

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı**

**ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDEN KONDROSİT FARKLILAŞMASI**

**Hazırlayan
Doğa YAŞAR**

**Danışman
Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2014
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı**

**ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDEN KONDROSİT FARKLILAŞMASI**

Hazırlayan

Doğa YAŞAR

Danışman

Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2013-4478 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ONAYI

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Doğa YAŞAR

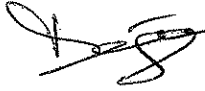
İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerden Kondrosit Farklılaşması”
adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma
Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Doğa YAŞAR



Danışman

Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ



Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL



Prof Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ danışmanlığında Doğa YAŞAR tarafından hazırlanan “**Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerden Kondrosit Farklılaşması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

26 / 12 / 2014

(Tez Savunması Sınav Tarihi)

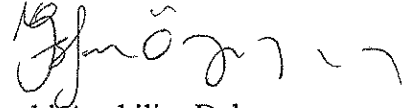
JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ
Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN

Erciyes Üniversitesi Plastik-Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Servet ÖZCAN

Erciyes Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve
sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Saim Özdamar

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı'nda öncelikle anabilim dalına adaptasyonumda, çalışmalarımı yönlendirmesinde, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımları ile akademik ortamda olduğu kadar laboratuvar deneyimi ve beceri kazanmamda desteğiyle gelişimime destek olan güzel insan, danışman hocam Prof Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ'a, akademik eğitimim boyunca güler yüzü, destekleyici tavır gösteren ve araştırma laboratuvarlarındaki çalışmalarımıza sağladıkları kolaylıklardan dolayı Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı ve Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Müdürü Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a, laboratuvar çalışmalarımızda verdiği destek için Müdür Yardımcısı Doç Dr. Servet ÖZCAN'a, çalışmamız için adipoz doku örneklerini cerrahi girişimle alan Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN ile bilimsel danışmanlığı ve laboratuvar deneyimleri ile desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Yusuf BARAN'a, yüksek lisans dersi aldığım saygıdeğer hocalarıma ve tezimin laboratuvar kısmında yardımcı olan GENKÖK GMP laboratuvarı çalışanı değerli arkadaşlarıma, yüksek lisans öğrenimim sırasında ders ve çalışmalarına devam edebilmem için gösterdiğim insanüstü gayreti destekledikleri ve sağladıkları kolaylıklar için, Sağlık Bakanlığı'ndaki amirlerime ve mesai arkadaşlarıma, yaşamımın her döneminde bana güven duyan çalışmalarım süresince beni destekleyerek ihtiyacım olduğu her an yanımda olan aileme ve tez dönemim boyunca bana anlayış gösteren sevgili arkadaşlarıma yürekten teşekkür ederim.

Doğa YAŞAR

Kayseri 2014

ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN KONDROSİT FARKLILAŞMASI

Doğa YAŞAR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2014

Danışman: Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

KISA ÖZET

İnsan adipoz mezenkimal kök hücreleri, adipoz dokuda bulunan ve hematopoetik olmayan multipotent öncü hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler (MKH) kolay izole edilebilmeleri, dönüşüm potansiyellerini kaybetmeden *in vitro* olarak hızlı çoğalabilmeleri ve farklılaşma yetenekleri dolayısıyla doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Avasküler bir yapıda olan kırık dokusunun kendini yenileme ve tamir etme yeteneği çok düşüktür. MKH ile ilgili birçok hücresel ve moleküler mekanizma ortaya kondukça araştırmalar, kırık dokunun tamirini kolaylaştıracak ve yeni doku oluşturacak tedavi seçenekleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada amacımız, insan yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin mikromas kültür tekniği ile kondrosit hücrelerine dönüşmesini sağlamak ve adipoz dokudan kırık doku oluşturma araştırmalarına katkı sağlamaktır. Yaşları 20 ile 50 arasında değişen, herhangi bir sistemik hastalığı olmayan plastik cerrahi kliniğine tedavi edilmek amacıyla yatırılan 4 sağlıklı kadından cerrahi işlemle alınan yağ dokusu örnekleri MKH elde etmek amacıyla izolasyon işleminin ardından *in vitro* kültüre edildi. A-MKH kültürleri, her bir hasta için 3 ve 4 pasajlaşmayı takiben, kondrojenik kültür medyumunu kullanılarak kondrosit farklılaştırması işlemi uygulandı. Yaklaşık iki hafta sonra oluşan pelletler Alizarin Red ile boyandı ve pelletlerin kondrojenik pelletler olduğu gösterildi. Çalışmamızda *in vitro* ortamda elde edilen bu bulgular, adipoz kaynaklı MKH'lerin *in vivo* ortamda da kondrosit hücrelerine farklılaşabileceğini düşündürmektedir. Adipoz kaynaklı MKH'ler ortopedide ve spor hekimliğinde kemik, kırık gibi hasarlı dokuların tamirinde, plastik ve rekonstrüktif cerrahide yumuşak doku hacimlendirilmesinde ve kulak, burun gibi kırık dokuların üç boyutlu (3B) üretimi amacıyla kullanılabilir. Geleceğin hücre tabanlı tedavilerinde, 3B biyo-yazıcı ile hastanın kendi normal hücreleri ile kök hücrelerini biyo-mürekkep olarak kullanılarak, ihtiyaç duyulan doku hatta organlarının birebir kopyasını üretebilmek mümkün olabilecektir. Öyle görünüyor ki; kök hücrelerle ilgili deneyim kazanıldıkça, MKH'lerin klinik kullanımları daha yaygın ve daha güvenli hale gelecektir.

Anahtar sözcükler: Adipoz doku; Erişkin kök hücre; Hücre kültürü; Kondrojenik farklılaşma; Mezenkimal kök hücreler.

CHONDROGENIC DIFFERENTIATION from MESENCHYMAL STEM CELLS of ADIPOSE TISSUE ORIGIN

Doğa YAŞAR
Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Stem Cell
M.Sc. Thesis, December 2014
Supervisor: Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

ABSTRACT

Human adipose mesenchymal stem cells found in the adipose tissue are nonhematopoietic cells that have multipotent progenitor characteristics. Mesenchymal stem cells (MSCs) have great potential for tissue engineering and regenerative medicine applications because of their ability to differentiate and to multiply rapidly *in vitro* without losing their differentiation capabilities. Cartilaginous tissue's ability to regenerate and self-repair is very limited because it has an avascular structure. As more molecular and cellular mechanisms related to MSCs are introduced, research has intensified on treatment options that could ease cartilage reparation and enable new tissue generation.

