iAD) kaynaklarından izole edilen MKH'lerin, CD10, CD13, CD71, CD146 ifadesinin flow sitometrik analizi. Yeşil pik: izotip kontrol, mor pik: ilgili antikora aittir.



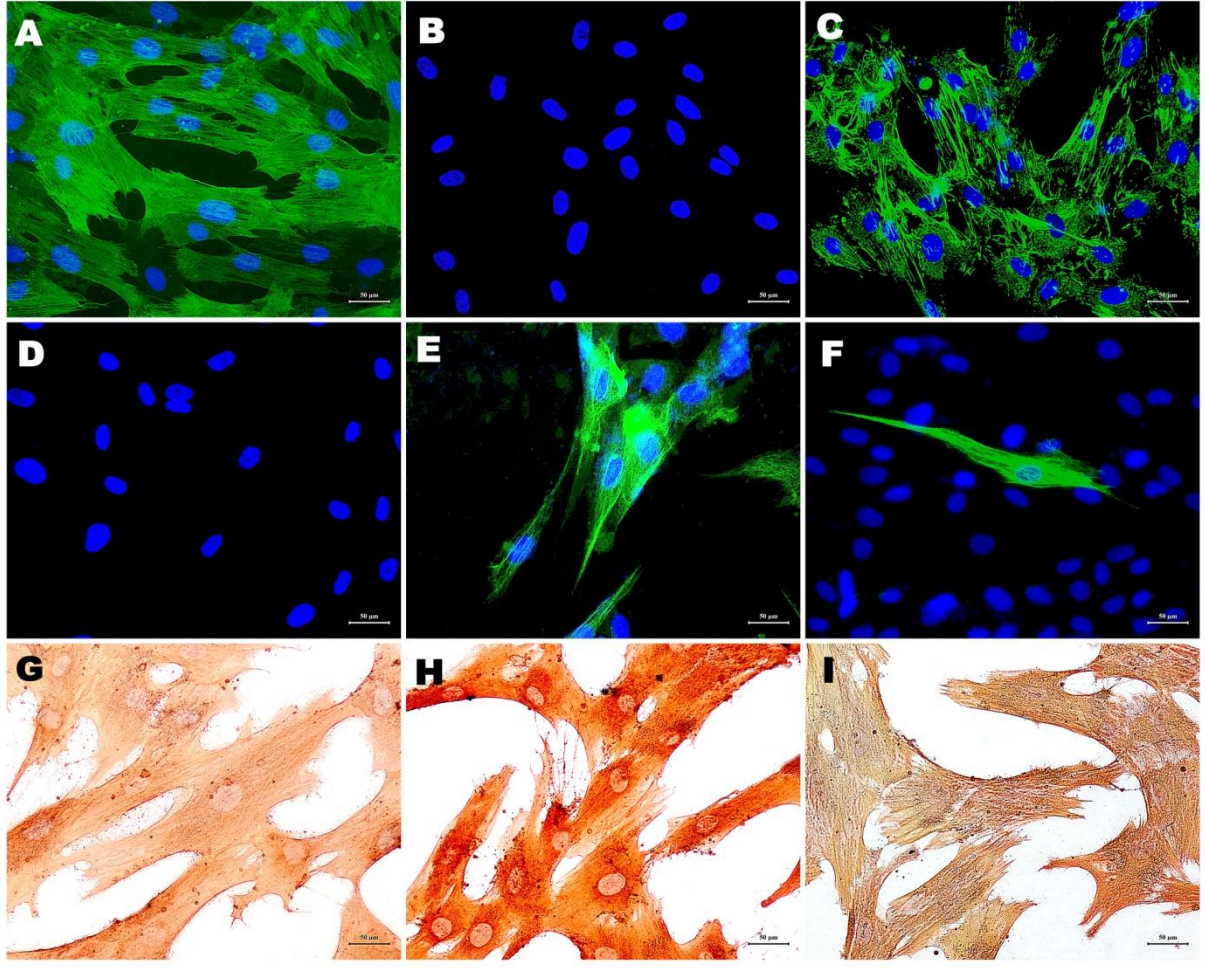
Çizim 4. 11 İnsan kemik iliği (İKİ), insan göbek kordon-warthon jeli (İWJ), insan kıl folikülü (İKF), insan süt ve 20yaş dışı dental pulpa (İDP), insan adipöz doku (İAD) kaynaklarından izole edilen MKH'lerin, CD29,CD106, HLA-ABC ve HLA-DR ifadesinin flow sitometrik analizi. Yeşil pik: izotip kontrol, mor pik: ilgili antikora aittir.

İzole edilen altı farklı kaynaktan elde edilen MKH'ler kaynaklandıkları dokulara göre farklılık gösteren belirteçlerin ifadesi; CD106 için 1.04 ± 1.71 , CD10 için 96.03 ± 5.85 , HLA-G için 4.87 ± 4.29 , HLA-ABC için 80.53 ± 20.62 , CD13 için 99.4 ± 0.69 şeklinde elde edildi (Çizim 4.10 ve 4.11). CD71 belirteçi İKİ, İWJ, İDP (süt dışı)'den elde edilen MKH'ler için 63.35 ± 18.45 , İKF, İDP (20 yaş), İAD'dan elde edilen MKH'ler için 7.37 ± 1.83 olarak elde edildi (Çizim 4.10). CD146 belirteçi ise İKİ, İWJ, İDP(süt dışı)'den elde edilen MKH'ler için 88.35 ± 1.88 , İKF, İDP (20 yaş), İAD'dan elde edilen MKH'ler için 2.34 ± 2.84 olarak elde edildi (Çizim 4.10).

4.3. İzole Edilen MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonları

4.3.1. İnsan Kemik İliği-MKH'lerinin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

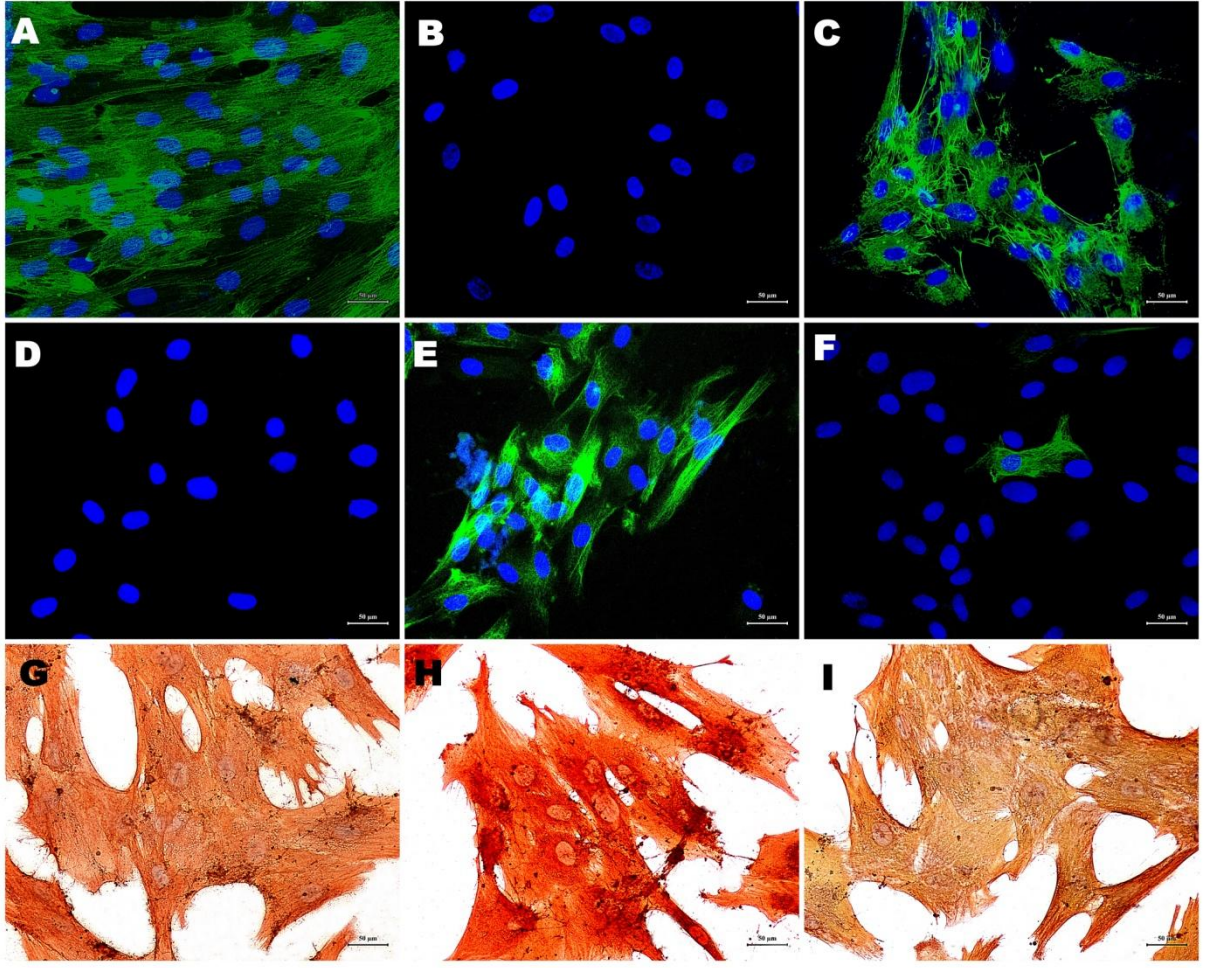
İKİ-MKH'leri immünofenotipik karakterizasyonlarını yapmak amacıyla alfa smooth muscle actin (α -SMA), fibronektin, nestin, desmin, CD34, CD45 immünflouresan yöntemle ve CD44, CD105, vimentin ise immünohistokimyasal yöntem ile işaretlendi. İKİ-MKH'lerinin α -SMA fibronektin, nestin, desmin, CD44, CD105 ve vimentin ile boyandığı, CD34 ve CD45 boyamasının da negatif olduğu gösterildi (Çizim 4.12) (Çizelge 4.1).



Çizim 4. 12 iK1-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi (A) α SMA, (B) CD34, (C) Fibronektin, (D) CD45, (E) Nestin, (F) Desmin, (G) CD44, (H) CD105, (I) Vimentin (A, B, C, D, E ve F'deki antikorlar yeşil (FITC konjuge) ve çekirdekleri mavi (DAPI) ile gösterilmektedir.). Tüm görüntüler için ölçek çubuğu 50 μ m'dir.

4.3.2. İnsan Wharton Jeli-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

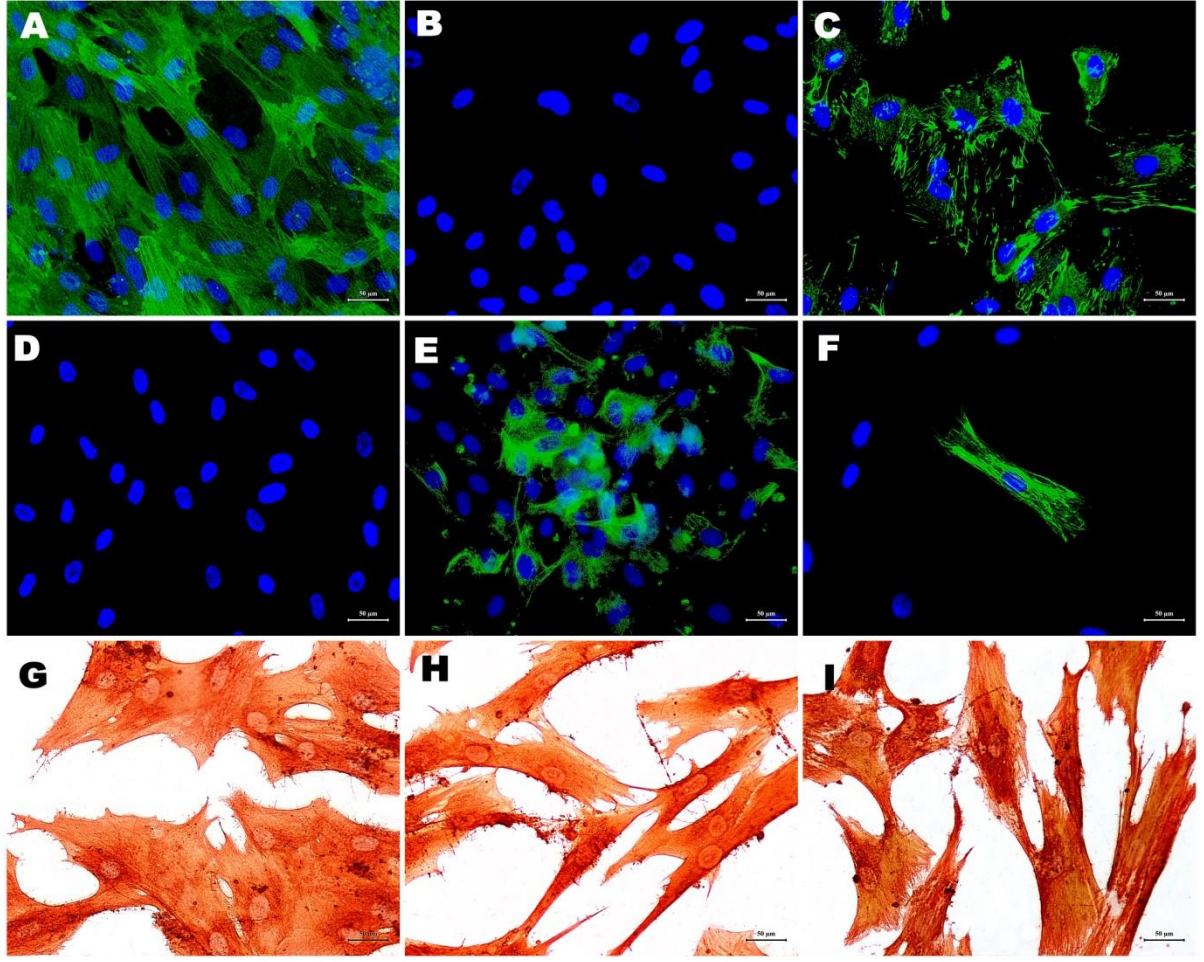
iWJ-MKH'lerinin immünofenotipik karakterizasyonlarını yapmak amacıyla P3'e gelen hücreler immünofloresan yöntem ile α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD34, CD45 ve immünohistokimyasal yöntem ile CD44, CD105 ve vimentin işaretlendi. iWJ-MKH'lerinin α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD44, CD105 ve vimentin ile boyandığı, CD34 ve CD45 boyamasının da negatif olduğu tespit edildi (Çizim 4.13) (Çizelge 4. 1).



Çizim 4. 13 iWJ -MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi (A) α -SMA, (B)CD34, (C) Fibronektin, (D) CD45, (E) Nestin, (F) Desmin, (G) CD44, (H) CD105, (I) Vimentin (A,B,C,D,E ve F'deki antikorlar yeşil(FITC konjuge)ve çekirdekleri mavi(DAPI) ile gösterilmektedir.). Tüm görüntüler için ölçek çubuğu 50 μ m'dir.

4.3.3. İnsan Kıl Folikülü-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

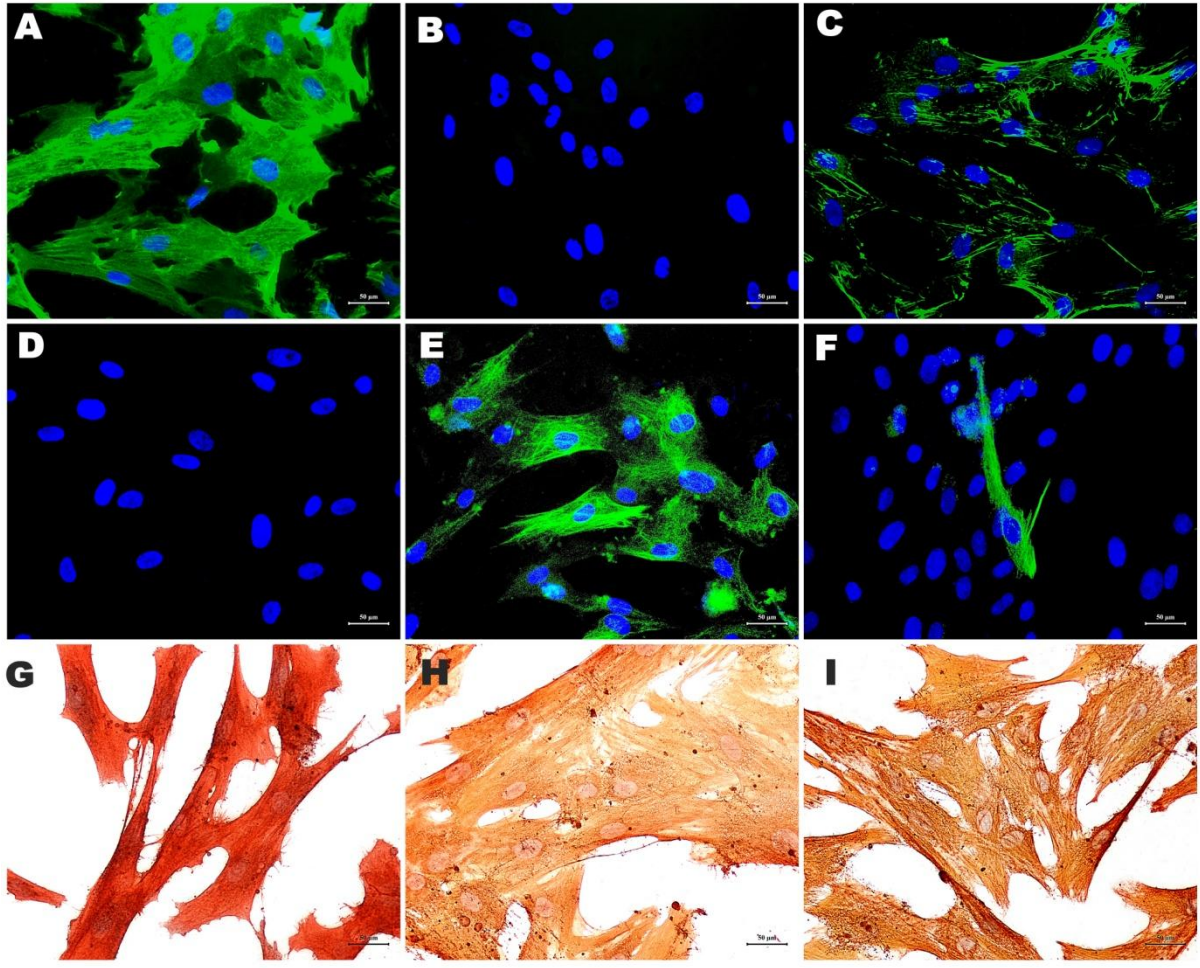
iFİ-MKH'lerinin immünofenotipik karakterizasyonunda α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD34, CD45 immünfloresan yöntemle ve CD44, CD105, vimentin ise immünohistokimyasal yöntem ile işaretlendi. Pasaj 3'e gelen iKF-MKH'lerinin α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD44, CD105 ve vimentin ile boyandığı, CD34 ve CD45 boyamasının da negatif olduğu gösterildi (Çizim 4.14) (Çizelge 4. 1).



Çizim 4. 14 iKF-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi (A)A-SMA, (B)CD34, (C) Fibronektin, (D) CD45, (E) Nestin, (F) Desmin, (G) CD44, (H) CD105, (I) Vimentin (A,B,C,D,E ve F'deki antikorlar yeşil(FITC konjuge)ve çekirdekleri mavi(DAPI) ile gösterilmektedir.). Tüm görüntüler için ölçek çubuğu 50 μ m'dir.

4.3.4. İnsan 20 Yaş dışı DP-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

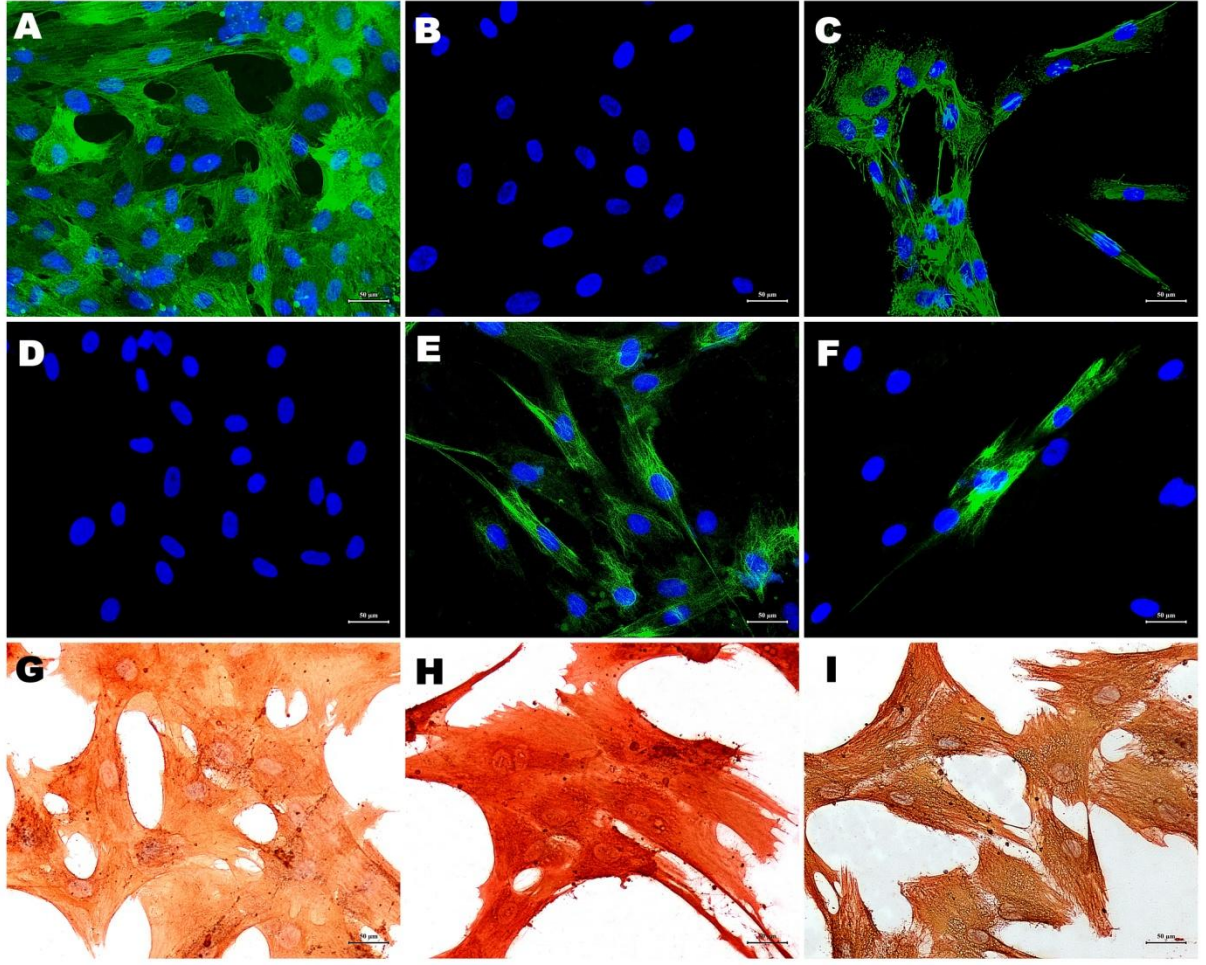
iDP (20 yaş)-MKH'lerinin immünofenotipik karakterizasyonu için hücreler pasaj 3'e geldiğinde α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD34, CD45 immünfloresan yöntemle ve CD44, CD105, vimentin ise immünohistokimyasal yöntem ile işaretlendi. iDP (20yaş)-MKH'lerinin α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD44, CD105 ve vimentin ile boyandığı, CD34 ve CD45 boyamasının negatif olduğu gösterildi (Çizim 4.15) (Çizelge 4.1)



Çizim 4. 15 iDP(20yaş)-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi (A)A-SMA, (B)CD34, (C) Fibronektin, (D) CD45, (E) Nestin, (F) Desmin, (G) CD44, (H) CD105, (I) Vimentin (A,B,C,D,E ve F'deki antikorlar yeşil(FITC konjuge)ve çekirdekleri mavi(DAPI) ile gösterilmektedir.). Tüm görüntüler için ölçek çubuğu 50 µm'dir.

4.3.5. İnsan Süt Dişi DP-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

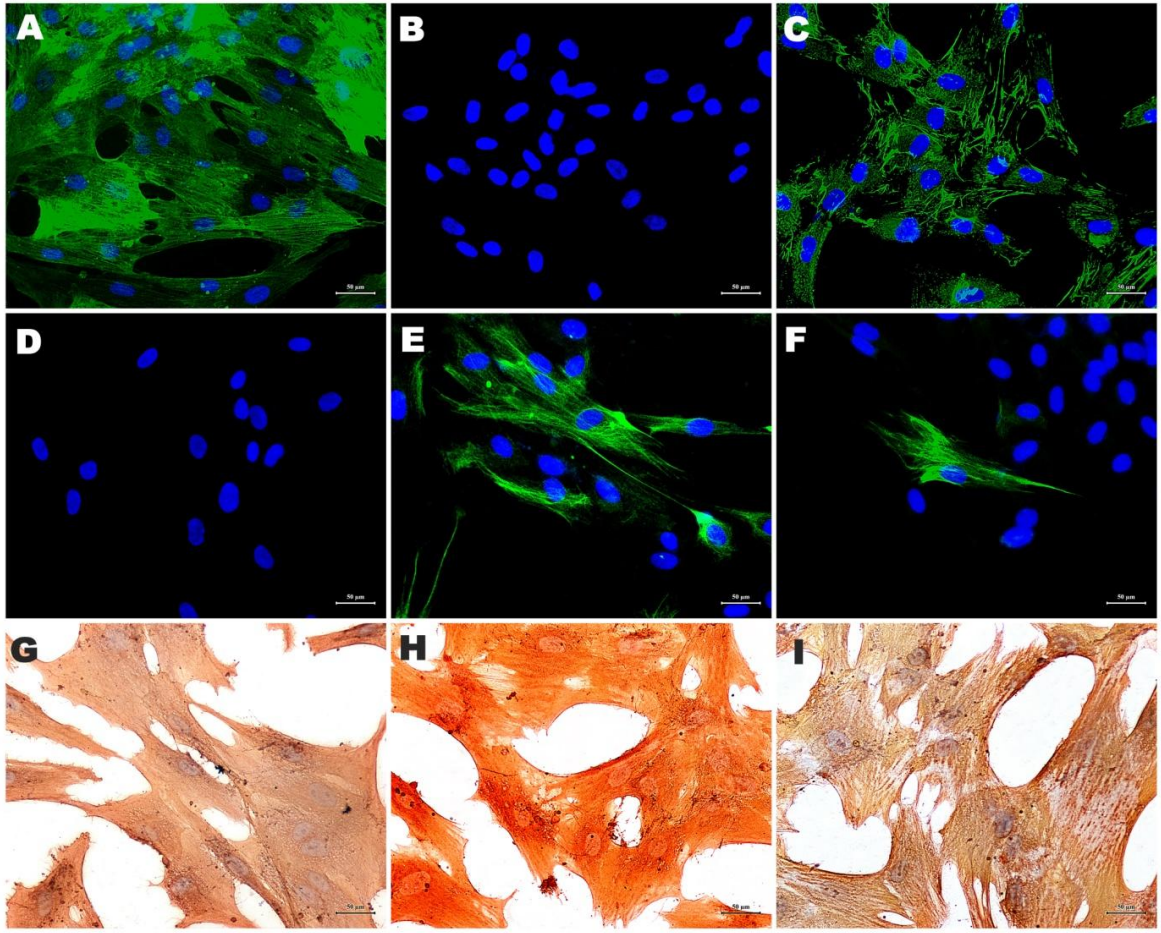
iDP (süt dişi)-MKH'lerinin immünofenotipik karakterizasyonunu yapmak amacıyla pasaj 3'e gelen hücreler α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD34, CD45 immünofloresan yöntemle ve CD44, CD105, vimentin ise immünohistokimyasal yöntem ile işaretlendi. iDP (süt dişi)-MKH'lerinin α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD44, CD105 ve vimentin belirteçleri ile boyandığı, CD34 ve CD45 boyamasının da negatif olduğu gösterildi (Çizim 4.16) (Çizelge 4. 1).



Çizim 4. 16 iDP(süt dişi)-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi (A)A-SMA, (B)CD34, (C) Fibronektin, (D) CD45, (E) Nestin, (F) Desmin, (G) CD44, (H) CD105, (I) Vimentin (A,B,C,D,E ve F'deki antikorlar yeşil(FITC konjuge)ve çekirdekleri mavi(DAPI) ile gösterilmektedir.). Tüm görüntüler için ölçek çubuğu 50 µm'dir.

4.3.6. İnsan Adipoz Doku-MKH'lerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

iAD-MKH'lerinin immünofenotipik karakterizasyonunda hücreler α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD34, CD45 immünofloresan yöntemle ve CD44, CD105, vimentin ise immünohistokimyasal yöntem ile işaretlendi. iAD-MKH'lerinin α -SMA, fibronektin, nestin, desmin, CD44, CD105 ve vimentin belirteçleri ile boyandığı, CD34 ve CD45 boyamasının da negatif olduğu gösterildi (Çizim 4.17) (Çizelge 4. 1).



Çizim 4. 17 iAD-MKH'lerinin immünfloresan ve immünohistokimyasal boyamalar ile gösterilmesi (A)A-SMA, (B)CD34, (C) Fibronektin, (D) CD45, (E) Nestin, (F) Desmin, (G) CD44, (H) CD105, (I) Vimentin (A,B,C,D,E ve F'deki antikorlar yeşil(FITC konjuge) ve çekirdekleri mavi(DAPI) ile gösterilmektedir.). Tüm görüntüler için ölçek çubuğu 50 μm 'dir

Çizelge 4. 1 Tüm MKH gruplarının immünohistokimyasal özelliklerinin gösterilmesi. (+++) güçlü pozitif belirteç ifadesi, (++) pozitif belirteç ifadesi, (+-) zayıf belirteç ifadesi ve (-) belirteç ifadesi görülmemektedir.

Belirteç adı	iKİ-MKH	iWJ-MKH	iKF-MKH	iDP (20 yaş)-MKH	iDP (süt dişi) - MKH	iAD-MKH
α-SMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD34	-	-	-	-	-	-
CD44	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CD45	-	-	-	-	-	-
CD105	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Desmin	+-	+-	+-	+-	+-	+-
Fibronektin	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Nestin	++	+++	++	+++	+++	++
Vimentin	+++	+++	+++	+++	+++	+++

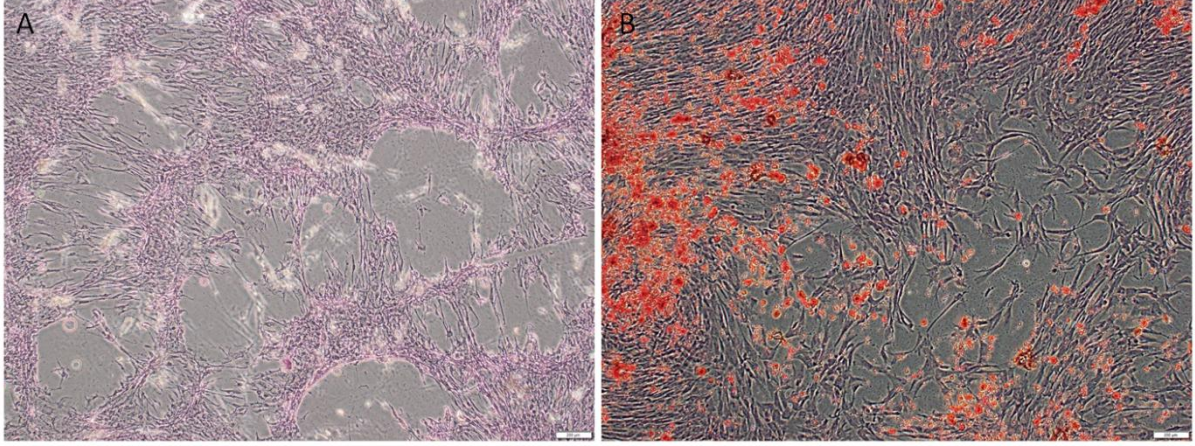
4.4. Farklı Kaynaklarından İzole Edilen Kök hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin Karşılaştırılması

Bu bölümde insan kemik iliği, Wharton jeli, kıl folikülü, 20 yaş dişi dental pulpası, süt dişi dental pulpası ve adipoz dokudan izole edilen MKH'lerin kimyasal uyarılmasıyla osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaları sağlandı. Osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma süreleri sırasıyla dört, üç ve üç hafta olan hücrelerin farklılaşma potansiyelleri karşılaştırmalı olarak incelendi. Kontrol olarak kullanılan MKH'ler ise kimyasal uyarılmaya alınmamış ilgili kaynağa ait hücrelerdir. Bu kaynaklardan elde edilen MKH'lerin farklılaşma bulguları şu şekildedir.