The purpose of this study is to enable the conversion of MSCs of human adipose tissue origin to chondrocytes by using micromass culture techniques and thus to contribute to the research on cartilaginous tissue differentiation from human adipose tissue. Adipose tissue samples from 4 healthy women were cultured *in vitro* after isolation procedures with the purpose of obtaining MSCs. None of the women had any systemic disease, they were at ages 20-50 and they were all hospitalized at a plastic surgery clinic for surgery either for aesthetic concerns or for functional disturbances. Chondrocyte differentiation procedure has been utilized by using chondrogenic culture media following 3-4 passages for each patient. Pellets that were formed after about two weeks were dyed with Alizarin Red and were shown to be chondrogenic pellets. The findings obtained *in vitro* in our study suggest that MSCs of adipose origin can differentiate into chondrocytes *in vivo* as well. MSCs of adipose origin can be utilized in reparation of bone and cartilage damages in Sports Medicine and Orthopedics, soft tissue volume augmentation in Plastic and Reconstructive Surgery and 3-D creation of cartilaginous tissues like ear and nose in E.N.T. In future cell-based treatments, it will be possible to create exact copies of the needed tissues-or even organs by using a 3-D bio-printer and by using the patient's own stem cells and normal cells as bio-ink. Obviously, as more experience is gained related to the stem cells, clinical utilization of MSCs will be safer and more prevalent.

Key Words: Adipose tissue; Adult stem cells; Cell culture; Chondrogenic differentiation; Mesenchymal stem cells.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL ve ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO ve ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
RESİM LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KÖK HÜCRELER ve ÖZELLİKLERİ.....	3
2.2. FARKLILAŞMA YETENEKLERİNE GÖRE KÖK HÜCRELER.....	6
2.2.1. Totipotent kök hücreler.....	6
2.2.2. Pluripotent kök hücreler.....	8
2.2.3. Multipotent kök hücreler.....	8
2.2.4. Oligopotent kök hücreler.....	9
2.2.5. Unipotent kök hücreler.....	9
2.3. ELDE EDİLDİKLERİ KAYNAĞA GÖRE KÖK HÜCRELER.....	10
2.3.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	10
2.3.2. Yetişkin Tip Kök Hücreler.....	12
2.3.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPSCs).....	14
2.4. KÖK HÜCRE ARAŞTIRMALARININ TARİHSEL GELİŞİMİ.....	15
2.5. KÖK HÜCRE PLASTİSİTESİ.....	17
2.5.1. YKH Plastisitesini Açıklayan Mekanizmalar.....	17
2.5.2. Kök Hücre Plastisitesi İçin Kanıtlar ve İn Vitro Farklılaştırma Yöntemleri	19

2.5.2.1. Kùltür Koşullarının Modifikasyonlarına Yönelik Girişimler	19
2.5.2.2. Genomu Değıştirmeye Yönelik Girişimler (Genetik Modifikasyonlar).....	20
2.6. HÜCRE FARKLILAŞMASI.....	21
2.6.1. Hücre Farklılaşması Yolları.....	21
2.6.2. Pluripotenside Büyüme Faktörlerinin Etkisi.....	23
2.6.3. Kök Hücre Mikroçevresi (Niche; Niş).....	23
2.6.4. Hücre Siklusu Düzenleyicileri.....	27
2.6.5. Kendini Yenileme (Self-Renewal).....	28
2.6.6. CD Yüzey Belirteçleri.....	29
2.7. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER.....	30
2.7.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Özellikleri.....	31
2.7.2. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları.....	33
2.7.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli.....	34
2.7.4. Kök Hücre ve Mezenkimal Kök Hücrelerin Rejeneratif Tıptaki Terapötik Potansiyeli.....	35
2.7.5. Mezenkimal Kök Hücreleri Kullanım Avantajları.....	36
2.7.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kullanım Zorlukları, Komplikasyon ve Potansiyel Riskler.....	37
2.8. ADİPOZ (YAĞ) DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER.....	39
2.9. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE FARKLILAŞMASI.....	40
2.10. KIKIRDAK DOKU ve KONDROSİT HÜCRESİ.....	41
2.10.1. Kıkırdak Dokusunun Önemi.....	42
2.10.2. Kondrojenesi Etkileyen Faktörler	44
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	46
3.1. Kullanılan Ekipman ve Gereçler.....	46
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	47
3.3. Yöntem.....	47
3.3.1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlığı.....	48
3.3.2. Yağ Dokusundan Mezenkimal Hücre İzolasyonu Yöntemi	48
3.3.3. Yağ Dokusundan Mezenkimal Hücre Kùltürü Yöntemi.....	50

3.3.4. Tripsinizasyon.....	50
3.3.5. Hücre Canlılığı Testi.....	51
3.3.6. Kondrojenik Farklılaştırma Yöntemi.....	51
4.BULGULAR.....	53
5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	58
6.KAYNAKLAR.....	63
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO ve ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. ISCT tarafından MKH tanımlaması için gerekli kriterlerin özeti	32
Tablo 4.1. Dört kişinin skorlanan hücre sayısı, ml’de hücre sayıları ve hücrelerin canlılık oranları(%).....	55
Şekil 2.1. Kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli	5
Şekil 2.2. Totipotent kök hücreler.....	7
Şekil 2.3. Pluripotent kök hücreler.....	8
Şekil 2.4. Multipotent kök hücreler.....	9
Şekil 2.5. Embriyonik kök hücreler.....	11
Şekil 2.6: Kök hücrelerin <i>in vivo</i> ortamdaki nişinin şeması.....	24
Şekil 2.7. Ökaryot hücre siklusu.	28
Şekil 2.8. MKH’lerin farklı sinyal moleküllerine yanıt olarak gösterdikleri değişik yöndeki farklılaşmaları	35
Şekil 2.9. Kondrojenik farklılaşma için gerekli indükleyici ajanlar.	45

RESİM LİSTESİ

Sayfa

- Resim 3.1.** Adipoz dokunun bağ dokulardan ayrılması ve parçalanması işlemi.49
- Resim 4.1.** Adipoz dokudan MKH izolasyonu sonucunda hücrelerin kültür ortamına alındığında tabana yapışan MKH'lerin mikroskopik görünümüleri (x 200)..... 54
- Resim 4.2.** Adipoz kaynaklı MKH'lerin, ikinci pasaj sonrası mikroskopik görünümüleri (x 100)..... 54
- Resim 4.3.** Adipoz kaynaklı MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma medyumunda kültüre edilmesi sonucu oluşan kondrojenik pelletlerin Alizarin Red ile boyanmadan (a) ve Alizarin Red ile boyandıktan sonraki (b) görünümüleri (x 100)..... 56
- Resim 4.4.** Adipoz kaynaklı MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma medyumunu ile kültüre edilmesi sonucu oluşan kondrojenik pelletler (x 100). 57

KISALTMALAR LİSTESİ

3B (3D)	: Üç boyutlu
α	: Alfa
α-MEM	: Alfa Minimal Esensiyel Besi Ortamı
ALS	: Amiyotrofik Lateral Skleroz
β	: Beta
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
BMP-2	: Kemik Morfogenetik Proteini 2
bFGF	: Bazal Fibroblast Büyüme Faktörü
Coll II	: Kollajen Tip 2
CD	: Clusters of differentiation (farklılaşma kümeleri)
DAB	: Diaminobenzidine
DMEM-LG	: Dulbecco's Modified Eagle Medium With Low Glucose
DMEM-HG	: Dulbecco's Modified Eagle Medium With High Glucose
DMSO	: Dimetilsulfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EB	: Embriyoblast
EDTA	: Etilendiamintetraasidik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
ERK	: Hücre Dışı Sinyalleri Düzenleyici Kinaz
FCS	: Fetal Calf Serum
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	(US Food and Drug Administration): Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Yönetimi
FGFs	: Asidik ve Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
GAG	: Glikozaminoglikan
GENKÖK	: Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi
GER	: Granürlü Endoplazmik Retikulum
GMP	: Good Manufacturing Practice
gp130	: Glikoprotein 130