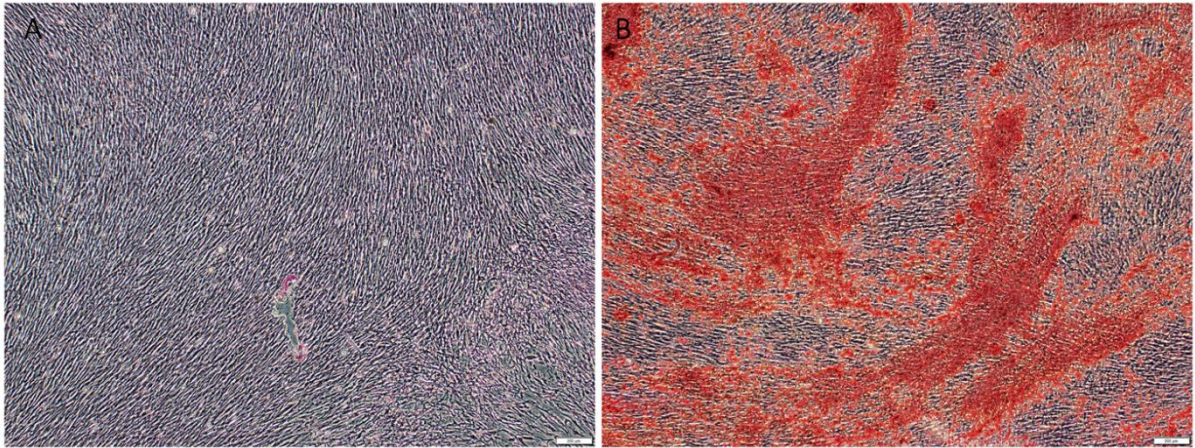
4.4.1. İzole Edilen Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

4.4.1.1. *İmmunohistokimya yöntemiyle osteojenik farklılaştırma*

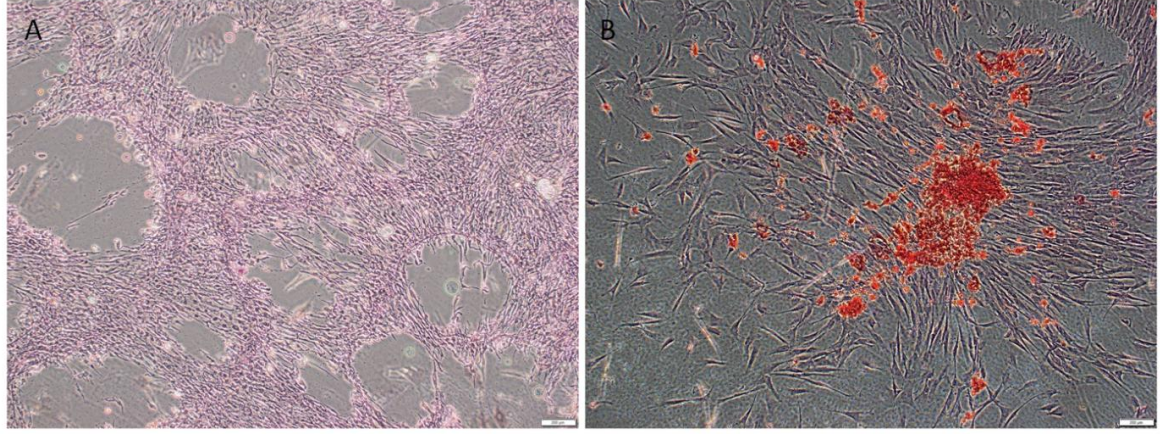
iKİ, iWJ, iKF, iDP (20yaş), iDP (süt dişi) ve iAD kaynaklarından izole edilen MKH'lerin osteojenik farklılaşmalarını değerlendirmek için kemiğe özgü belirteçlerini immünohistokimyasal olarak tespit etmek üzere osteojenik farklılaşma besiyerinde ve kontroller normal besiyerinde kültür edildi. Her iki kültürün çoğalma ve farklılaşması belirli aralıklarla faz-kontrast mikroskop ile kontrol edilerek karşılaştırıldı. Hem kontrol hem de osteojenik kültürdeki hücreler 9-10 günlük inkübasyon sonrası çoğaldı ve hemen hemen tam bir konfluensiye ulaştı. Daha sonra osteojenik farklılaşma kültür plaklarında hücresel agregatlar gözlemlendi ve deney tamamlanana kadar yavaş yavaş arttı. Osteojenik ortamdaki kültürde oluşan bu agregatlar Alizarin red S boyanmasıyla kalsiyum nodülleri olduğu gösterildi. 28. günde Alizarin red S en yoğun şekilde gözlenirken kontrol gruplarında boyanma olmadığı invert mikroskopta gösterildi (Çizim 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22 ve 4.23).



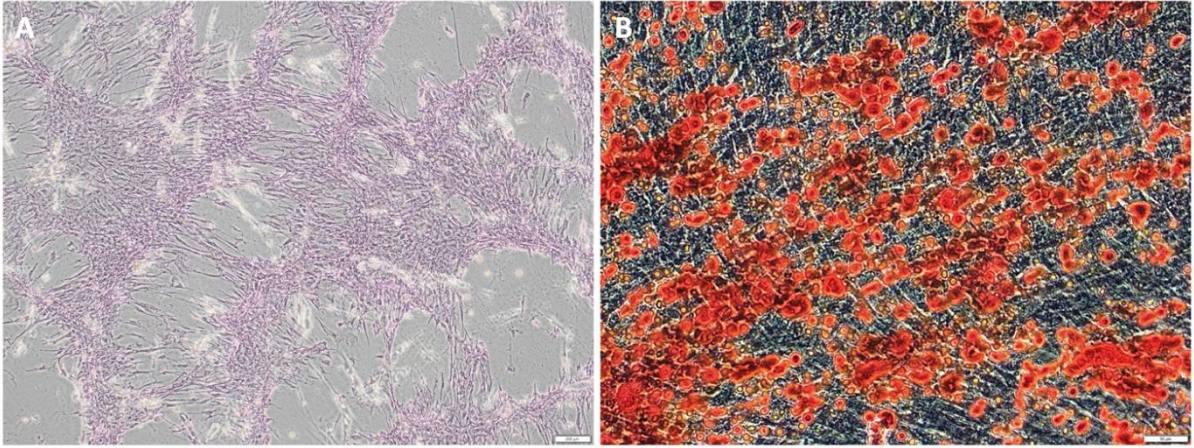
Çizim 4. 18 iKI-MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alizerin Red-S boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 200 μ m).



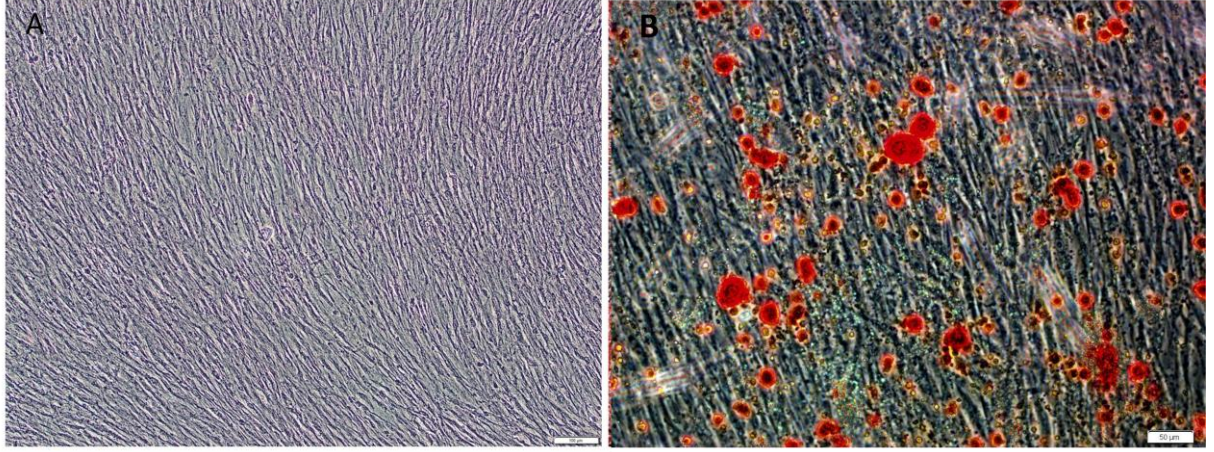
Çizim 4. 19 iWJ-MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alizerin Red-S boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 200 μ m).



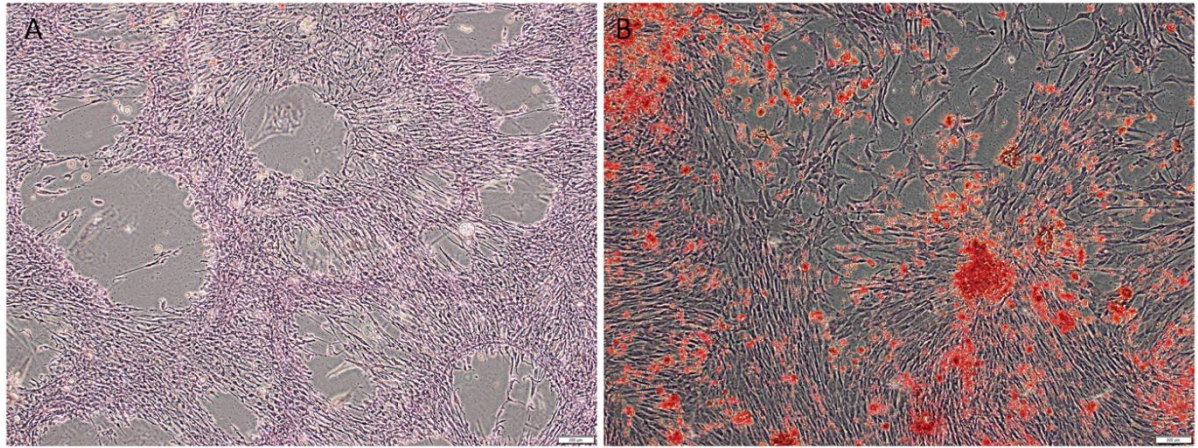
Çizim 4. 20 iKF -MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alizerin Red-S boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 200 μm).



Çizim 4. 21 iDP (20 yaş) -MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alizerin Red-S boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-200 μm B-50 μm).



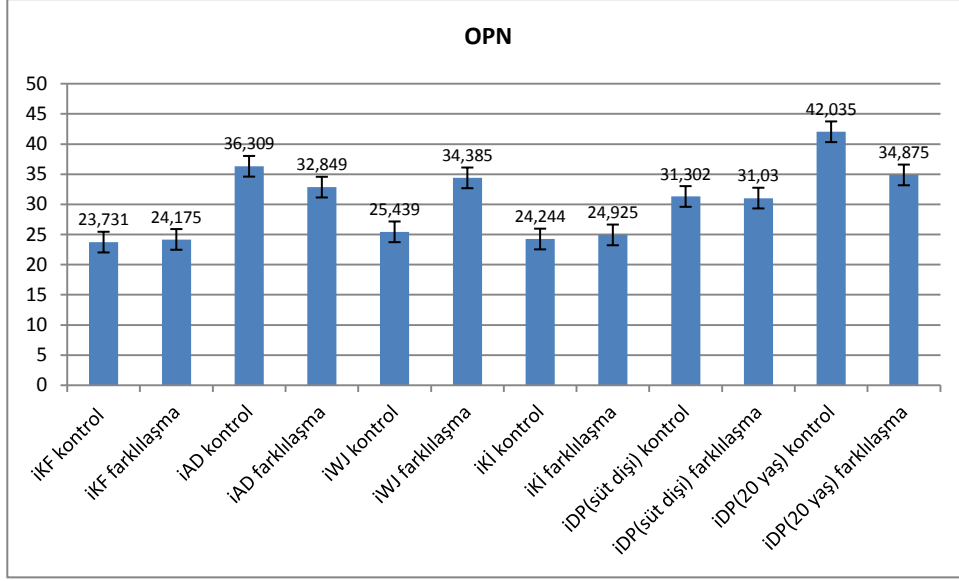
Çizim 4. 22 iDP (süt dişi) -MKH'lerin osteojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alizerin Red-S boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-200 μm B-50 μm).



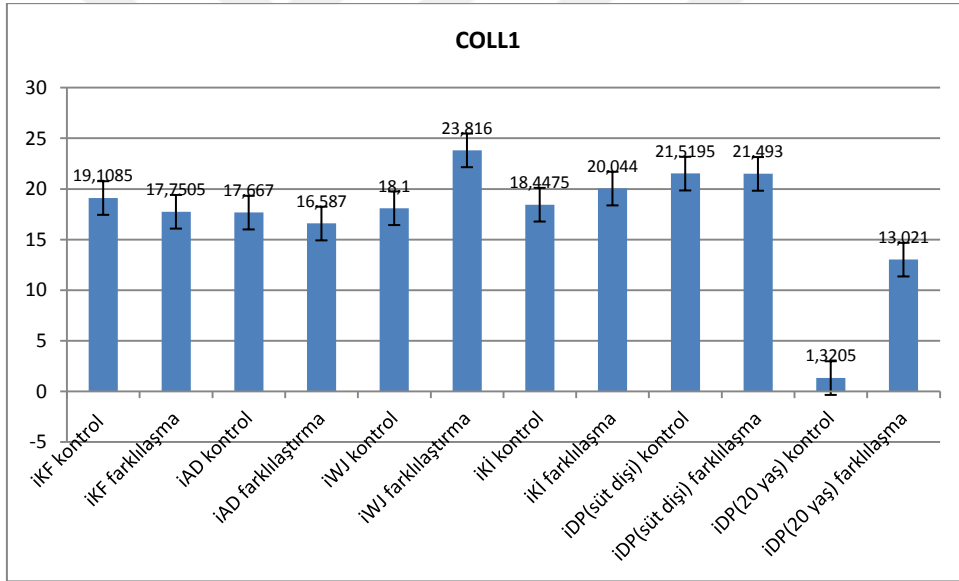
Çizim 4. 23 iAD-MKH'lerin Osteojenik Farklılaştırma Çalışmaları A) Kontrol Grubu, B) Deney Grubu . Kimyasal Uyarılma Süreci Sonrasında Alizerin Red-S Boyanmasının Gösterilmesi (Ölçek Çubuğu: A-B 200 μm).

4.4.1.2. *ELİSA yöntemi ile osteojenik farklılaşma*

Osteojenik farklılaştırma süreçleri sonunda deney ve kontrol gruplarında elisa yöntemi ile OPN ve COLL1 seviyeleri analiz edildi. OPN seviyesindeki artış kontrol grubuna oranla en fazla iWJ kaynağından elde edilen MKH'lerde gözlemlendi (Çizim 4.24).



Çizim 4. 24 iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dişi) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin osteojenik farklılaştırma sonrası OPN elisa sonuçları.



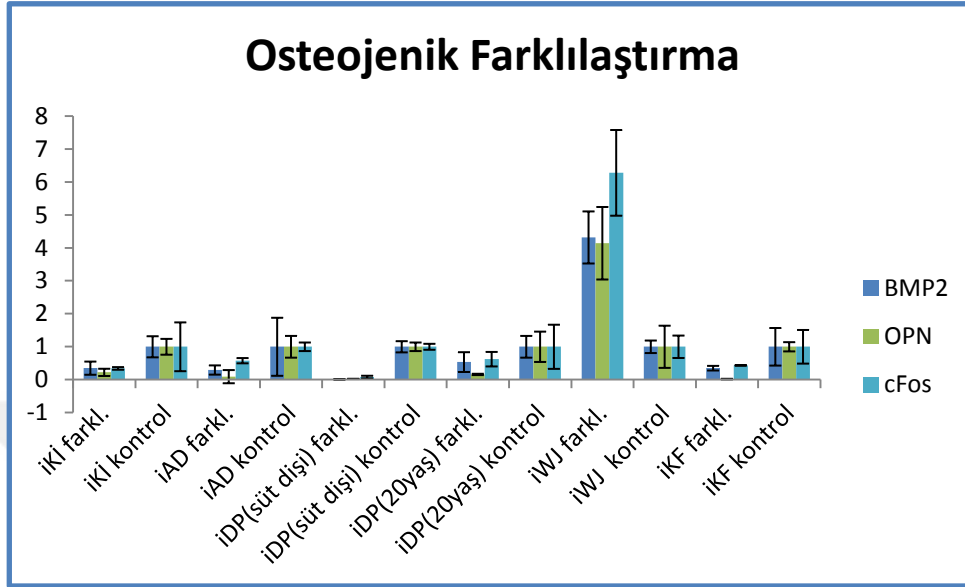
Çizim 4. 25 iKİ, iWJ, iKF, iDP (20yaş), iDP (süt dişi) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin osteojenik farklılaştırma sonrası COLL1 elisa sonuçları.

COLL1 seviyesi ise iWJ ve iDP (20 yaş) gruplarında kontrolleri ile karşılaştırıldığında ciddi bir artış olduğu gözlemlendi (Çizim 4.25).

4.4.1.3. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile osteojenik farklılaştırma

Osteojenik farklılaşma süreci sonrası tüm deney gruplarında farklılaşmayı göstermek için BMP2, OPN (osteopontin) ve cFos gen ifade seviyeleri değerlendirildi. Tüm gruplar ele alındığında Wharton jeli kaynaklı MKH'lerin osteojenik farklılaştırma

sonrasında her üç genin de ifadesinin arttığı gözlemlendi (Çizim 4.26). Wharton jeli kaynaklı MKH'lerin analizlerinde bu üç genin ifadesi 4,1 ile 6,3 kat arası arttığı gösterildi. Diğer hücrelerin gen ifadesi farklılaşma yolunda anlamlı bir bilgi vermemektedir.

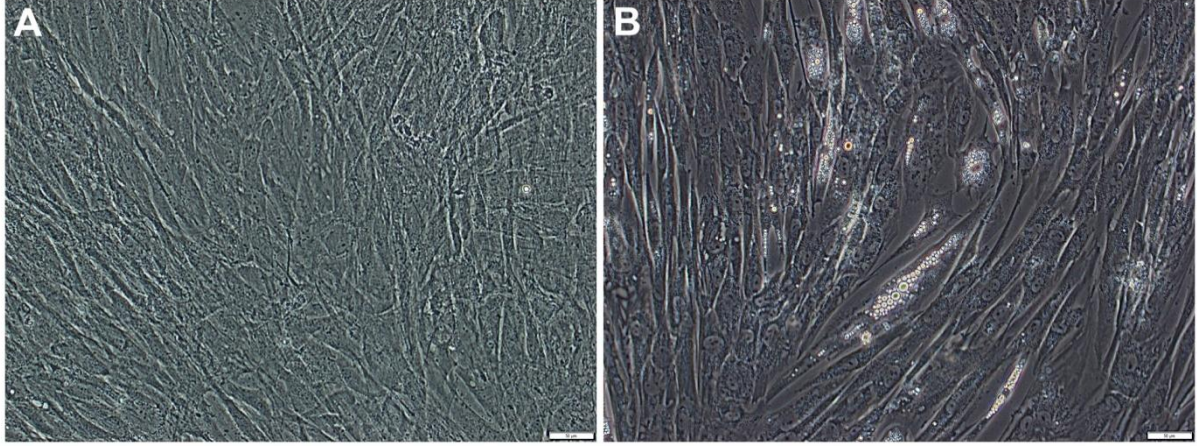


Çizim 4.26 iKİ, iAD, iDP(süt dişi), iDP(20yaş), iWJ, iKF, ve kaynaklı MKH'lerinin osteojenik farklılaştırma sonrası BMP2, OPN ve cFos gen ifadelerinin karşılaştırılması.

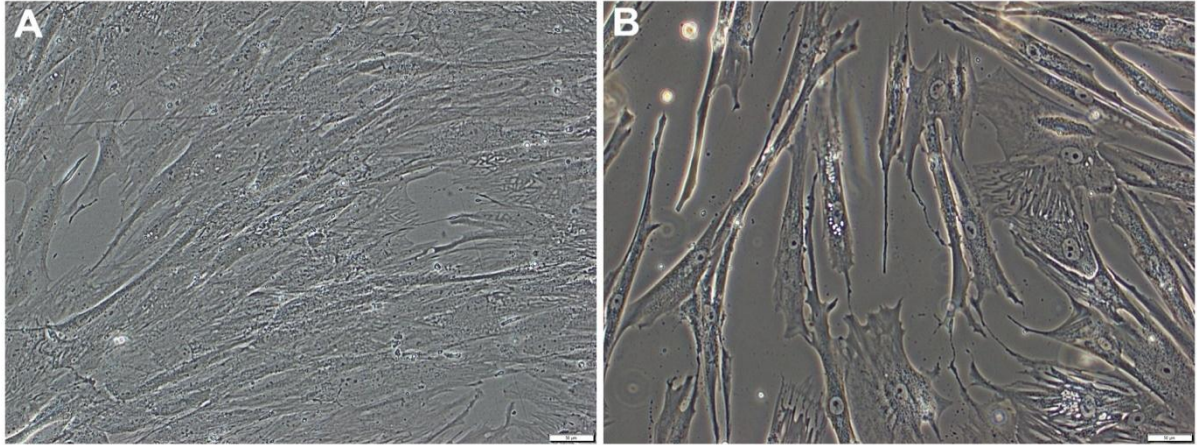
4.4.2. İzole Edilen Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

4.4.2.1. Morfolojik olarak adipojenik farklılaştırma

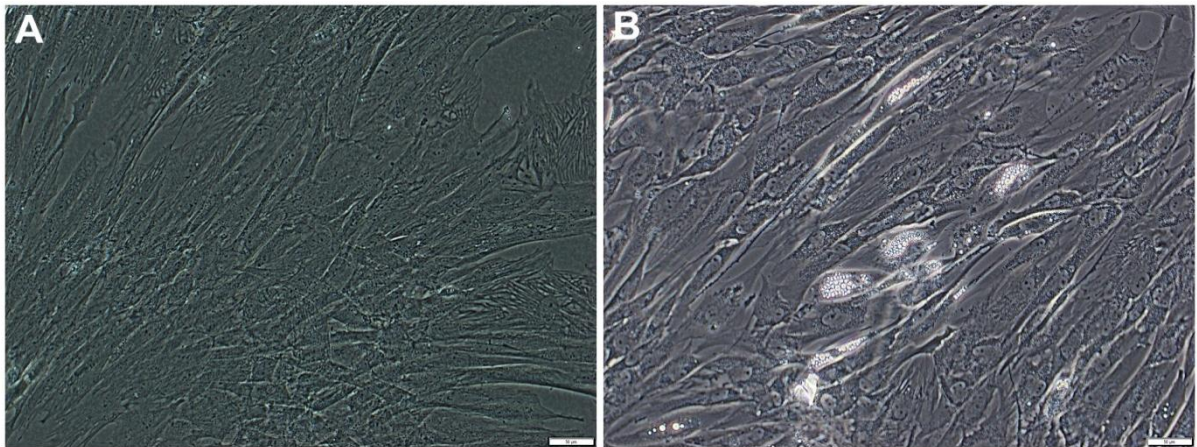
iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dişi) ve iAD kaynaklarından izole edilen MKH'ler pasaj 3'te %80 konfluensiye ulaştığında kimyasal uyarma ile adipojenik yönde farklılaşmaya alındı. Adipojenik farklılaşmaya alınan hücreler ile kontrollerinin çoğalma ve farklılaşması belirli aralıklarla zıt-faz mikroskopu ile kontrol edildi. Adipojenik ortamda kültüre edilen hücrelerde 3 haftalık adipojenik farklılaşma süreci sonrasında inverted mikroskop ile hücre içi yağ damlacıkları gösterilirken kontrol gruplarında böyle bir oluşum gözlenmedi (Çizim 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31 ve 4.32).



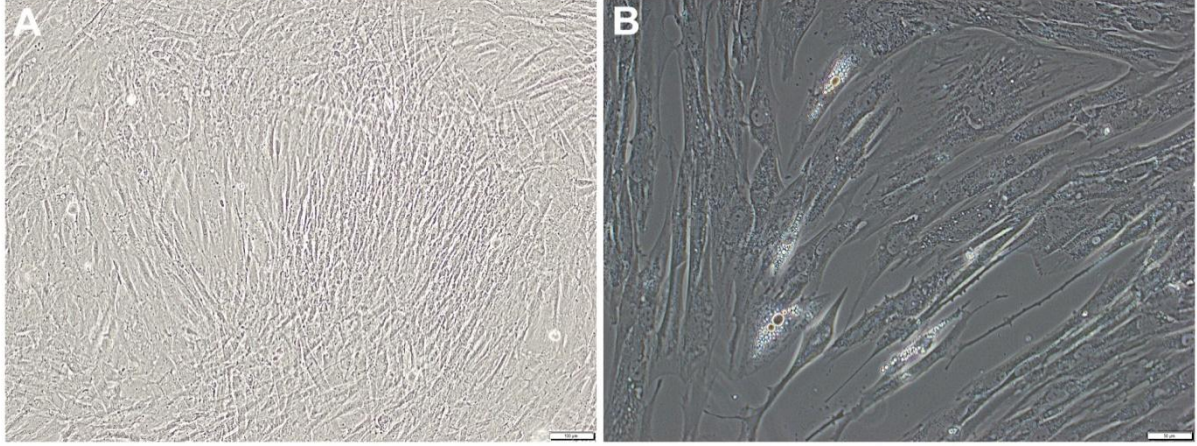
Çizim 4. 27 iKI-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında sitoplazmada yağ taneciklerinin gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 50 μ m).



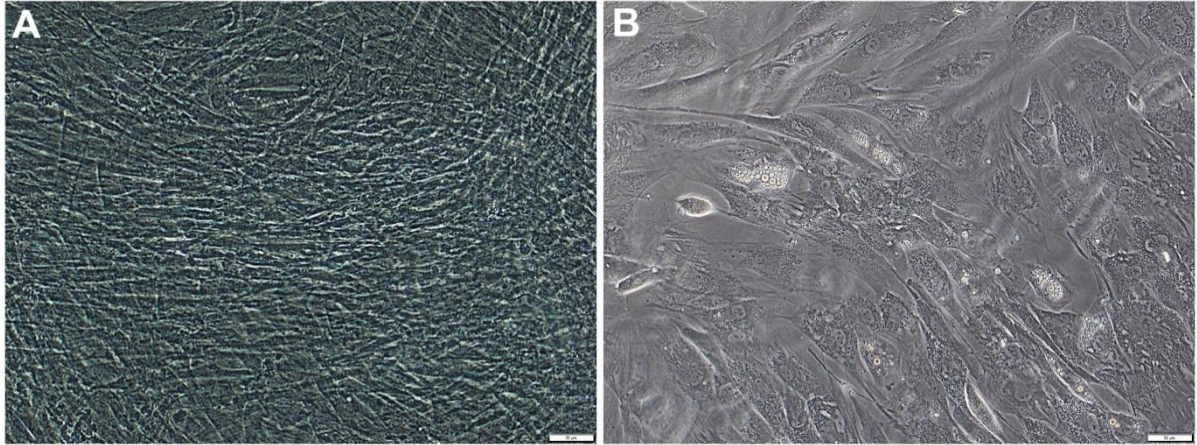
Çizim 4. 28 : iWJ-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında sitoplazmada yağ taneciklerinin gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 50 μ m).



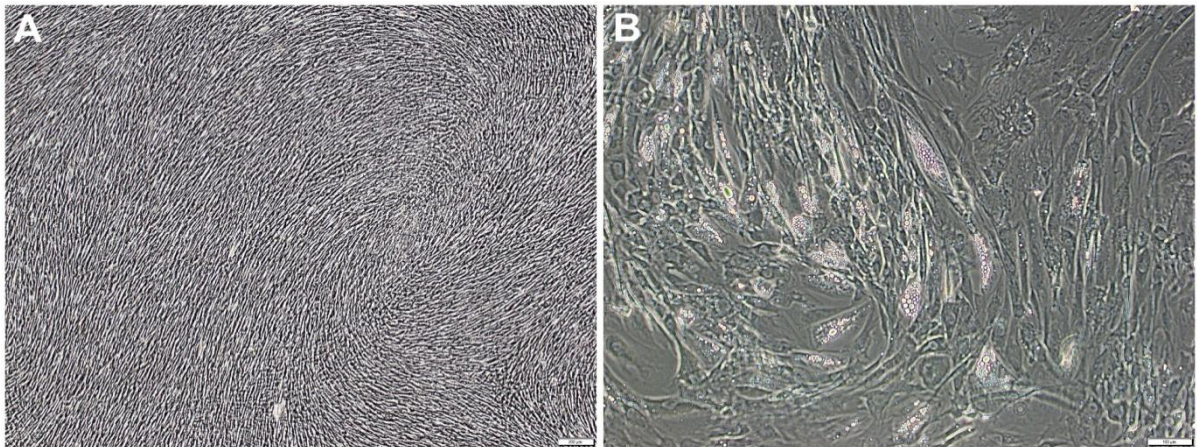
Çizim 4. 29 iKF-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında sitoplazmada yağ taneciklerinin gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 50 μ m).



Çizim 4. 30 iDP(20 yaş)-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında sitoplazmada yağ taneciklerinin gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-100, B-50 μ m).



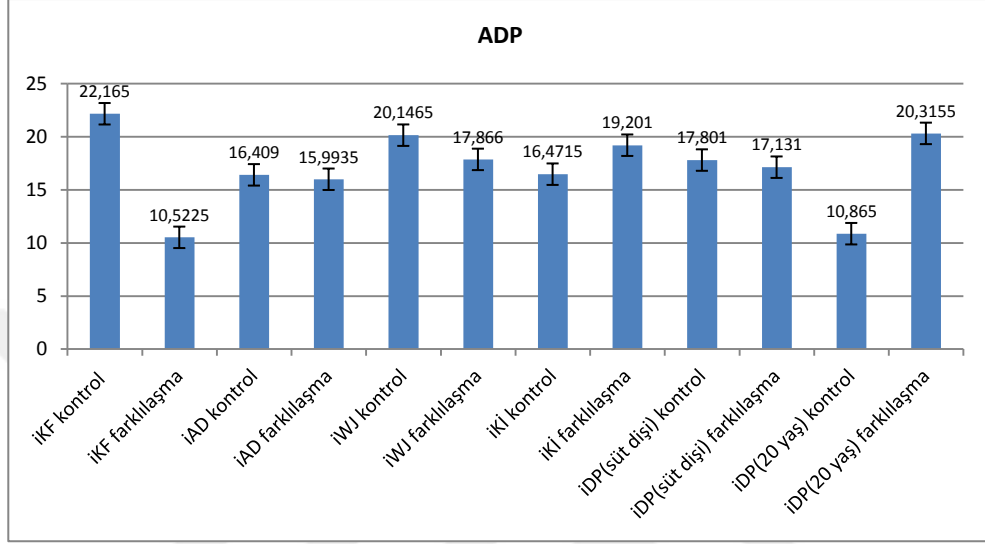
Çizim 4. 31 iDP(süt dişi)-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında sitoplazmada yağ taneciklerinin gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 50 μ m).



Çizim 4. 32 iAD-MKH'lerin adipojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında sitoplazmada yağ taneciklerinin gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-200 μ m, B-50 μ m).

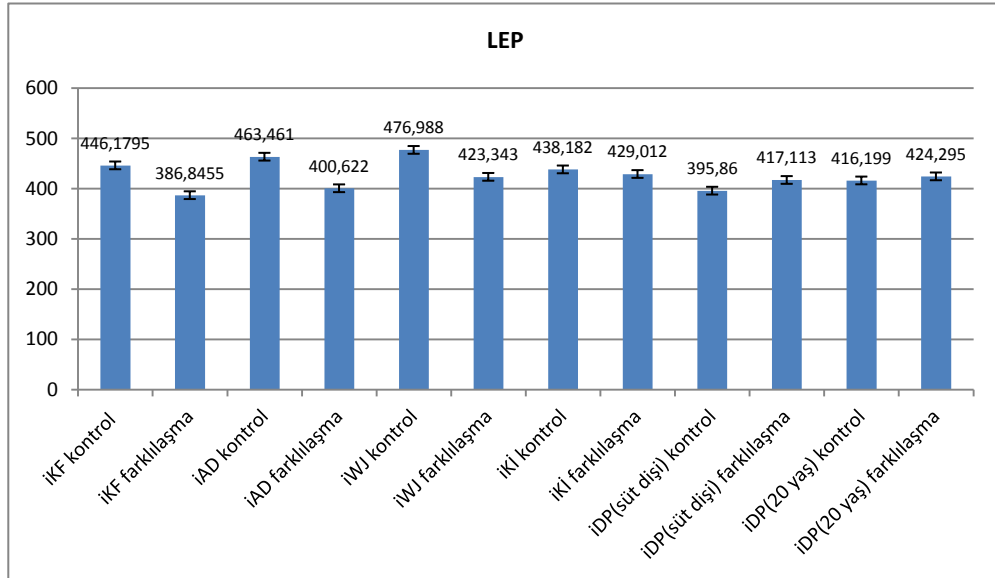
4.4.2.2. ELİSA yöntemi ile adipojenik farklılaştırma

Deney ve kontrol gruplarında adipojenik farklılaşma proteinlerinin tayini için adiponektin (ADP) ve leptin (LEP) düzeyleri değerlendirildi. Kontrol gruplarına göre iKİ ve DP kaynaklı kök hücrelerde ADP seviyeleri arttı (çizim 4.33).



Çizim 4. 33 iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dışı) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin adipojenik farklılaştırma sonrası ADP elisa sonuçları.

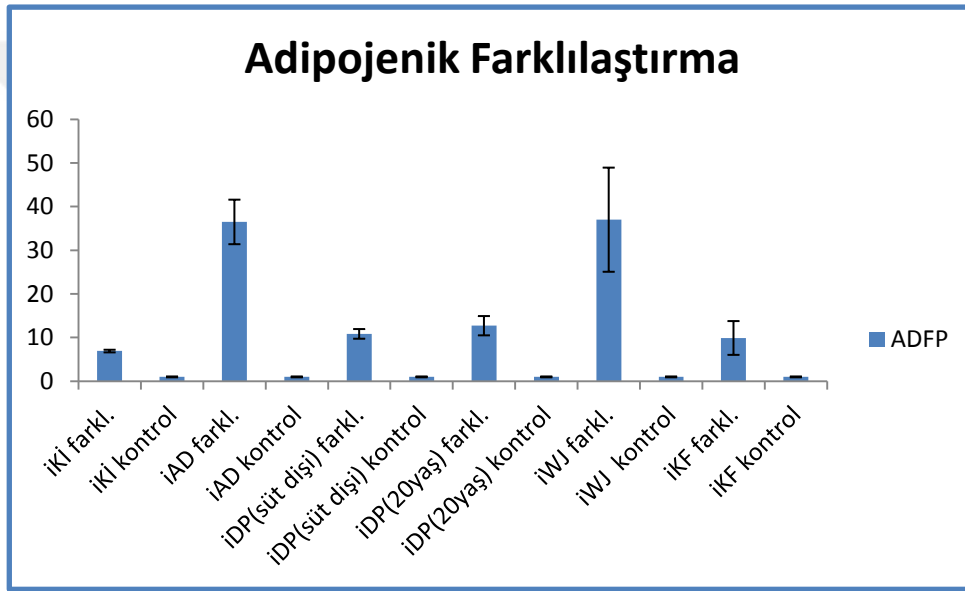
Deney ve kontrol gruplarında bakılan LEP seviyelerindeki artışları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı (Çizim 4.34).