Hcl	: Hidroklorikasit
H-E	: Hematoksilen-Eozin
HKH	: Hematopoietik Kök Hücreler
hPL	: Human Platelet Lysate
HUES	: İnsan Embriyonic Kök Hücreleri
ITS+Premix	: İnsulin Transferin Selenium
IPSCs	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
ISCT	: International Society of Cellular Therapy
IL	: İnterlökin
İHK	: İç Hücre Kütlesi
IPSCs	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
ITS	: İnsulin, Transferrin, Selenium
IVF	: İn vitro fertilizasyon
JAK	: Januz Kinaz
KİKH	: Kemik İliği Kök Hücreleri
KİSKH	: Kemik İliği Stromal Kök Hücreleri
KKH	: Kanser Kök Hücreleri
KOGEM	: Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi
LIF	: Lösemi İnhibitor Faktör
LİFRβ	: Lösemi İnhibitör Faktör Resöptör Beta
M	: Molar
MAPK	: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MHC	: Majör Histocompatibilite
MitC	: Mitomisin-C
MKH	: Mezenkimal kök hücre
MSCs	: Mesenchymal Stem Cells
mRNA	: Haberci Ribonükleik asit
MS	: Multipleskleroz
N	: Normal
NAD/NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NEAA	: Esansiyel Olmayan Aminoasitler

NK	: Natural Killer
NHP	: Nanog Homeobox Proteini
nM	: Nanomolar
OCT	: Octamer binding transcription factor
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PDGF	: Trombositlerce Salınan Büyüme Faktörü
PLA	: Processed Lipoaspirate
P/S	: Penisilin/ Streptomisin
POU	: Pit-Oct-Unc
Ras	: Ras Bağlı Faktör
RNA	: Ribonükleik asit
SDF-1	: Stromal derived factor-1
SOX2	: Spesifik Embriyonik Antijen
SOX9	: Kondrojenik Farklılaşma Proteini
STAT	: Signal Transducers and Activators of Transcription
SSEA	: Spesifik Embriyonik Antijen
STO	: Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri
TGF β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TNF	: Tümör nekroz faktör
TUNEL	: Apoptoza giden hücreleri boyama yöntemi
VTN	: Vitronektin
YKH	: Yetişkin Kök Hücre

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kök hücreler mitoz bölünmeyle özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen, uzun süre bölünebilen, kendilerini yenileme, organizmanın ihtiyacına göre farklılaşma kapasiteleri olan, özelleşebilen, organizmanın tüm hücrelerinin köken aldığı temel hücre tipleridir. Bunu belirleyen çevresel uyarılar; büyüme faktörleri, epigenetik faktörler ve diğer çevresel etkenlerdir. Farklılaşma yeteneklerine göre sınıflandırılan kök hücrelerden, totipotent kök hücreler zigot ve blastomerden elde edilebilir ve tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler. Pluripotent kök hücreler, embriyonik zar haricinde tüm hücre tiplerini oluşturabilen, embriyonik gelişimin temeli olan endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarını oluşturabilen hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler (MKH), hematopoietik kök hücre gibi multipotent kök hücreler, kaynaklandıkları dokuya ait hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptirler (1).

Kıkırdak sınırlı rejeneratif potansiyeli olan avasküler bir dokudur. Son zamanlarda geliştirilen stratejiler, büyük ölçüde kıkırdak rejenerasyonunu sağlamaya yöneliktir ve bazı kas-iskelet bozuklukları modern tıbbın geleneksel yöntemleri ile tedavi edilemez. Kıkırdak rejenerasyonu için otolog kondrosit implantasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna rağmen otolog kondrositleri kullanarak yapılan birçok tedavi küçük dolgularla sınırlıdır. Kulak ya da burun gibi organların amputasyonu ya da konjenital yokluğu ve bunların rekonstrüksiyonunda doku mühendisliği uygulamalarına ihtiyaç vardır. Otolog kondrositlerin, üç boyutlu (3B) iskelelere ekilmesi gibi mekanik çözümler için adipoz dokudan izole edilen mezenkimal kök hücreler destek sağlayabilir.

MKH ile yapılan kondrosite farklılaştırma çalışmaları, doku mühendisliği ile 3 boyutlu organ ve doku üretimi için umut verici olabilir. Omurilik hasarı sonucu ortaya çıkan felçler, iyileşemeyen kırıklar, kondrosit (kıkırdak) dejenerasyonları ve benzeri pek çok hastalıkların tedavisinde son yıllarda kök hücrelerden elde edilen kondrositlerle hasar gören doku-hücre veya organların işlevlerini yerine koymak (rejeneratif tıp) ya da tamir etmenin (reparatif tıp) mümkün olabileceği düşünülmektedir (2).

Bundan 20 yıl öncesine kadar kök hücre ile ilgili pek az şey bilinirken bugün gelinen noktada elde edilen bazı sonuçlar, kök hücrelerin uzak olmayan bir gelecekte beklendiğinden çok daha fazla soruya çözüm ve potansiyel fırsat oluşturabileceğini göstermektedir. Kök hücrelerin bilimsel gelişim sürecinde, Oscar Wilde'in şu sözlerini hatırlamak yararlı olabilir: *“Öyle çalışmalar yapılır ki, bir kenarda bekler durur ve insanlar onu uzun süre anlayamaz. Bunun nedeni, henüz sorulmamış soruların cevapları olmalarıdır; ne yazık ki bu sorular, cevaplarından çok daha sonra ortaya atılırlar.”*

Bu çalışmada temel amacımız; insan yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin uygun koşullarda kondrosit hücrelerine dönüşmesini sağlamak ve adipoz dokudan kıkırdak doku oluşturma araştırmalarına temel oluşturmaktır. Tıp alanındaki ilerlemelere paralel olarak travma ya da başka bir sebeple kıkırdak doku kaybı tedavilerinde kullanılabilecek kondrosit hücrelerinin Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Araştırma laboratuvarında yapıldığını göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÖK HÜCRELER ve ÖZELLİKLERİ

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip olan, bu özelliklerini kendilerine özgü olan sinyaller vasıtasıyla gerçekleştiren olgunlaşmamış öncü hücrelerdir. Çoğu doku tipinin oluşumunu sağlayan prekürsör hücreler olan kök hücreler, pek çok yetişkin memeli dokusunda identifiye edilebilmektedir. Epitel ve kan gibi bazı dokularda normal hücresel yaşlanma veya hasardan dolayı kaybolan hücrelerin tekrar yapılmasına katkı sağlamaktadırlar. Bununla birlikte, sınırlı bir hücresel rejenerasyona sahip olan beyin ve pankreas gibi diğer yetişkin organlarda da bulunmaktadır (3). Leipzig’de 2001 yılında toplanan “doku kök hücreleri çalışma grubu”, kök hücreyi tarif etmiştir. Bu tarife göre, bir dokuya ait kök hücre, fonksiyonel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak heterojen hücrelerdir (4). Bu hücreler;

- a. Uygun bir çevreye yerleşme,
- b. Çoğalma,
- c. Çok sayıda farklılaşmış yeni hücreler oluşturma,
- d. Kendini yenileme ve idame ettirme,
- e. Bir hasar oluştuğunda burada yeni bir dokuyu oluşturabilme yeteneğine sahiptir.