Çizim 4. 34 iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dışı) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin adipojenik farklılaştırma sonrası LEP elisa sonuçları.

4.4.2.3. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile adipojenik farklılaştırma

Deney ve ilgili deney grubuna ait kontrol grupları adipojenik farklılaştırma süreci sonunda ADFP (adipose differentiation-related protein) gen ifade düzeyinin ölçülmesiyle değerlendirildi. ADFP geninin ekspresyonundaki değişim, deney gruplarının tümünün farklılaşma sürecinin sonunda farklılaştırmaya başladığını gösterdi (çizim 4.35). Kimyasal uyarı sonrasında ADFP geni ekspresyonu kontrollere göre 6,9 ile 37,0 kat arasında artmıştır. Bu artış en yüksek adipoz doku ve wharton jeli kaynaklı kök hücrelerde (iAD ve iWJ- MKH) gözlemlendi. En zayıf gen ifadesi de kemik iliği ve kıl folikülü kaynaklı kök hücrelerde gözlemlendi.



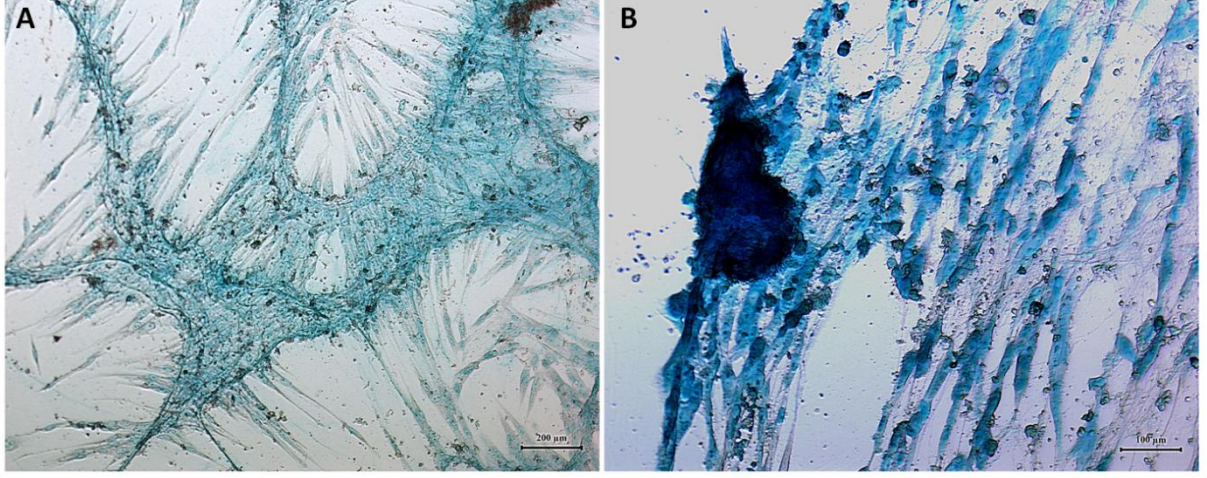
Çizim 4. 35 iKİ, iAD, iDP(süt dişi), iDP(20yaş), iWJ, iKF, ve kaynaklı MKH'lerinin adipojenik farklılaştırma sonrası ADFP gen ifadelerinin karşılaştırılması.

4.4.3. İzole Edilen Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

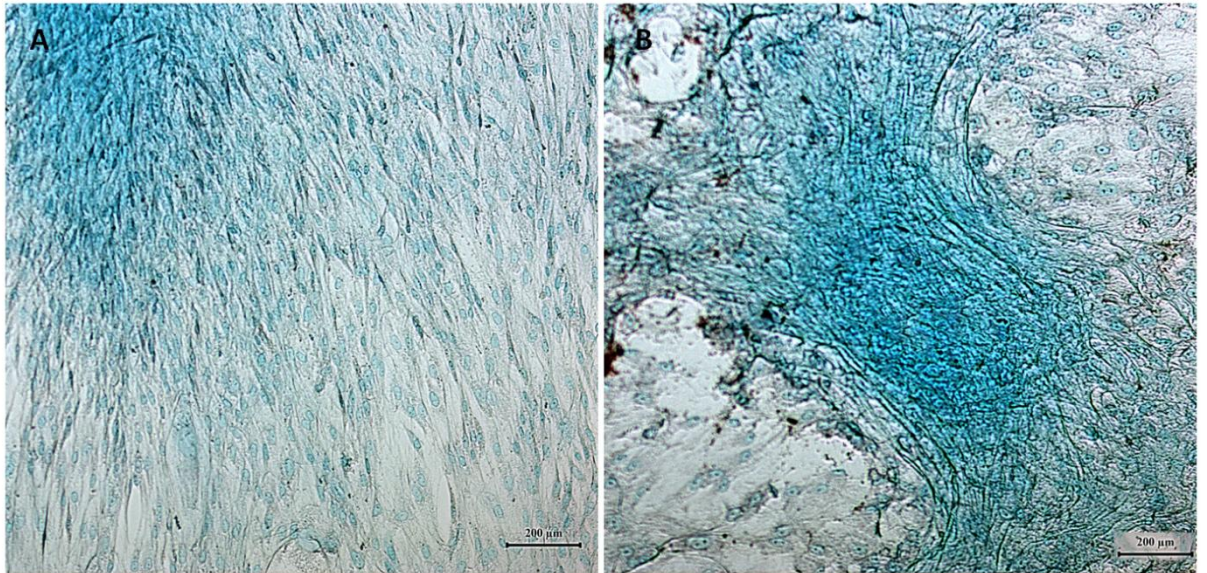
4.4.3.1. İmmünohistokimya yöntemi ile kondrojenik farklılaştırma

iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dişi) ve iAD kaynaklarından izole edilen MKH'ler kondrojenik yönde kimyasal farklılaşmaya yönlendirildi. Üç hafta süren kondrojenik farklılaştırma süreci sonrasında kondrositler tarafından üretilen glikozaminoglikanları (GAG) tayin etmek için hücreler ve hücrelerarası matriks Alcian mavisi ile boyandı. Kondrojenik farklılaşma ortamında hücreler arası matriks

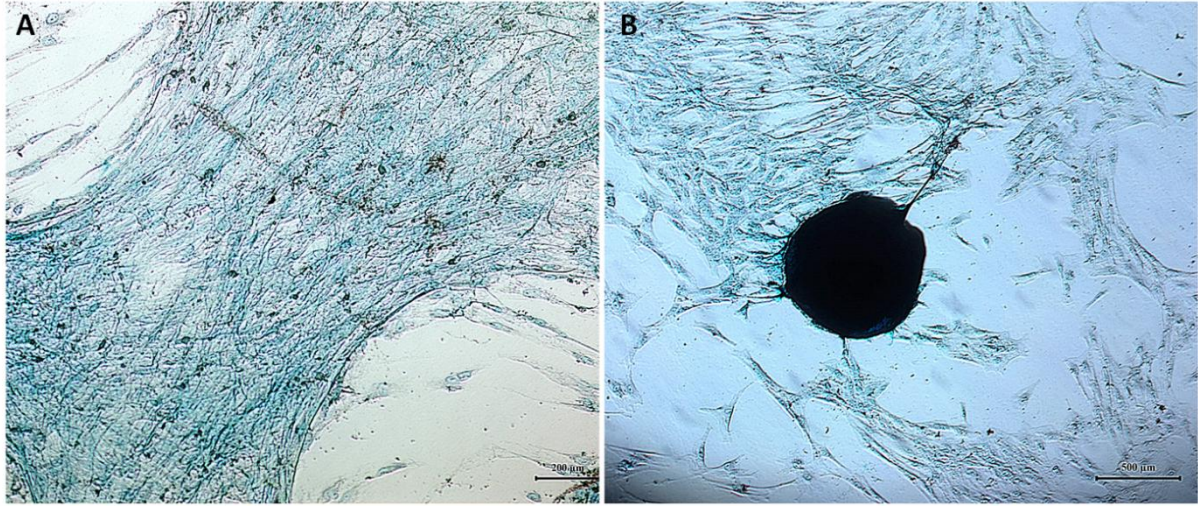
mineralizasyonu Alcian mavisinin pozitif boyanırken kontrol gruplarında bu karakteristik özellik gözlenmedi (Çizim 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41).



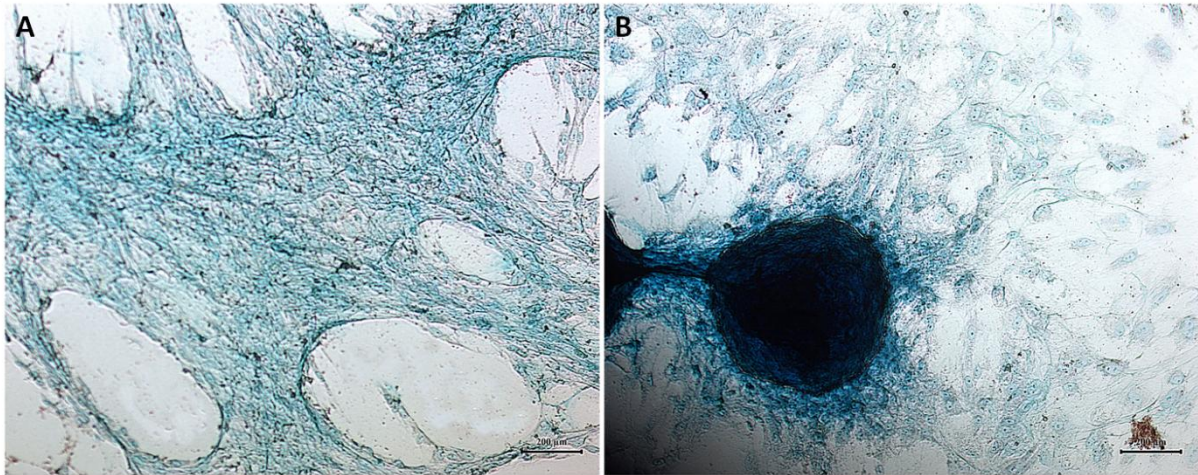
Çizim 4. 36 iKI-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alcian mavisini boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A- 200 µm, B-100 µm).



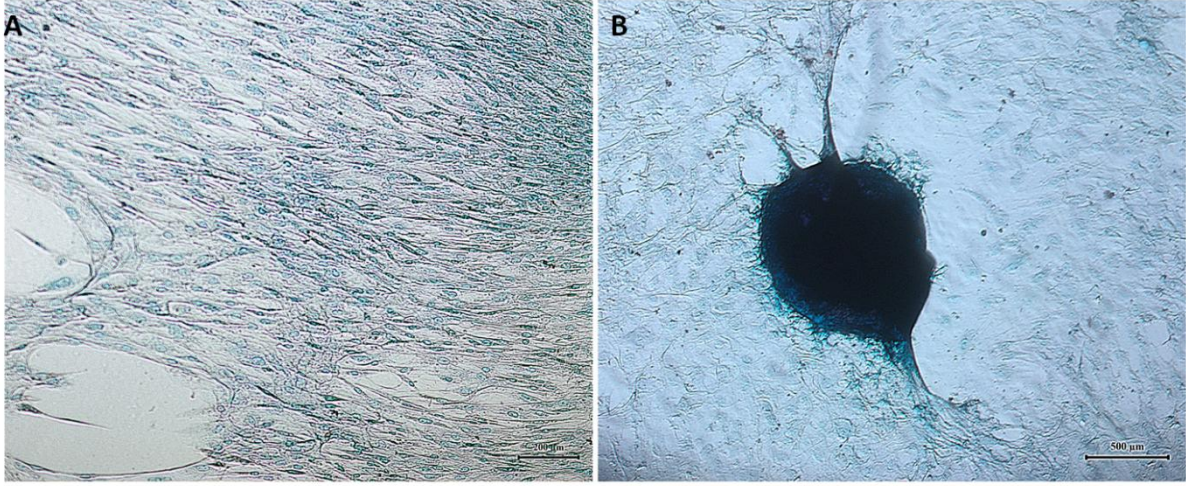
Çizim 4. 37 iWJ-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alcian mavisini boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 200 µm).



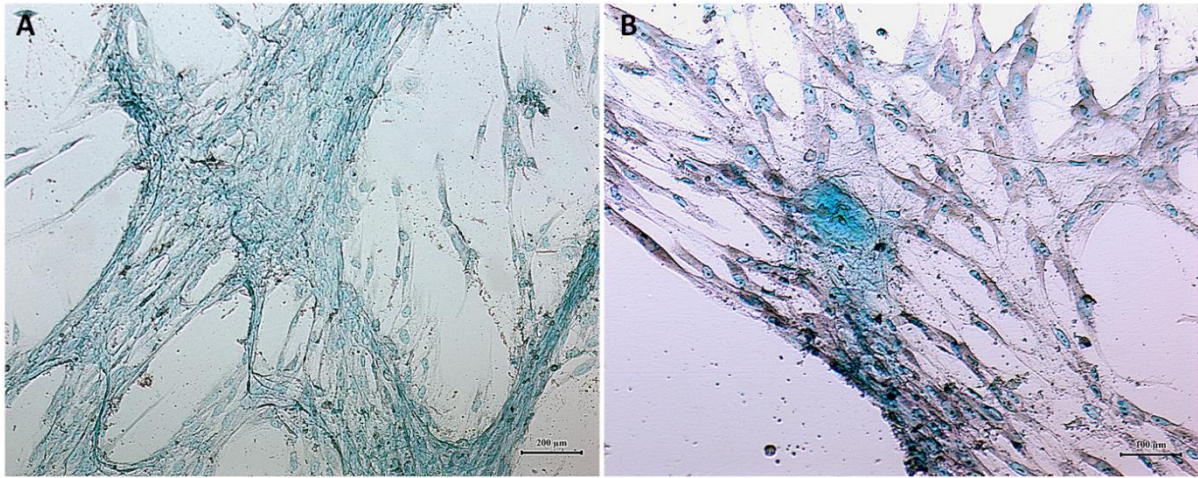
Çizim 4. 38 iKF-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alcian mavisi boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A- 200 μm , B- 500 μm).



Çizim 4. 39 iDP (20 yaş)-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu . Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alcian mavisi boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A-B 200 μm).



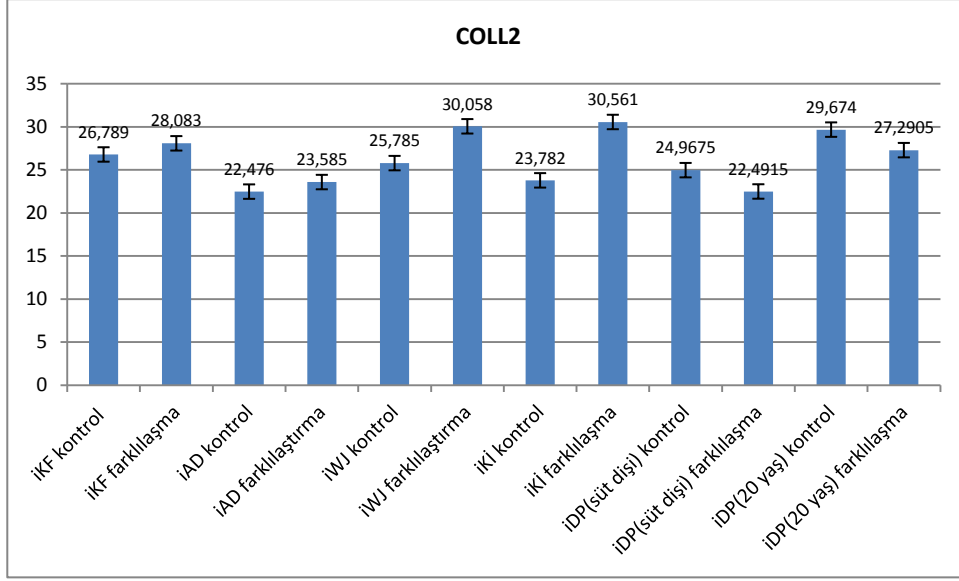
Çizim 4. 40 iDP (süt dişi)-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu. Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alcian mavisi boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A- 200 µm, B- 500 µm).



Çizim 4. 41 iAD-MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma çalışmaları A) kontrol grubu, B) deney grubu. Kimyasal uyarılma süreci sonrasında Alcian mavisi boyanmasının gösterilmesi (ölçek çubuğu: A- 200 µm, B- 100 µm).

4.4.3.2. ELİSA yöntemi ile kondrojenik farklılaştırma

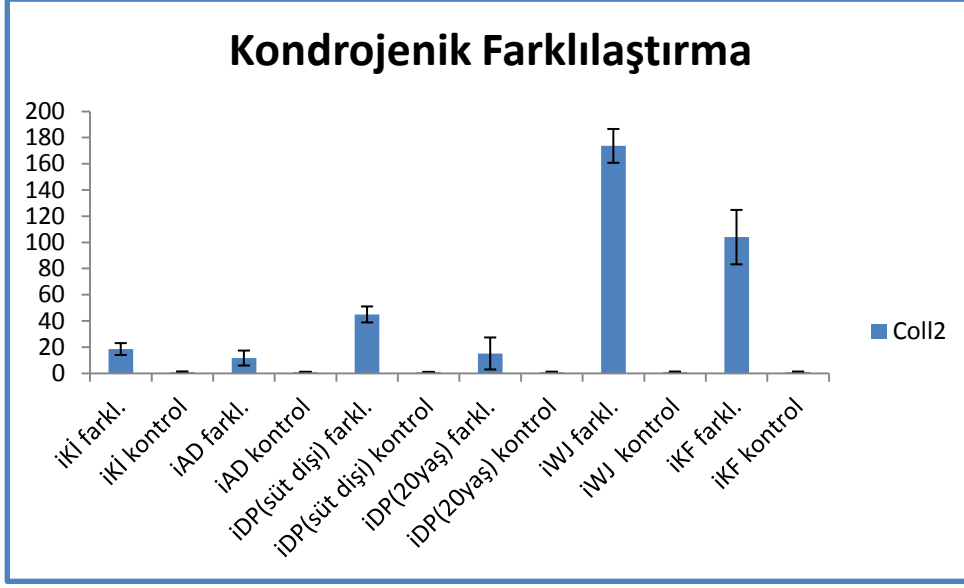
Deney ve kontrol gruplarında kondrojenik farklılaşma süreçleri sonrasında protein tayini için kollojen tip 2 (Coll 2) düzeyleri değerlendirildi. Coll 2 nin elisa sonuçları iWJ ve iKİ kaynaklı MKH'lerin kontrol gruplarıyla da karşılaştırıldığında diğer gruplara göre daha yüksek ifadesi gözlemlendi (Çizim 4.42).



Çizim 4. 42 iKİ, iWJ, iKF, iDP(20yaş), iDP(süt dişi) ve iAD kaynaklı MKH'lerinin kondrojenik farklılaştırma sonrası Coll 2 elisa sonuçları.

4.4.3.3. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kondrojenik farklılaştırma

Deney ve ilgili deney grubuna ait kontrol gruplarının kondrojenik farklılaştırma sonucu gerçek zamanlı PZR yöntemiyle COLL2 geninin ifadesinine göre belirlendi. Çalışılan grupların hepsinde kontrollerine göre COLL2 geninin ifadesi artmış görünmektedir (Çizim 4.43). Bununla beraber en iyi farklılaşma gösteren hücreler Wharton Jeli ve Kıl follikülü kaynaklı kök hücreler oldu. Wharton jeli kaynaklı kök hücreler kendi kontrol hücrelerine göre 173 kat yüksek COLL 2 ekspresyonu gösterirken kıl follikülü kökenli MKH'ler kimyasal uyarı sonrasında yaklaşık 104 kat daha fazla ifade etti.



Çizim 4. 43 iKİ, iAD, iDP(süt dişi), iDP(20yaş), iWJ, iKF, ve kaynaklı MKH'lerinin kondrojenik farklılaştırma sonrası COLL2 gen ifadelerinin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Kök hücreler günümüzde rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarındaki çalışmalar için ilgi odağı olmuş ve giderek artan oranlarda kullanımına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu ilginin en büyük sebebi kök hücrelerin kendini yenileme yetenekleri, özelleşmiş dokulara farklılaşabilme kabiliyetleri ve de immün düzenleyici etkilerinin olmasıdır. Kök hücreler farklı kaynaklardan elde edilmekte ve elde edildikleri kaynağa göre farklı yöntemlerle izolasyonları ve kültürleri yapılmaktadır. Kök hücrelerin doğal koşullarda yani in-vivo mikroçevreleri birbirinden farklıdır. Dolayısı ile akıllarda kök hücrelerin izole edildikleri kaynaklara göre farklılıklara sahip olup olmadığı sorusu belirlemektedir. Farklı kaynaklardan izole edilen kök hücrelerin biyolojik analizi, kullanılacağı çalışmaya uygun ve kullanılabilir kök hücre kaynağını seçimine ışık tutmaktadır. Bu çalışma insan adipoz doku (iAD), göbek kordon-warthon jeli (iWJ), kıl folikülü (iKF), süt ve 20yaş dişi (iDP(süt dişi ve iDP(20 yaş)), kemik iliği (iKİ) kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin, kök hücre karakterlerini ve bu hücrelerin farklılaşma potansiyellerini karşılaştırmalı olarak incelenmesi için tasarlanmıştır.

Erişkin kök hücreler doku yahut organlardaki farklılaşmış hücreler arasında yer alıp farklılaşmamış hücrelerdir. Kendini yenileyebilen bu hücreler buldukları doku veya organa özel hücre tiplerine farklılaşabilir ve buldukları dokuyu tamir edebilirler. Bunun bir sonucu olarak erişkin kök hücreleri yani MKH'ler hemen hemen tüm doku veya organdan izole edilebilir. Ancak çalışmalarda kullanılacak olan MKH kaynağının kolay ulaşılabilir olması ve uygulanabilirliği önem taşımaktadır. Kemik iliği multipotent kök hücreler için ana kaynak olarak tanımlanmış olmasına rağmen elde edilmesi bazı dezavantajlara sahiptir. Çalışmamızda kemik iliğine alternatif kök hücre kaynaklarının kemik iliği ile de karşılaştırmalı olarak morfolojik ve immünofenotipik karakterizasyonları yapılmıştır. MKH'ler kültür flasklarına yapışma (adhezyon) özelliğinde olup fibroblast benzeri iğsi yapıda hücreler şeklinde morfolojik olarak tanımlanmaktadır (Ryang ve diğ. 2004, Liu ve diğ. 2016). Sunulan çalışmada kullanılan insan adipoz doku, göbek kordon-warthon jeli, kıl folikülü, süt ve 20 yaş dişi, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri izolasyon sonrasında kültür kaplarına yapıştığı gözlenmiş ve P3 gelen hücreler fibroblast benzeri morfoloji göstermişlerdir.

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği MKH'lerin karakterizasyonu belirlerken yüzey belirteçleri için şu ifadeyi kullanmıştır; CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerinin ifadesi %90'ın altında olmaması gerekirken CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19 ve HLA-

DR gibi hematopoetik belirteçlerin de %2'nin üzerine çıkmamalıdır(Dominici M ve diğ. 2006). Daha sonra birçok çalışmada bu belirteçlere ek olarak CD10, CD13, CD29, CD44,CD71, CD146, CD166, HLA-ABC belirteçlerinin ifadesinin varlığı gösterilirken, CD7, CD15, CD33 ve CD106 belirteçlerinin de ifadesinin olmadığı belirtilmiştir (Beeravolu ve diğ. 2017, Karaöz ve diğ. 2011, Aydın ve diğ. 2014). Önceki çalışmalar ile paralel olarak bu çalışmada iKi, iWJ, iKF, iDP (20 yaş ve süt dişi), iAD kaynaklarına ait MKH'ler için CD10, CD13,CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 ve HLA-ABC belirteçlerinin ifade edildiği ve CD7, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45,CD106 ve HLA-DR belirteçlerinin de negatif olduğu gösterilmiştir.

Diş pulpası ve kıl folikülü nöral krest hücrelerinden köken alan ektomezenkimal hücrelerin göç ettiği dokular arasında yer almaktadır. Bu kaynaklardan elde edilen kök hücrelere nöral krest kaynaklı mezenkimal kök hücreler de denilmektedir (Liu ve Cheung 2016, Nuti ve diğ. 2016, Shakhova ve Sommer 2010). Nöral krest kaynaklı kök hücrelerin karakterizasyonunda CD117 ifadesinin mevcut olduğu gösterilmiştir (Jiang S. ve diğ. 2010, Acosta ve diğ. 2009). Bu tez çalışmasında CD117 belirteçi WJ, Kİ, AD ve 20yaş-DP kaynaklı MKH'lerde ifade edilmezken kıl folikülü ve diş pulpası (süt dişi) kaynaklı MKH'lerin flow sitometrik analizi ile CD117'yi ifade ettiği gösterilmiştir. Bu da MKH'lerin elde edildikleri kaynaklara göre yüzey belirteçlerinde farklılıkların olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu hücre grubunun nörojenik yönde farklılaşma potansiyelinin yüksek olabileceği düşüncesi de oluşmaktadır.

MKH'ler salgıladığı kimyasal faktörler aracılığıyla dendritik hücrelerinin olgunlaşmasını, T, B ve NK (doğal öldürücü) hücrelerinin fonksiyonlarının baskılanmasını ve hatta düzenleyici T hücrelerini (T reg) uyarılması ile bağışıklık sistemini etkilemektedirler (Bocelli-Tyndall ve diğ. 2009, Yoo ve diğ. 2009, Li ve diğ. 2007, Demircan ve diğ. 2011, Genç ve diğ. 2018). Buna ek olarak önemli bir bağışıklık düzenleyici (immünmodülatör) molekül olan HLA-G'nin MKH'lerce ifadesinin varlığı, MKH'lerin bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerini destekleyebilecektir. HLA-G'nin fonksiyonu efektör ve sitotoksik T hücrelerini ve NK hücrelerini inhibe etmek ve T(reg) proliferasyonunu da artırmak yönündedir (Vianna ve diğ. 2016, Rouas-Freiss ve diğ. 2003). Bu tez çalışmasındaki çalışma grupları arasında bulunan iKF ve DP (20 yaş) kaynaklı MKH'lerin HLA-G ifadesi, immünmodülasyon çalışmalarında ya da doku-organ transplantasyonu çalışmaları için seçilecek MKH kaynağı olabileceği konusunda araştırmacılara yön gösterebilir. Bununla beraber HLA-G nin membran bağımlı ve soluble (çözünür) olmak üzere iki isoformu mevcuttur (Nasef ve diğ. 2007), flow sitometri gibi

yöntemler ile sadece membran bağımlı HLA-G proteininin gösterimi yetersiz kalabilir bu sebeple soluble HLA-G proteinini de göstermek daha doğru olacaktır.

Farklı kaynaklardan elde edilmiş olsa da MKH'lerin desmin ve α -SMA gibi miyojenik, nestin gibi nörojenik belirteçleri ifade etmesi bu hücrelerin elde edikleri kaynaktan bağımsız olarak farklılaşma potansiyeline sahip olduğunun ibaresidir. Fibronektin ve vimentin'in adhezyon, göç, farklılaşma ve hücre-doku yenilenmesini desteklediği gerçeği MKH karakterizasyonunda varlığının gösterilmesindeki önemi vurgulamaktadır (Petrini ve diğ. 2017, Galmiche ve diğ. 1993). Bu sebeple çalışmamızda MKH karakterizasyonu için desmin, α -SMA, fibronektin, vimentin ve nestin ekspresyonlarının varlığı gösterilmiştir.

MKH'lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasına yönelik birçok çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmaların bir bölümü farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin karşılaştırılmasına yöneliktir. Ancak bu çalışmalarda genelde iki farklı kaynaktan izole edilen hücreler ya da aynı yapıya ait farklı doku kaynakları kullanılmıştır. Örneğin adipoz kaynağı ile kemik iliği ya da dental pulpa ve periodontal ligament kaynakları gibi çalışmalardır (Lee ve diğ. 2004, Hakki ve diğ. 2014). Bu karşılaştırma çalışmalarında diğer bir grup ise farklı hücre kaynaklarını sadece yüzey belirteçleri, sadece morfolojik olarak ya da sadece gen ekspresyon düzeyindeki farklıları ele alarak tek yönlü incelemiştir (Toyoda ve diğ. 2009, Sakaguchi ve diğ. 2005, Chen ve diğ. 2015). Kapsamlı bir şekilde farklı birçok kaynağın aynı anda ve farklı yöntemlerle yapılan karşılaştırmalı bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada altı farklı kaynaktan (iAD, iWJ, iKF, iDP (süt dişi), iDP (20 yaş) ve iKİ) elde edilen MKH'ler kapsamlı bir şekilde immünofenotipik ve morfolojik olarak karakterize edilmişler ve adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma potansiyelleri protein ve gen ekspresyon düzeyleri analiz edilerek değerlendirilmiştir.

Adipojenik farklılaşma genelde hücrelerin içerdiği intraselüler yağ damlacıkları ile tanımlanmaktadır. Adipojenik farklılaşma potansiyelinin gösterilmesinin diğer bir yöntemi ise PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) (Fink ve diğ. 2011) , FABP4 (fatty acidebinding protein 4)(Dias ve diğ. 2018), ADFP (adipose differentiation-related protein) (Chang ve diğ. 2006) genlerinin ve adiponektin (Martella ve diğ. 2014), leptin (Kim ve diğ. 2007), adipsin (Song ve diğ. 2016) gibi proteinlerin varlığının gösterilmesidir. Bu tez çalışmasında MKH'lerin adipojenik farklılaşma durumları hücre içi yağ damlacıklarının gösterilmesi, ADFP gen ekspresyon düzeyinin ve adiponektin ile leptin proteinlerinin seviyelerinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Adipojenik farklılaşmanın

erken dönemlerinde lipid (yağ) damlacıklarının hücre içinde gözlenmeye başlamasıyla ADFP geni ekspresyonunda artış gözlenir ve daha sonra ADFP geninin ekspresyonu düşmektedir (Sztalryd ve diğ. 2006). Bu tez çalışmasındaki tüm kaynaklardan elde edilen MKH'lerin ADFP gen düzeyindeki artışı tüm grupların adipojenik yönde farklılaşmaya başladığını göstermektedir. Adiponektin ve leptin ise adipojenik farklılaşmanın ileri noktadaki belirteçleri olduğundan hücre grupları arasında farklılıklar gözlenmektedir. iKİ ve iDP kaynaklı MKH'lerin farklılaşma sonrası adiponektin seviyelerinin artmış olması ve ADFP gen ekspresyonunda bu kadar kuvvetli görmememiz ya bu hücrelerin adipojenik farklılaşmanın ileri aşamasında olduğunun ya da kültürdeki hücrelerin farklılaşmalarının homojen olmamasının göstergesidir. Adipojenik farklılaşmanın homojen olduğu iAD-MKH grubundan farklı olarak iKİ ve iDP- MKH'lerinin bir kısmının sitoplazmasında yağ damlacıklarının gözlenebilmiştir. Kullanılan bütün teknikler göz önüne alındığında en iyi adipojenik farklılaşma iAD ve iWJ kaynaklı kök hücrelerde gözlenirken en zayıf farklılaşma iKİ kaynaklı kök hücrelerde gözlenmiştir.

Kondrojenik farklılaşma ekstrasellüler matriks bileşenleri glikozaminoglikanların (GAG) saptanmasıyla ve Sox9 (Jiang ve diğ. 2018), aggrecan ve Coll2 (Wang ve diğ. 2015, Jakobsen ve diğ. 2010) gibi gen ve proteinlerin ifadelerini gösterilmesi ile tanımlanmaktadır. Bu çalışmada kondrojenik farklılaşma, immünohistokimyasal yöntemle GAG saptanması için alsian mavisi boyaması ve Coll2'nin hem protein hem de gen ifade düzeyinde gösterilmesiyle saptanmıştır. Coll2 gen düzeyinde her grup ilgili kontrole göre bir artış gösterse de en iyi farklılaşmayı immünohistokimya, protein ve gen seviyeleri dikkate alındığında iWJ ve iKF kaynaklı MKH'lerde gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal boyamalar (alsian mavisi) yakından incelendiğinde iKİ-MKH'lerin ekstrasellüler matriks sentezini çok kuvvetli yaptıkları ancak hücre sayısında ve aynı zamanda hücre canlılığında, düşüşler kaydedildiği görülmektedir. Buna karşın iKF- MKH'lerin hücre sayısının fazla olması yüksek protein ifadesine yol açmış olabileceği de düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda en iyi kondrojenik farklılaşma iWJ-MKH'lerde görülmektedir.