Bir kök hücrenin pratikteki tanımı, işlevselliğidir. Kök hücreler, bir ömür boyu dokuları yenileme yeteneğine sahip hücreyi tanımlar. Örneğin, kemik iliği ya da hematopoetik kök hücre (HKH) tanımlayan bir deney, hücre naklini ve HKH'ler olmaksızın canlılığını korumasını belirleme yetisindedir. Kök hücreler, yeni kan hücrelerini ve uzun vadede bağışıklık hücrelerini üretebilme yeteneğindedir ve hasarlı dokuya transplante edildiklerinde dokuda işlevsellik kazanabilen hücrelerdir. Ayrıca, nakil olan bir canlıdan, kök hücrelerin tekrar saflaştırılması mümkündür. Kök hücrelerin kendilerini yenileme yeteneğini, HKH'ler olmaksızın yapılan nakiller göstermektedir.

Kendi kendini yenileyebilme özelliğiyle kök hücreler, *in vitro* ortamda kültüre alındıklarında somatik hücrelerden çok daha fazla üremektedirler. Kültür ortamında kök hücre popülasyonu sayısı herhangi bir kanserleşme olmaksızın 160 kez iki katına çıkarken, normal vücut hücrelerinin popülasyonu sadece 60 kez iki katına çıkmaktadır. *In vivo* ortamda ise, yetişkin kök hücrelerin üreme özellikleri canlının yaşam uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (5). Kök hücreler, asimetric bölünmektedirler ve bölünme sonucu oluşan iki hücreden bir tanesi kök hücre özelliğindedir ve diğeri farklılaşacağı dokuya ait hücrenin özelliğindedir. Bu özellikleri nedeniyle kök hücreler, bölündüklerinde kendilerini yenileyerek bir havuz oluştururlar. Ancak, sınırsız üreme özellikleri kanserleşmeyi de uyarabileceğinden hücrelerin sınırlayıcı kontrol mekanizmaları vardır. Kök hücrelerin kontrol mekanizmasını, kök hücre nişinden gelen hücre dışı sinyaller belirlemektedir (6). Kök hücrelerin asimetric bölünebilme özelliklerini koruması, hücreler arası maddeden gelen transkripsiyonel faktörlerle gerçekleşmektedir. Yetişkin kök hücrelerin, *in vivo* ve *in vitro* ortamda multipotent özelliğini korumasını sağlayan genler kaynaklarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin kemik iliği kök hücrelerinin *in vivo* ortamda Scl, GATA-2, Bmi-1 genlerinin ifade olması farklılaşmasını engellerken, *in vitro* ortamda Hoxb4 genin ifade olması farklılaşmasını engellemektedir. İskelet kası kök hücreleri için Pax-7, nöral kök hücreler için nestin geni multipotent özelliğini belirleyen genlerdir (7).

Kök hücreler, uygun koşullar altında birçok farklı dokuların hücrelerine farklılaşabilme özelliğine sahiptirler ve bu özelliklerine göre kendi aralarında gruplandırılabilirler. Örneğin, kök hücre canlının tamamını oluşturabilme özelliğindense bu hücrelere totipotent kök hücre; eğer canlının bütün doku ve organlarına farklılaşabilme

özelliğindeyse bu hücelere de pluripotent kök hücre denilmektedir. Farklılaşma özellikleri izole edildikleri dokuya göre sınırlanıyor ise bunlara da multipotent kök hücre denilmektedir (8). Kök hücrelerin, izole edildikleri kaynaklara göre totipotent, pluripotent ve multipotent özellikte oldukları söylenebilir. Yetkinlik kök hücrenin diğer hücelere (farklı hücre tiplerine) farklılaşma potansiyelini belirtir (1, 9) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli (9).

Klon oluşturabilmeleri kök hücrelerin bir diğer karakteristik özelliğidir. Kültür ortamında bir tane hücre üremesi, klon oluşturmaya için yeterlidir (10).

Kök hücrelerin diğer memeli hücreleri ile kıyaslandıklarında onlardan ayıran bazı özellikleri vardır (4). Bunlardan ilki; uygun sinyallerle karşılaşmadıkları sürece diferansiye olmamış hücrelerdir, spesifik değildirler ve dokuya has özelliklere sahip değildirler. Ayrıca geniş bir kendi kendilerini yenileyebilme kapasiteleri vardır, bu özelliklerini organizmanın yaşamı boyunca sürdürürler. Bu nedenle, *in vitro* koşullarda tedavi amacıyla bol miktarda üretilebilirler. Ayrıca, özel biyolojik sinyallerin etkisiyle fenotipik olarak prekürsöründen farklı özelleşmiş hücreye dönüşebilirler. Bölünüp, çoğalabilme (proliferasyon) ve kendini yenileyebilme (rejenerasyon) kök hücrelerin önemli bir özelliğidir. Bazı hücreler, uygun sinyaller ile uyarıldıklarında bölünmek üzere sessiz kalırlar (10).

Farklılaşmamış kök hücrelerin diğer hücrelerden farklı olarak, başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (self-renewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multilineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (12). Sonuçta meydana gelen hücrelerin özelleşmediği ve bu nedenle de bu hücrelerin uzun dönemde kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Hücrelerin bölünme kapasitelerini kromozomların uç kısmında bulunan ve “telomer” denilen DNA zincirleri belirler. Telomerler ne kadar uzunsa hücreler o kadar çok bölünebilirler. Telomerlerin uzun kalmasını sağlayan “telomeraz enzimi”dir. Bir hücrede telomeraz enzimi ne kadar aktif ise telomer uzunluğu o kadar korunabilir. Kök hücreler yoğun telomeraz enzim aktivitesinden dolayı çok sayıda bölünebilirler (13).

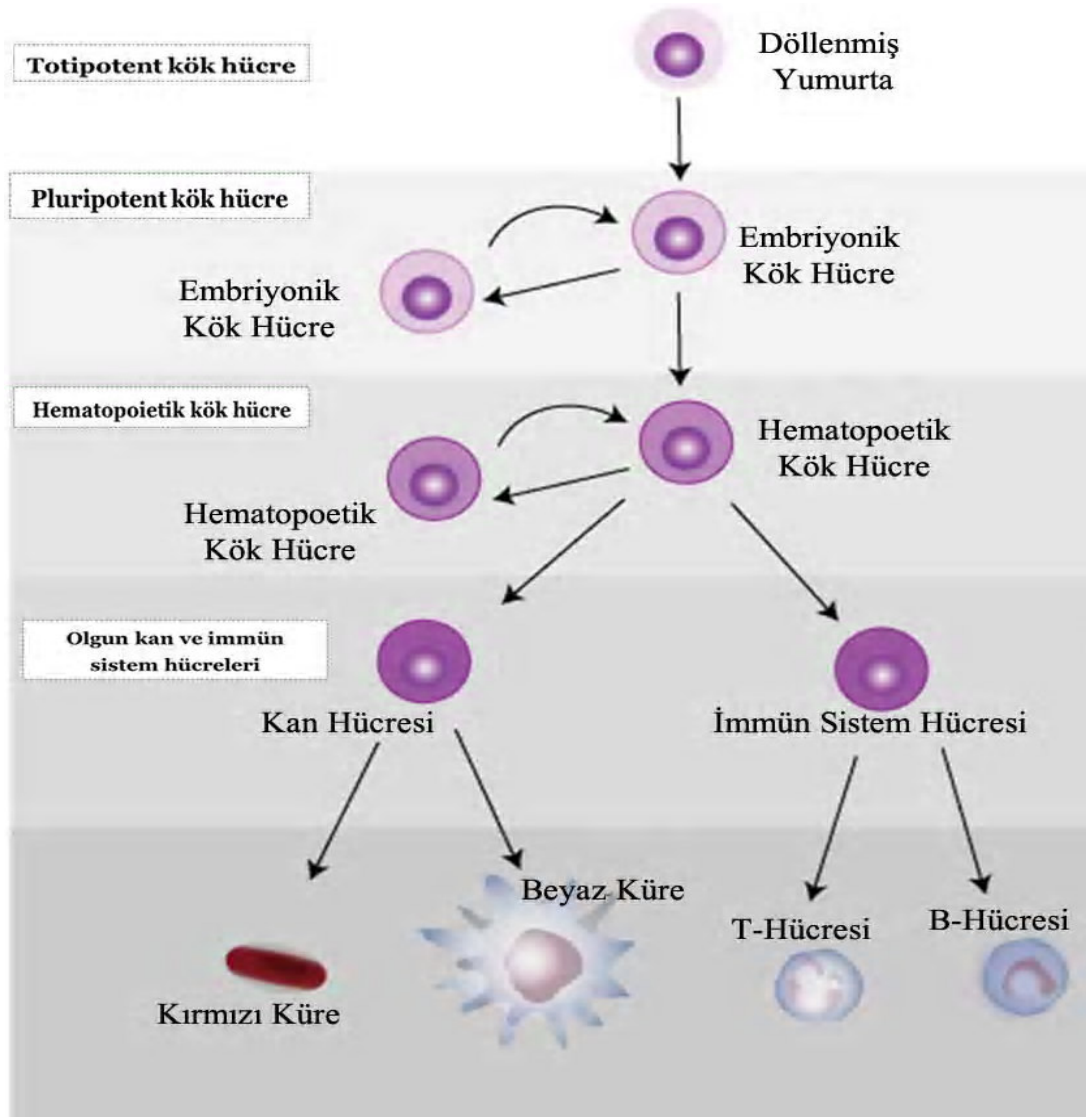
2.2. FARKLIlaşMA YETENEKLERİNE GÖRE KÖK HÜCRELER:

Farklılaşma yeteneklerine göre sınıflandırılan kök hücrelerin bu özelliklerini temel alan hiyerarşik bir yapıları vardır. Buna göre; totipotent kök hücreler zigot ve blastomerdan elde edilebilir ve tüm hücre tiplerine farklılaşabilir. Pluripotent kök hücreler, embriyonik zar haricinde tüm hücre tiplerini oluşturabilen, embriyonik gelişimin temeli olan endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarını oluşturan hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler blastosist aşamasındaki iç hücre kitlesinden elde edilebilirler. Multipotent kök hücreler ise, kaynaklandıkları dokuya ait hücreye farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Mezenkimal kök hücreler ve hematopoetik kök hücreler örnek gösterilebilir. Bunların yanı sıra, birkaç hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelere oligopotent, sadece tek bir hücre tipine farklılaşabilen hücrelere ise unipotent kök hücre adı verilir (1).

2.2.1. Totipotent kök hücreler:

Vücudun her hücre tipini oluşturabilen, tam olarak fonksiyonel bir organizmanın gelişimini sağlayabilen hücrelerdir (14). Tam bir bireyi oluşturabilecek kapasiteye sahip olan bu hücreler, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu hücreler embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanmaktadır (15). Sperm ve ovumun fertilizasyonu takiben oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve potansiyele sahiptir. Bu hücrelere her şeyi yapabilen

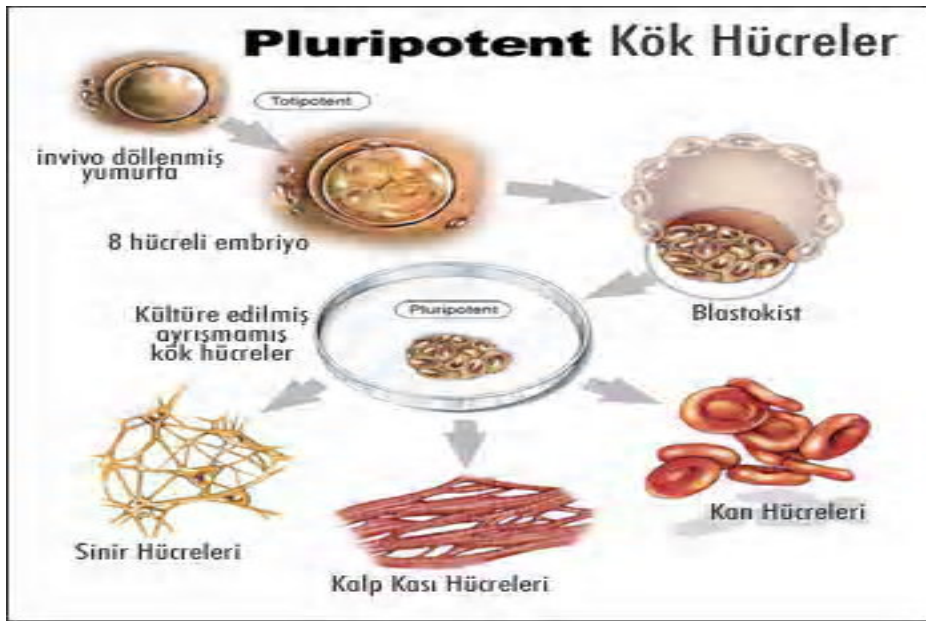
anlamına gelen totipotent hücre denir. Her yönde farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme yetkinliğinde olan kök hücrelerdir (14). Fertilizasyondan sonraki ilk 4 gün içinde herhangi bir nedenle bu hücreler birbirinden ayrılırsa, ayrılan her hücre kendi başına büyüyerek ayrı bir insan meydana getirir. Genetik şifreleri aynı olan bu kişilere tek yumurta ikizi denmektedir. Bir totipotent kök hücre, yaklaşık 200 özelleşmiş somatik hücre tipini içeren kompleks bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptir (16, 17) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Totipotent kök hücreler (17).