Osteojenik farklılaşma, bu farklılaşmaya özgü olan mineral birikintilerinin von Kossa veya alizarin red S boyasıyla gösterilmesi (An ve diğ.2012, Jeon ve diğ. 2018) ve de ALP, osteokalsin, osteopontin, Coll1 gibi protein ve gen düzeylerinin gösterilmesi (Grausova ve diğ. 2011) ayrıca BMP2, cFos ve Runx2 gibi genlerin düzeylerinin gösterilmesi (Kirkham ve Cartmell 2007) ile karakterize edilmektedir. c-Fos her ne kadar nörojenik farklılaşma belirteçi olarak ele alınmış olsa da (Turaç ve diğ. 2018) osteojenik

farklılaşmanın erken dönemi belirteci olarak literatürde yer almaktadır (Closs ve diğ. 1990, Kirkham ve Cartmell 2007). Osteojenik farklılaşmanın ilerleyen aşamalarında ise sırasıyla OPN ve BMP2 genleri ifade edilmektedir (Nishimura ve diğ. 2015). Bu çalışmada osteojenik farklılaşma, mineral birikintilerinin alizerin red S boyanması, osteopontin ve Coll1 protein düzeyi ayrıca BMP2, osteopontin (OPN) ve cFos gen ifadelerine göre belirlenmiştir. Her üç analiz de birlikte değerlendirildiğinde en iyi osteojenik farklılaşma gösteren iWJ-MKH'leri olmuştur. iKİ-MKH'leri ile karşılaştırıldığında ise diğer grupların da en az kemik iliği kaynağından elde edilen hücreler kadar farklılaşma gösterdiği belirlenmiştir. Diğer grupların iWJ-MKH'leri kadar iyi osteojenik farklılaşma göstermemesinin sebebi düşük farklılaşma potansiyeli yahut farklılaşma süreçlerinin farklı aşamalarında olmasından kaynaklanabilmektedir.

Bu çalışmada iAD, iWJ, iKF, iDP (süt dişi ve 20 yaş), iKİ kaynaklarından elde edilen MKH'lerin, MKH'lere özgü morfoloji ve kapsamlı olarak incelenen immünofenotipik özellikleri tümünde benzerlik göstermektedir. Farklılaşma potansiyelleri incelendiğinde iAD-MKH'lerinde adipojenik farklılaşmanın en iyi sonucu vermesi soya özgü faktörlerin elde edildiği soya özgü farklılaşmayı desteklemesi şeklinde açıklanabilirken bu sadece adipoz kaynaklı MKH'lerde gözlenmiştir. Tüm gruplar iKİ-MKH'ler ile karşılaştırıldığında farklılaşma potansiyelleri birbirine çok yakın bulunmuştur. Ancak kondrojenik farklılaşma potansiyeli iWJ, iKF ve iDP kaynaklarından elde edilen MKH'lerde, osteojenik farklılaşma potansiyelleri iWJ, iDP ve iKİ kaynaklı MKH'lerde ve adipojenik farklılaşma potansiyeli ise iAD, iWJ ve iDP hücrelerinde diğer kaynaklara oranla daha iyi sonuçlanmıştır. Her üç farklılaştırma da incelendiğinde en iyi farklılaşma potansiyeli iWJ kaynaklı MKH'lerde gözlenmiştir. Bu durum doku kaynağının yanı sıra dokunun yaşının daha ön planda olduğunu göstermektedir. Daha genç bir dokudan izole edilen MKH'lerin daha yüksek potansiye sahip olduğu ve daha yüksek verimlilikte bir farklılaşma elde edildiği sonucuna varılmaktadır.

Çalışmanın ileri safhalarında bu hücrelerin immün baskılayıcı özelliklerini incelemek üzere T hücreleri ile MKH'ler birlikte kültür edilebilir ve T hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi önerilebilir. Bununla birlikte in-vivo çalışmalar için daha verimli sonuçlar elde edilmesi mümkün olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yenileyici tıp ve hücre sel tedavilerin en önemli parçalarından biri olan MKH'ler çeşitli kaynaklardan elde ediliyor olup klinik öncesi ve klinik çalışmaları devam etmektedir. Çeşitli kaynaklardan izole edilen MKH'ler çoğalma, morfolojik, immüno fenotipik ve farklılaşma potansiyellerinde farklılık gösterebilir mi? Bu farklılıklar düşünülerek, bu çalışmada rejeneratif tıp için en uygun ve kullanılabilir kaynağın tayini açısından farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin biyolojik özellikleri analiz edilmiştir.

MKH çalışmalarında en çok kullanılan ve çok iyi tanımlanmış kök hücre kaynağı kemik iliği olmasına rağmen toplama yöntemindeki defektler, çalışmalar için daha az invazif ve kolay ulaşılabilir kemik iliğine alternatif kök hücre kaynağını bulmaya yöneltmiştir. Bu amaçla çalışmamızda insan adipoz doku, göbek kordon-warthon jeli, kıl folikülü, süt ve 20 yaş dişi gibi daha az invazif olan ve kolay ulaşılabilir kaynaklar ve karşılaştırmanın yapılabilmesi için de kemik iliği MKH kaynağı olarak kullanılmıştır. Ayrıca bu hücrelerin immüno fenotipik karakterizasyonunun yanı sıra adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaştırılması ile farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir.

Bu çalışmanın bulgularına göre tüm kaynaklardan elde edilen hücreler, MKH'lere özgü morfolojiyi ve immüno fenotipik özellikleri göstermişlerdir. Tüm kaynaklara ait hücrelerde MKH belirteçleri olan CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerinin pozitif, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19 ve HLA-DR belirteçlerinin negatif olduğu bulunmuştur. Bununla beraber kıl folikülü ve diş pulpası (süt dişi) kaynaklı MKH'lerin flow sitometrik analizi ile CD117'yi ifade ettiği gösterilmiştir. Dolayısıyla bu kaynakların nöral krest kaynaklı MKH'ler olabileceği ve bu kaynakların nöral farklılaşma potansiyellerinin yüksek olabileceği düşünülmektedir. Nöronal farklılaşma tasarlanan çalışmalarda bu kaynakların kullanımının daha doğru olabileceği önerilebilir.

Adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma sonrasında elde ettiğimiz sonuçlara göre: iKİ-MKH'ler ile diğer kaynaklardan elde edilen MKH'ler karşılaştırıldığında diğer kaynakların farklılaşma potansiyellerinin en az kemik iliği kaynağı kadar olduğu gözlenmiştir. Diğer tüm grupların iKİ-MKH'lere alternatif kök hücre kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca her farklılaşma kendi içinde değerlendirildiğinde kondrojenik farklılaşma için iWJ, iKF ve iDP kaynaklı MKH'leri, adipojenik farklılaşma için iWJ, iKF ve iAD kaynaklı MKH'ler, osteojenik farklılaşma için ise iWJ, iDP ve iKİ diğer kaynaklara göre daha yüksek potansiye sahiptir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek farklılaşma potansiyeli iWJ kaynağına ait MKH'lerde

gözlenmiştir. iWJ-MKH'lerin yanı sıra kondrojenik farklılaştırma ile ilgili deneylerde yahut kırıkta doku hasarında iDP ve iKF kaynaklı MKH'lerin, osteojenik farklılaştırma ile ilgili deneylerde ya da kemik doku hasarlarında iDP ve iKI kaynaklı MKH'lerin avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir.

Çalışmanın kapsamını daha da artırmak ve rejeneratif tıp için daha etkili sonuçlara ulaşmak açısından bu hücrelerin immün baskılayıcı özelliklerinin de ortaya konulmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acosta S, Lavarino C, Paris R, ve diğ. Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells.. BMC Dev Biol. 2009 Şub 12;9:12. doi: 10.1186/1471-213X-9-12.
- Al Faqeh H, Nor Hamdan BM, Chen HC, ve diğ.. The potential of intra-articular injection of chondrogenic-induced bone marrow stem cells to retard the progression of osteoarthritis in a sheep model. Exp Gerontol. 2012;47(6):458-464.
- Alexeev V, Arita M, Donahue A, ve diğ. Human adipose-derived stem cell transplantation as a potential therapy for collagen VI-related congenital muscular dystrophy. Stem Cell Res Ther. 2014 Şub 12;5(1):21.
- Amoh Y, Hoffman RM. Hair follicle-associated-pluripotent (HAP) stem cells. Cell Cycle. 2017 Tem 27;1-7. doi: 10.1080/15384101.2017.1356513
- An S, Gao Y, Ling J, ve diğ. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. J Mater Sci Mater Med. 2012 Mar;23(3):789-95. doi: 10.1007/s10856-011-4531-0.
- Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım, FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi 2016;1(1):19-28
- Aydın A, Duruksu G, Erman G ve diğ. Neurogenic differentiation capacity of subacromial bursal tissue-derived stem cells. J Orthop Res. 2014 Oca;32(1):151-8. doi: 10.1002/jor.22484
- Bahat-Stroomza M, Barhum Y, Levy YS, ve diğ. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. J Mol Neurosci. 2009 Eyl;39(1-2):199-210. doi: 10.1007/s12031-008-9166-3
- Beeravolu N, McKee C, Alamri A. Ve diğ. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. J Vis Exp. 2017 Nis 3;(122). doi: 10.3791/55224
- Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Schaeren S, ve diğ. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. Ann Rheum Dis 2009;68:1352-1359.
- Bolli R, Hare JM, March KL U.S National Library of Medicine, ClinicalTrials.gov, 2018. Erişim:08.01.2018, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02501811?term=mesenchymal+stem+cells&rank=169>
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991; 9: 641-650
- Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J Pathol. 2009;217:318-24.
- Chalisserry EP, Nam SY, Park SH, ve diğ. Therapeutic potential of dental stem cells. J Tissue Eng. 2017 May 23;8:2041731417702531. doi: 10.1177/2041731417702531.
- Chang BH, Li L, Paul A, ve diğ. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. Mol Cell Biol. 2006 Şub;26(3):1063-76.
- Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, Zhu L. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from maternal-origin placenta and Wharton's jelly. Stem Cell Res Ther. 2015 Kas. 25;6:228. doi: 10.1186/s13287-015-0219-6
- Closs EI, Murray AB, Schmidt J, ve diğ. c-fos expression precedes osteogenic differentiation of cartilage cells in vitro. J Cell Biol. 1990 Eyl;111(3):1313-23.

Coelho de Oliveira VC, Silva Dos Santos D, Vairo L, ve diğ. Hair follicle-derived mesenchymal cells support undifferentiated growth of embryonic stem cells. *Exp Ther Med.* 2017 May;13(5):1779-1788. doi: 10.3892/etm.2017.4195

Davatchi F, Nikbin B, Shams H U.S National Library of Medicine, Clinical Trials.gov, 2015. Erişim:08.01.2018, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00550498?term=Stem+Cell+Transplantation+in+Ocular+Lesions+of+Behcet%27s+Disease&rank>

Demircan PC, Sariboyaci AE, Unal ZS, ve diğ. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction. *Cytotherapy* 2011;13:1205-1220.

Dias I, Salviano Í, Mencalha A, de Carvalho SN, ve diğ. Neonatal overfeeding impairs differentiation potential of mice subcutaneous adipose mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 2018 Nis 17. doi: 10.1007/s12015-018-9812-2.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, ve diğ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315-317

Ergün A. Yağ Hücreleri Ve Salgı Ürünlerinin Fonksiyonları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 56, Sayı 3, 2003 179-188

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, ve diğ. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 1998; 4:1313-7.

Evans MJ., Kaufmann MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981 292, 154-156.

Fink T, Zachar V. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* 2011;698: 243-51.

Frausin S, Viventi S, Verga Falzacappa L, ve diğ. Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells : Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochem.* 2015 May-Haz;117(4-5):329-38. doi: 10.1016/j.acthis.2015.02.005

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974a; 17: 331-340

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974b; 2: 83-92

Fujiwara H, Ferreira M, Donati G, ve diğ. The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell.* 2011 Şub 18;144(4):577-89. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.014.

G. R. Kirkham and S. H. Cartmell Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis Topics in Tissue Engineering, Vol. 3, 2007. Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol3/

Galmiche MC, Kotliansky VE, Brière J, ve diğ. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood.* 1993 Tem 1;82(1):66-76.

Genç D, Zibandeh N, Nain E, ve diğ. Dental follicle mesenchymal stem cells down-regulate Th2-mediated immune response in asthmatic patients mononuclear cells. *Clin Exp Allergy.* 2018 Mar 2. doi: 10.1111/cea.13126.

- Giordano R, Canesi M, Isalberti M, ve diğ. Autologous mesenchymal stem cell therapy for progressive supranuclear palsy: translation into a phase I controlled, randomized clinical study. *J Transl Med.* 2014 Oca 17;12:14. doi: 10.1186/1479-5876-12-14.
- Gözen A, Ünsal Ş.S, Gökalp M.A, Ortopedide Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları. *Van Tıp Dergisi*, 2015 22(2): 131-137
- Grausova L, Kromka A, Burdikova Z, ve diğ. Enhanced growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells on boron-doped nano crystalline diamond thin films. *PLoS One.* 2011;6(6):e20943. doi: 10.1371/journal.pone.0020943.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, ve diğ. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(25):13625–13630
- Guijarro D, Lebrin M, Lairez O ve diğ. U.S National Library of Medicine, Clinical Trials.gov, 2014. Erişim:08.01.2018, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01076920?term=mesenchymal+stem+cells&rank=188>
- Hakki SS, Kayis SA, Hakki EE, ve diğ. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *J Periodontol.* 2015 Şub;86(2):283-91. doi: 10.1902/jop.2014.140257.
- Harvey J. Kliman, M.D., The Umbilical Cord. *Encyclopedia of Reproduction.* Yale University School of Medicine. 29 Eki, 2006
- Hess DC, Borlongan CV. Stem cell and neurological diseases. *Cell Prolif* 2008; 4:94-114
- Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, ve diğ. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* 2013; 353(1): 65–78
- Hoppo T, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Baba S, Naito M, Machimoto T, Ikai I. Thy1-positive mesenchymal cells promote the maturation of CD49f-positive hepatic progenitor cells in the mouse fetal liver. *Hepatology.* 2004 May;39(5):1362-70.
- İnan S, Özbilgin K.. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 2009 1(5), 11-24.
- İsan H, Uyanık A ve Aktaş G. *Maltepe Tıp Dergisi* Eyl 2016 Cilt:8 Sayı:2
- Jakobsen RB, Shahdadfar A, Reinholt FP, ve diğ. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Kas;18(10):1407-16. doi: 10.1007/s00167-009-1017-4.
- Jeon J, Lee MS, Yang HS. Differentiated osteoblasts derived decellularized extracellular matrix to promote osteogenic differentiation. *Biomater Res.* 2018 Şub 23;22:4. doi: 10.1186/s40824-018-0115-0.
- Jiang S, Zhao L, Purandare B, ve diğ. Differential expression of stem cell markers in human follicular bulge and interfollicular epidermal compartments. *Histochem Cell Biol.* 2010 Nis;133(4):455-65. doi: 10.1007/s00418-010-0684-z.
- Jiang X, Huang X, Jiang T, ve diğ. The role of Sox9 in collagen hydrogel-mediated chondrogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells (MSCs). *Biomater Sci.* 2018 Nis 26. doi: 10.1039/c8bm00317c
- Joulai Vejjouye S, Yari A, Heidari F, ve diğ. Bulge Region As A Putative Hair Follicle Stem Cells Niche: A Brief Review. *Iran J Public Health.* 2017 Eyl;46(9):1167-1175
- Kansu E. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36:191-197

Karamouzian S, Nematollahi-Mahani SN, Nakhaee N, ve diğ. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2012; 114: 935-939 DOI: 10.1016/j.clineuro.2012.02.003

Karaöz E ve Ovalı E. *Kök Hücreler. Celepler Matbaası, Trabzon, 2004*

Karaoz E, Ayhan S, Gacar G, Aksoy A, Duruksu G, Okcu A ve diğ. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy* 2010; 12(3):288-302.

Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, Genç ZS, Yürüker S, Duruksu G, Demircan PC, Sariboyaci AE. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.* 2010 Ocak;133(1):95-112

Karaöz E, Okçu A, Gacar G ve diğ. A Comprehensive Characterization Study Of Human Bone Marrow Mscs With An Emphasis On Molecular And Ultrastructural Properties *J Cell Physiol.* 2011 May;226(5):1367-82. doi: 10.1002/jcp.22468.

Karaöz E, Okçu A, Gacar G, ve diğ. A comprehensive characterization study of human bone marrow mscs with an emphasis on molecular and ultrastructural properties. *J Cell Physiol.* 2011 May;226(5):1367-82

Kefalopoulou Z, Politis M, Piccini P, ve diğ. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA Neurol.* 2014 Oca;71(1):83-7. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.4749

Kim DW, Staples M, Shinozuka K, ve diğ. Wharton' s jelly derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci.* 2013 May 31;14(6):11692-712. doi: 10.3390/ijms140611692

Kim M, Kim I, Kim SH, ve diğ. Cryopreserved human adipogenic-differentiated pre-adipocytes: a potential new source for adipose tissue regeneration. *Cytotherapy.* 2007;9(5):468-76.