2.2.2. Pluripotent kök hücreler:

Pluripotent kök hücreler (blastosist safhasındaki embriyolarda), vücudun herhangi bir hücre tipini oluşturabilme potansiyeline sahip olan hücrelerdir (18). Pluripotent kök hücreler, totipotent hücrelerin soyundan gelirler ve üç germ tabakasından meydana gelen (ektoderm, mezoderm ve endoderm) neredeyse tüm hücelere farklılaşabilirler (19). Pluripotent kök hücreler; özgül bir hücre tipi için verilen yeterli ve gereken uyarı verildiğinde, 200'den fazla insan hücresinin tümünü oluşturabilir (20) (Şekil 2.3).

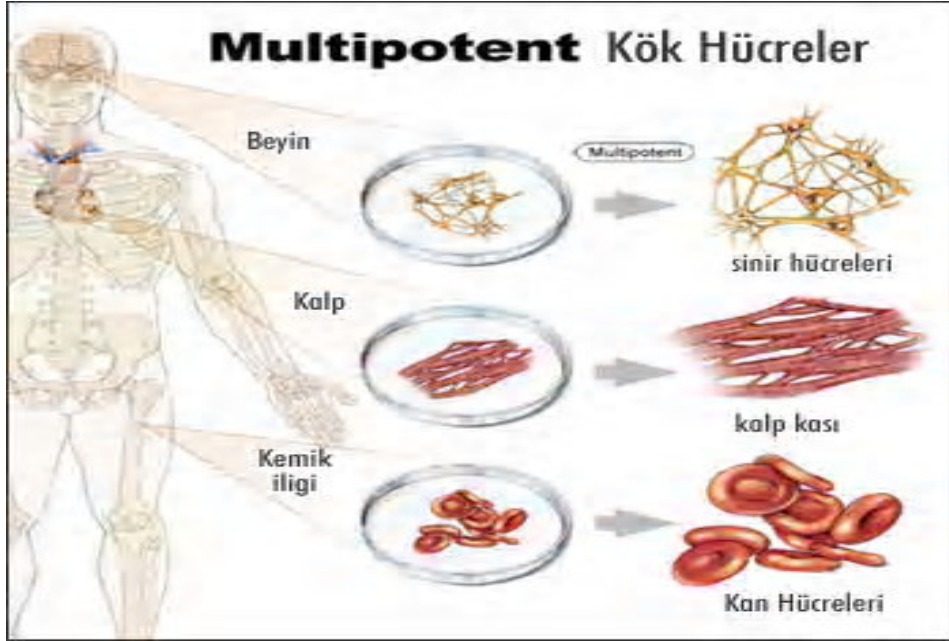


Şekil 2.3. Pluripotent kök hücreler (20).

2.2.3. Multipotent kök hücreler:

Multipotent kök hücreler, pluripotent hücrelerden daha sınırlı sayıda hücre tipine dönüşebilen ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış hücrelerdir (16). Yetişkin organizmada multipotent kök hücre olarak adlandırılan ve bazı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerin de bulunduğu bilinmektedir (18). Yetişkin dokulardaki farklılaşmış hücrelerin bölünme kapasitelerinin sürekli olmadığı ve farklılaşan hücrelerin vücutta tekrar farklılaşabilme kapasitelerinin olmadıkları bilinmektedir. Dolayısıyla doku rejenerasyonundan sorumlu bu hücreler, canlının yaşamı boyunca yetişkin dokularında bulunan proliferatif farklılaşma kapasitesindeki kök hücrelerdir (21). Multipotent kök hücreler, kaynaklandıkları dokuya

ait hücreye farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Kemik, kas, kıkırdak, yağ ile diğer bağ ve destek dokularını oluşturabilme kapasitesine sahip olan MKH'ler, spesifik bir multipotent kök hücre tipidir (14,22) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Multipotent kök hücreler (22).

2.2.4. Oligopotent kök hücreler:

Birkaç hücre tipine farklılaşabilen kök hücreler, oligopotent kök hücrelerdir. Hematopoetik kök hücreler bu tiptendir. Oligopotent kök hücreler lenfoid ya da miyeloid kök hücreler gibi sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilirler (15).

2.2.5. Unipotent kök hücreler:

Unipotent kök hücreler, yetişkin dokularda sadece tek bir hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler. Ancak kendisini yenileyebilir, başka bir hücreye dönüşmezler. Fakat onları kök hücre olmayan hücrelerden (örn. kas kök hücreleri) ayırt eden şey, kendini yenileme yeteneğine sahip olmalarıdır.

Kök hücreler, elde edildikleri kaynaklara göre ikiye ayrılırlar; embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler. Yetişkin kök hücreler hematopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler ve organlarda bulunan kök hücrelerdir (23, 24).

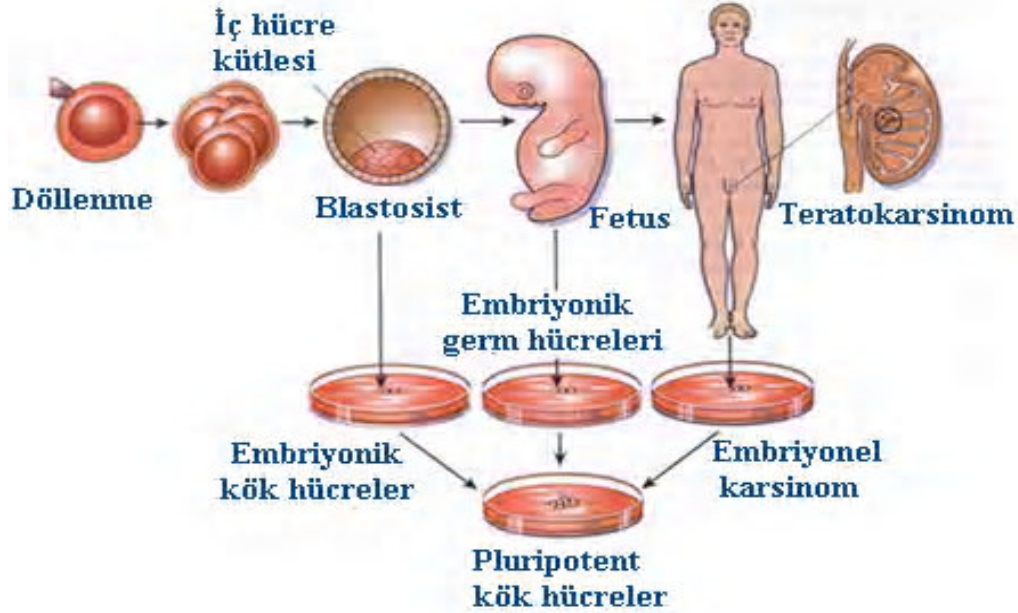
2.3. ELDE EDİLDİKLERİ KAYNAĞA GÖRE KÖK HÜCRELER:

2.3.1. Embriyonik Kök Hücreler

Sperm ile ovumun birleşmesi ile ortaya çıkan zigot, tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip bu hücreye embriyonik kök hücre (EKH) denir ve bu özelliği totipotent olarak tanımlanır. Döllenmeyi takip eden ilk 4-5 gün içerisinde bu hücreler, aynı güce sahip olup her biri tek başına bir organizma meydana getirebilme yeteneğindedirler. Yaklaşık beşinci gündeki “blastosist”in içindeki hücreler de embriyonik kök hücrelerdir ve vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler; ancak bu hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar. Blastosistin iç hücre kütlelerinden (İHK)’nden oluşan embriyonik kök hücreler, *in vitro* olarak sonsuz şekilde üreme potansiyeline sahip, normal ve dengeli bir karyotipte olan pluripotent hücrelerdir. Bu hücreler *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda üç germ tabakasından köken alan farklı hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler (25). Manüplasyona uğramamış blastosist safhasındaki embriyoda, İHK’ndeki kök hücreler gastrulasyon sırasında, vakit kaybetmeden üç embriyonik germ tabakasını meydana getirmeye yönelmektedirler (26). EKH’ler ve embriyonik germ hücreleri sadece *in vivo* olarak gelişim göstermeyip, ayrıca *in vitro* ortamda da endodermal (pankreatik hücreler), ektodermal (deri, nöronlar) ve mezodermal (kan, kalp hücreleri, kıkırdak, endotelial hücreler, düz kas hücreleri) hücre tiplerine farklılaşabilmektedir (27). Kök hücreler, genlerin kontrolü altında aldıkları sinyale göre birçok dokuya kaynaklık edebilmelerine rağmen, özelleşmiş bir hücrenin işlevini yerine getiremezler. Laboratuvar ortamında kök hücreler uzun zaman süreçlerinde çoğalabilirler. Okarma ve ark. tarafından, embriyonik kök hücre serilerinin 300-400 döngü boyunca çoğalabildikleri gösterilmiştir (28).

İHK hücreleri, normal embriyonik çevreden uzaklaştırılıp uygun şartlar altında kültüre edildiklerinde, sonsuz sayıda çoğalabilen hücrelere dönüşebilmektedir. Kültür içerisinde farklılaşmadan çoğalırken üç embriyonik germ tabakasını şekillendirebilecek farklılaşma potansiyelini de devam ettirmektedir. İHK hücreleri, pluripotent fare, primat ve insan EKH’lerin elde edildiği kaynak hücreler olarak değerlendirilmektedir (28). EKH’ler transgenik hayvanların üretiminde kullanılan başlıca kaynaklardandır. Yetişkin

dokulardaki kök hücreler tipik olarak sadece sınırlı sayıda hücre tipini şekillendirirken, EKH'ler hemen her hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler. (26, 29) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Embriyonik kök hücreler (29).

Uterusa yerleştirilmeye hazır 3-5 günlük embriyoların hücreleri sonsuz çoğalma ve tüm farklılaşmış (örneğin sinir, kas, deri, kalp vb) hücreleri geliştirme kapasiteleri nedeniyle alıcı bir bireye tedavi amacıyla aktarılabilirler. Eğer bir embriyonun transferinde gebelik oluşmazsa diğer bir embriyo uterusa transfer edilir. Gebeliğin oluşması durumunda ve aile başka çocuk istemiyorsa depolanmış olan embriyolar ailenin izni alınmak koşuluyla deneysel çalışmalarda kullanılabilir. Bu işlemler sırasında ülkelerde geçerli olan yasal ve etik düzenlemelere uyulması gereklidir.

Fetal kök hücreler

Potansiyel kök hücre kaynaklarından biri de erken fetal dokudur. Embriyo döllenmenin ardından 8 haftayı tamamladıktan sonra "fetüs" adını alır. Fetal kök hücreleri, fetüse ait organların içinde bulunan ilkel hücre türleridir. 1998 yılında yapılan çalışmaları sonucunda, 5-9 haftalık fetüslerin gonadal kıvrım ve mezenter bölgesindeki primordiyal germ hücrelerinin kültürü ile embriyonik germ hücreleri elde edilmiştir (30). Düşük

yapan kadınlardan elde edilen fetüs veya çeşitli sakatlıklar nedeniyle gebeliğe son verilip alınan fetüsler bu tür kök hücreleri için kaynak oluşturmaktadırlar. Fetal kök hücre sınıflandırma belirsizliğini korumaktadır ve bu tür kök hücreler çoğu kez bir yetişkin kök hücre içinde gruplandırılır.

Amnion sıvısı kök hücreleri

Amnion sıvısı, amnion kesesi içinde bulunur ve fetüs bu sıvı içinde yüzer durumdadır. Ancak, daha net bir ayırım yapmanın gerekli olduğu görülmektedir. Multipotent kök hücreler amniyon sıvısında da bulunur. Bu kök hücreler oldukça etkindirler ve besleyici olmaksızın oldukça genişleyebilirler ve ayrıca tümorojenik değildirler. Amniyotik kök hücreler multipotenttirler ve adipojenik, osteojenik, miyojenik, endoteliyal, hepatik ve ayrıca nöronal hatlardaki hücrelere farklılaşabilirler (31). 2007 yılında yapılan bu çalışmalarla, amnion sıvısında kök hücrelerin bulunduğu göstermiştir.

2.3.2. Yetişkin Tip Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler (YKH) dokularda az sayıda bulunan, spesifik bölgelerde lokalize olan ve bireyin ömrü boyunca hayati önemde olan doku bütünlüğünün devamlılığını sağlayan hücrelerdir (32). Organizmanın o anki yaşı ne olursa olsun dokularında bulunan kök hücreler, yetişkin kök hücreler olarak değerlendirilmektedir (15). Multipotent bir kök hücre olan YKH'ler, embriyonik germ hücreleriyle karşılaştırıldığında daha düşük pluripotensiye sahiptirler (15). Bununla birlikte, YKH'ler de sahip oldukları asimetric hücre bölünme potansiyeliyle hemen hemen sınırsız bir şekilde kendilerini yenileme kabiliyetine sahiptirler. Diferensiyasyon durumundaki hücrelerle ortak bazı yüzey işaretlerine sahip olmalarından dolayı identifiye edilmeleri güç olmakla birlikte, klonojenik aktivite gibi fonksiyonel özelliklerine göre tespit edilebilmektedirler (32). Geçmişte pek çok dokunun, endojen bir kök hücreye sahip olmamasından dolayı zarar gördüğünde kendini rejenere etme yeteneğinin olmadığı düşünülmekteydi. Yapılan çalışmalarla pek çok yetişkin dokunun da rejeneratif onarım kapasitesine sahip olduğunun ortaya konulmasıyla, yetişkinlerdeki bazı dokuların da (deri, hematopoietik sistem, kemik ve karaciğer) yenilenme ve onarım yeteneklerinin kök veya progenitor hücrelerin varlığına işaret ettiği belirlenmiştir (33). Yetişkin kök hücreler, tüm doku tiplerinden izole edilmezler. Küçük miktarlarda bulunurlar.