Lee EM, Kim AY, Lee EJ, ve diğ. Therapeutic Effects of Mouse Adipose-derived Stem Cells and Losartan in the Skeletal Muscle of Injured Mdx mice. - *Cell Transplant.* 2015;24(5):939-53. doi: 10.3727/096368914X678599

Lee JW, Lee SH, Youn YJ ve diğ. U.S National Library of Medicine, Clinical Trials.gov, 2011. Erişim:08.01.2018, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01392105?term=mesenchymal+stem+cells&view=record>

Lee RH, Kim B, Choi I, ve diğ. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):311-24.

Li C, Zhang W, Jiang X, ve diğ. Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells. *Cell Tissue Res* 2007;330:437-446.

Lindvall O, Widner H, Rehnström S, ve diğ. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol* 1992; 31:155–165

Liu JA, Cheung M. Neural crest stem cells and their potential therapeutic applications. *Dev Biol.* 2016 Kas 15;419(2):199-216. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.09.006.

Liu R, Chang W, Wei H, Zhang K. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Skin. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3658798. doi: 10.1155/2016/3658798.

Martella E, Bellotti C, Dozza B, ve diğ. Secreted adiponectin as a marker to evaluate in vitro the adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2014 Kas;16(11):1476-1485. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.05.005.

Martin GR. Isolation of a Pluripotent Cell Line From Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma. *Stem Cells. Developmental Biology*, 1981 Vol 78, 12 7634-7638

McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT ve diğ. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans* 1991;19:29S.

Nasef A, Mathieu N, Chapel A, ve diğ. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*. 2007 Tem 27;84(2):231-7.

National Institutes of Health, 2006. Erişim: 24.04.2018, https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006Chapter1.htm#fig1_1

Nishimura I, Hisanaga R, Sato T, ve diğ. Effect of osteogenic differentiation medium on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells in threedimensional culture with radial flow bioreactor. *Regenerative Therapy Volume 2*, Eyl 2015, Sayfa 24-31 doi.org/10.1016/j.reth.2015.09.001

Nuti N, Corallo C, Chan BM, ve diğ. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev*. 2016 Eki;12(5):511-523.

Özel B., Ozan E., Dabak Ö., Embriyonik Kök Hücreler, *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008, 28:333-341

Özen A., Sancak, İ.G. Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 2014 61, 79-84

Öztemel O, İnsan Göbek Kordon Kanı ve Periferik Kan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin *İn Vitro* Kültür Ortamına Adaptasyonuna Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi 2010

Perlea P., Rusu M.C., Dădilescu A.C., ve diğ., Phenotype heterogeneity in dental pulp stem niches *Rom J Morphol Embryol* 2016, 57(4):1187–1193

Petrini I, Barachini S, Carnicelli V, ve diğ. ED-B fibronectin expression is a marker of epithelial-mesenchymal transition in translational oncology. *Oncotarget*. 2017 Oca 17;8(3):4914-4921. doi: 10.18632/oncotarget.13615.

Pievani A, Scagliotti V, Russo FM, ve diğ. Comparative analysis of multilineage properties of mesenchymal stromal cells derived from fetal sources shows an advantage of mesenchymal stromal cells isolated from cord blood in chondrogenic differentiation potential. *Cytotherapy*. 2014 Tem;16(7):893-905

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, ve diğ. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143e7

Rouas-Freiss N, LeMaout J, Moreau P, ve diğ. HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant*. 2003 Oca;3(1):11-6.

Ryang Hwa Lee , ByungChul Kim, IkSoo Choi ve diğ. Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue Cell *Physiol Biochem* 2004;14:311-324

Saito F, Nakatani T, Iwase M, ve diğ. Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor Neurol Neurosci* 2012; 30:127-136

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, ve diğ. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005 Ağu;52(8):2521-9. Sağsöz H, Ketani M.A., Kök Hücreler *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 2008: 1 (2): 29 – 33

Sensebe L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation*. 2009;87:S49-53. Shakhova O, Sommer L. Neural crest-derived stem cells. *StemBook [Internet]*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-.2010 May 4.

- Sharma A, Sane H, Badhe P, ve diğ. A clinical study shows safety and efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy to improve quality of life in muscular dystrophy patients. *Cell Transplant*. 2013;22 Suppl 1:127-38. doi: 10.3727/096368913X672136
- Song NJ, Kim S, Jang BH, ve diğ. Small Molecule-Induced Complement Factor D (Adipsin) Promotes Lipid Accumulation and Adipocyte Differentiation. *PLoS One*. 2016 Eyl 9;11(9):e0162228. doi: 10.1371/journal.pone.0162228.
- Sztalryd C, Bell M, Lu X, ve diğ. Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFPnull embryonic cell line. *J Biol Chem*. 2006 Kas 10;281(45):34341-8.
- Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta*. 2011 Eki;32 Suppl 4:S311-5. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010
- Toyoda M, Matsubara Y, Lin K, ve diğ. Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues. *Cell Biochem Funct*. 2009 Eki;27(7):440-7.
- Turac G, Duruksu G, Karaoz E. The Effect of Recombinant Tyrosine Hydroxylase Expression on the Neurogenic Differentiation Potency of Mesenchymal Stem Cells. *Neurospine*. 2018 Mar;15(1):42-53. doi: 10.14245/ns.1836010.005.
- Venkataramana NK, Kumar SK, Balaraju S, ve diğ. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res* 2010; 155: 62-70 DOI: 10.1016/j.trsl.2009.07.006
- Vianna P, Mondadori AG, Bauer ME, ve diğ. HLA-G and CD8+ regulatory T cells in the inflammatory environment of pre-eclampsia. *Reproduction*. 2016 Ara;152(6):741-751.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, ve diğ. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-7
- Wang L, Li Z, Li Z, ve diğ. Long noncoding RNAs expression signatures in chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Oca 2;456(1):459-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.106.
- Wang Y, Liu J, Tan X, ve diğ. Induced pluripotent stem cells from human hair follicle mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*. 2013 Agu; 9(4):451-60. doi: 10.1007/s12015-012-9420-5
- Witkowska-Zimny M, Wrobel E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells : Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell Mol Biol Lett*. 2011 Eyl;16(3):493-514. doi: 10.2478/s11658-011-0019-7
- Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy*. 2007;23(2):178-187
- Yanbakan S, Hücresel Tedavi Ürünlerinin Klinik Kullanım Alanları. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2015;6 (2) 202-208 doi: 10.5799/ahinjs.01.2015.02.0519
- Yoo KH, Jang IK, Lee MW, ve diğ. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 2009;259:150-156.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, ve diğ. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. 2001;7: 211-28
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Ara.;13(12):4279-95

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Gülay ERMAN
- Doğum yeri ve tarihi: Konya/ 31.10.1983
- Uyruğu: Türk
- Medeni Durumu: Evli
- Çalıştığı kurum: Sakarya Üni. Tıbbi Biyoloji A.D
- İletişim Adresi ve telefonu: Sakarya Üni. Tıp Fak.Tıbbi Biyoloji A.D
Korucuk Kampüsü Deneysel Tıp Uyg. ve Araş. Mrk. (SÜDETAM)
0264 295 3137

2. Eğitimi

Yüksek Lisans:Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Gen Tedavileri Anabilim Dalı (2018)

Lisans :Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2008)

3. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Kök Hücre ve Hücresel Tedavi Derneği

4. Mesleki Deneyimi

- 03/2018-Halen Sakarya Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D
- 05/2016 – 01/2018 Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi
- 01/2015 – 02/2016Liv Hospital (Ulus/İstanbul) – Rejeneratif Tıp Kök Hücre Üretim ve Uygulama Merkezi.
- 11/2008-12/2014 Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi

5.Bilimsel Etkinlikler

- **Seçilmiş yayınlar**

Karaöz E, Çetinalp Demircan P, **Erman G**, Güngörürler E, Eker Sarıboyacı A. Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Turk J Haematol.* 2017 Aug 2;34(3):213-225. doi: 10.4274/tjh.2016.0171. Epub 2016 Sep 9.

Eriş E, Yüksel N, Pirhan D, Karadenizli A, Aslan M, Gacar G, **Erman G**, Subaş C, Uzuner H, Yldz DK, Karaöz E. Evaluation of Effect of Topical Tacrolimus Treatment on Herpetic Stromal Keratitis in a Rat Model. *Eye Contact Lens.* 2016 May;42(3):163-70. doi: 10.1097/ICL.0000000000000162.

Emre E, Yüksel N, Duruksu G, Pirhan D, Subaşı C, **Erman G**, Karaöz E. Neuroprotective effects of intravitreally transplanted adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an experimental ocular hypertension model. **Cytotherapy.** 2015 May;17(5):543-59. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.12.005. Epub 2015 Jan 22

Simsek T, Duruksu G, Okçu A, Aksoy A, **Erman G**, Utkan Z, Cantürk Z, Karaöz E. Effect of hypothyroidism in the thyroidectomized rats on immunophenotypic characteristics and differentiation capacity of adipose tissue derived stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(5):617-29.

Sarıboyacı AE, Demircan PC, Gacar G, Unal ZS, **Erman G**, Karaoz E. Immunomodulatory properties of pancreatic islet-derived stem cells co-cultured with T cells: does it contribute to the pathogenesis of type 1 diabetes? *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014 Mar;122(3):179-89. doi: 10.1055/s-0034-1367004.

Adas G, Kemik O, Eryasar B, Okçu A, Adas M, Arikan S, **Erman G**, Kemik AS, Kamali G, Dogan Y, Karaoz E. Treatment of Ischemic Colonic Anastomoses with Systemic Transplanted Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (Experimental Study). *Eur Rev Med Pharmacol Sci,* 2013 Sep;17(17):2275-85.

Adem Aydın, Gokhan Duruksu, **Gulay Erman**, Cansu Subası, Ayca Aksoy, Zehra Seda Unal, Erdal Karaoz Neurogenic Differentiation Capacity of Subacromial Bursal Tissue—Derived Stem Cells September 2013 in Wiley Online Library

Kasap M, Karaoz E, Akpınar G, Aksoy A, **Erman G**. Unique Golgi Apparatus Distribution In Stem Cells. Cell Biochemistry & Function, 29(6):489-95,2011.

Karaoz E, Ayhan S, Okçu A, Aksoy A, **Bayazit G**, Gürol AO, Duruksu G. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Co-Cultured With Pancreatic Islets Display Beta Cell Plasticity. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 5(6):491-500,2011.

- **Konferans ve akademik projeler:**

Kaya A., Gacar G., Halbutoğulları Z.S.Ü., Duruksu G., **Erman G.**, Yazır Y., Therapeutic Effect of Acetyl-11-Keto-Beta-Boswellic Acid (AKBA) with Mesenchymal Stem Cells in Anaplastic Thyroid Cancer. 1st International Congress On Cancer and Ion Channels September 21-23 2017 Sanliurfa, Turkey. **(sözlü bildiri)**

Aciksari A., Turac G., Polat S., Duruksu G., Gacar G., Erman G., Yusufhan Y., A Novel Isolation Method For Rat Brain Pericytes And Their Characterization. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry “From Molecules to Diseases” May 18-21,2017 Antalya,Turkey.**(poster)**

Mezenkimal Kök Hücre ve CD4+ T Lenfosit Alt Grupları Arasındaki Etkileşimlerde Yaşlanmanın Etkileri- Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi –**Araştırmacı** 2014-2015

Yusufoğlu S, Aksoy A, İnci Ç, Sağlam Ö, **Erman G**, Karaöz E. Effects of CD4+ and CD8+ T Cells Derived From Type 1 Diabetic Patients and Healthy Individuals on Human β Cells. Beta Cells in Health and Disease P23 May 21-22 2014 Kocaeli, Turkey. **(poster)**

Sariboyaci AE, Demircan PC, Gacar G, Unal ZS, **Erman G**, Karaoz E. Immunomodulatory Properties of Rat Pancreatic Islet-Derived Stem Cells Co-Cultured with Spleen T cells: Does It Contribute to the Pathogenesis of Type 1 Diabetes? Beta Cell Workshop 2013 Kyoto, P66, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, April 23-26, 2013 **(sözlü bildiri)**

Karaöz E, Sariboyacı AE, Demircan PÇ, **Erman G**, Ünal ZS, Okçu A. İnsan Kemik İliği, Yağ Dokusu ve Göbek Bağı Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Bağışık Baskılayıcı Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, s39, 31 Ekim- 3Kasım 2012, Antalya **(sözlü bildiri)**

Mehtap Ö, Gacar G, Aksoy A, Ateşoğlu EB, Tarkun P, **Erman G**, Can B, Hacıhanefioğlu A, Karaöz E. KLL’de Treg Hücreleri: Bozuk İşlev ve Yüksek CD39 İfadesi, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, s9, 31 Ekim- 3Kasım 2012, Antalya **(sözlü bildiri)**

Karaöz E, Şimşek T, Okçu A, Aksoy A, Duruksu G, **Erman G**, Cantürk NH, Utkan NZ, Tiroidektomi Sonrası Hormon Replasmanı Yapılmamış Ratların Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin İmmunofenotipik, İmmunogenetik, Yapısal ve Telomeraz Enzim Aktivite Özelliklerinin İncelenmesi, III. Kök Hücre Sempozyumu, s10, 30 Kasım-1 Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul (**sözlü bildiri**)

Eker Sarıboyacı A, Çetinalp Demircan P, Unal ZS, **Erman G**, Aksoy A, Karaoz E. Immunomodulatory and Immunosuppressive Properties Of Rat Pancreatic Islet Derived Stem Cells Co-Cultured with Rat Spleen CONA-CD3+T Cells, 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application Conference, P43, 7-9 Ekim, 2011, Kayseri/TÜRKİYE. (**sözlü bildiri**)

Emre E, Yüksel N, Çağlar Y, Pirhan D, Subaşı C, Duruksu G, **Erman G**, Karaöz E, Yıldız K, Deneysel glomda intravitreal olarak uygulanan kök hücrelerin nöron koruyucu etkisi. Türkiye Oftalmoloji Derneği (TOD) 45. Ulusal Kongresi, 5-9 Ekim 2011 (**En İyi Araştırma 2. Ödülü**)

Aksoy A, Subaşı C, Ünal ZS, Mehtap Ö, **Erman G**, Karaöz E, Sağlıklı ve multiple myeloma olgularının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaştırma potansiyelinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, OP-19, S181, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya. (**sözlü bildiri**)

Demircan Çetinalp P, Eker Sarıboyacı A, Genç ZS, **Bayazit G**, Aksoy A, Subaşı C, Karaöz E. Mezenkimal Kök Hücre Sitokinlerinin Uyarılmış T-Hücreleri Üzerine Parakrin Yolla İmmünosupressif Etkisi. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, OP-21, s70, 29 Eylül-01 Ekim 2010, Samsun. (**sözlü bildiri**)

Erman G, Duruksu G, Aksoy A, Öncel B, Gacar G, Karaöz E, FACS analyses of human adult stem cells from various tissues: identification of distinctive immunophenotypic markers, 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application Conference, P55, 7-9 Ekim, 2011, Kayseri/TÜRKİYE. (**poster**)

Aksoy A, Akkoç T, **Erman G**, Subaşı C, Okçu A, Oğulur I, Gürhan G, Barlan I, Karaöz E. A comparison of Isolation Methods for Mouse Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow. Molecular Immunology & Immunogenetics Congress, PP-84, 2012, Antalya, Turkish Journal of Immunology, Supplement (Molecular Immunology & Immunogenetics Congress-Abstract Book), 2012 (**poster**)

Subasi C, **Erman G**, Unal ZS, Sağlam Ö, Gacar G, Karaoz E. Normal ve Malign Meme Dokusundan İzole Edilen Stromal Hücrelerin İmmunofenotipik, Genomik, Çoğalim Ve Apoptoza Direnç Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, PP-30, S219, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya (**poster**)

Karaöz E, Şimşek T, Okçu A, Aksoy A, Duruksu G, **Erman G**, Cantürk NH, Utkan NZ, Tiroidektomi Sonrası Hormon Replasmanı Yapılmamış Ratların Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin İmmunofenotipik, İmmunogenetik, Yapısal ve Telomeraz Enzim Aktivite Özelliklerinin İncelenmesi, III. Kök Hücre Sempozyumu, s10, 30 Kasım-1 Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul (**poster**)

Karaöz E, Ayhan S, Okcu A, Aksoy A, **Bayazit G**, Gurol A, Duruksu G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-cultured with pancreatic islets display beta-cell plasticity. Haematologica 2010; 95(S2): 662 (**poster**)

Genç ZS, Sağlam Ö, Ayhan S, **Bayazit G**, Karaöz E. Nestin erişkin kök hücreler için ortak bir belirteç olabilir mi? THD 35. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Kitabı. s:87-88, Antalya 2009 (**35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Genç Katılımcı Ödülü.**)

Karaöz E, Sarıboyacı AE, Gacar G, Kasap M, Ayhan S, Aksoy A, Genç ZS, Okcu A, Demircan PÇ, **Bayazit G**, Sağlam Ö. Sıçan Pankreatik Adacık Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Antijen Sunma Özelliklerinin Araştırılması. (**Türk Diyabet Vakfı Diabetes Mellitus 2009 Yılı En İyi Bilimsel Proje Destek Ödülü 1.si.**)