İzolasyonu ve saflaştırmalarında zorluklar vardır ve sayıları ile kaliteleri yaş ile azalma gösterir. Hücre tipleri dar bir aralık içinde farklılaşma gösterir. Kök hücreler, normal şartlar altında birbiri ardı sıra gerçekleşen bölünme ve farklılaşma safhalarından sonra ilgili dokunun hücrelerini oluşturan progenitör hücrelere dönüşürler. Yetişkin kök hücreler retina, akciğer, kalp kası, iskelet, kas, bağırsaklar, böbrek, dalak, kemik iliği, kan ve deri gibi dokuların oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler (34).

Yetişkin kök hücreler üzerindeki en kapsamlı çalışmalar, immun sistem ve kan yapımını sağlayan hematopoietik kök hücreler üzerinde gerçekleştirilmiştir (35). Hematopoietik progenitör hücre kaynağı olarak kemik iliği, periferik kan ve göbek kordonu kanı hayati öneme sahiptir (38). Kemik iliği, hematopoietik kök ve mezenkimal kök hücrelerine diferensiyasyon olma potansiyeline sahip olan stromal hücrelerin yapımını da üstlenmektedir (35). Mezenkimal kök hücreler veya kemik iliği stromal hücreleri olarak bilinen fibroblast koloni formları ilk olarak 1974 yılında tanımlanmıştır. Bunu takiben 1999 yılında bu hücreler çoğalma faktörleri kullanılarak *in vitro* kültürlerde saflaştırılıp üretilerek osteoblast, kondrosit ve adipositler elde edilmiştir (33). Yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin kemik, kas ve diğer dokuların onarımı için mutlaka gerekli olduğu tespit edilmiştir (15). Kemik iliği kaynaklı kök hücreler iskelet ve kalp kası, karaciğer, deri, bağırsak, akciğer, pankreas, böbrek ve merkezi sinir sistemine ait dokulara diferensiyasyon olabilmektedirler (34). Bununla birlikte, beyin gibi düşük rejeneratif potansiyele sahip dokularda da nöronal kök hücreler bulunmakta ve aktive olabilmektedirler (16). Kemik iliğindeki hematopoietik kök hücreler nöronal, myojenik ve hepatik hücre tiplerine diferensiyasyon olabildikleri gibi sinir ve kas kök hücreleri de hematopoietik kök hücrelere dönüşebilmektedir. Dolayısıyla da yetişkin kök hücrelerin yüksek bir plastisiteye sahip oldukları, gelişim ve diferensiyasyon potansiyellerinin de sınırlı olmadığı ileri sürülmektedir (16). Olgun hematopoietik progenitör hücrelerin 1974 yılında göbek kordonu kanında bulunduğunun ortaya konulmasından sonra yapılan çalışmalarda, bu kanın hematopoietik kök hücre bakımından oldukça zengin olduğu ve kemik iliği ile büyük benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (37). YKH'ler, yüksek farklılaşma potansiyeline sahip olmakla birlikte embriyonik ve fetal kök hücrelerinininki kadar yüksek çoğalma potansiyeline sahip değildirler. Üstelik çevresel faktörlere bağlı olarak oluşan DNA anomalileri ve genetik defektlere sahip olduklarından

transplantasyon için uygun olmayabilmektedirler (16). Embriyonik ve yetişkin kök hücreler dışında fetal dokulardan da kök hücreler elde edilebilmektedir (38). Mezenkimal kök hücreler, fetal kan hücrelerinden de elde edilmektedir. Bu hücreler, kültürde 20–40 pasaj sonunda kemik, kıkırdak, oligodentrositler ve hematopoetik hücrelere farklılaşabilmektedirler. Bununla birlikte, bu hücreler sadece gebeliğin ilk üç aylık periyodunda bulunmalarının yanı sıra fetal karaciğer epitel hücreleriyle ve kemik iliğindeki hematopoetik popülasyonlara da benzerlik göstermektedirler (33). Günümüze kadar olan yetişkin kök hücre araştırmalarının büyük kısmı, hücrelerin bölünme veya süresiz olarak kendini yenileme ve farklılaşma eğilimlerinin sınırlarını belirlemek üzerine olmuştur (39).

2.3.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPSCs)

İndüklenmiş pluripotent kök hücre olarak adlandırılan, somatik hücrelerin çeşitli faktörlerle tetiklenerek embriyonik benzeri kök hücrelere dönüştürülme sürecinde kullanılan bu faktörler (Oct4, Sox2, Myc ve Klf4) Yamanaka faktörleri olarak bilinir (40). İnsan somatik hücrelerine bu 4 faktör transfekte edildiğinde, hücrelerin embriyonik kök hücrelere benzer morfoloji, pluripotensi ve kapasite gösterdikleri tespit edilmiştir. Kyoto Üniversitesi'ndeki Shinya Yamanaka ve arkadaşları transkripsiyon faktörleri Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4'ü kullanarak insan yüzünden aldıkları hücrelerde deneylerini gerçekleştirmişlerdir (41). Wisconsin–Madison Üniversitesinden Junying Yu, James Thomson ve arkadaşları farklı bir grup farklı transkripsiyon faktörü kullanarak insan sünnet derisinden aldıkları hücrelerle çalışmalarını yapmışlar, bu 4 faktörün Oct4, Sox2, Nanog ve Lin28 şeklinde olabileceği belirlenmiştir (42). Bu kök hücreler için gerekli temel transkripsiyon faktörleri aracılığıyla farklılaşmanın geri çevrilebilmesi mümkün olmuştur. Sox2 ve Oct4'ün hücre içi miktarları da çok önemli olmakla birlikte, az miktarlardaki değişiklikler bile hücre açısından büyük problemlere yol açabilmektedir. Bu alanda başka araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, ilaç geliştirme ve hastalıkların modellenmesi için yararlı olabilmekte ve bunların transplantasyon tedavilerinde kullanması beklentileri artmaktadır. Yeniden programlama faktörlerini yetişkin hücrelere tanıtmak için hali hazırda virüsler kullanılmaktadır. Bu tekniğin insanlar için kullanışlı bir tedavi olabilmesi için bu sürecin dikkatle kontrol edilmesi gerekmektedir (43).

2.4. KÖK HÜCRE ARAŞTIRMALARININ TARİHSEL GELİŞİMİ

Rus asıllı morphologist Alexander A. Maximow 1924 yılında kan hücrelerinin, hematopoezi hücrel bir hiyerarşi sonucu ortak öncül (prokürsor) hücreden yani “Hematopoetik Kök Hücre”den oluştuğunu iddia etmiştir (44). 1960’lı yıllarda bilim adamları Ernest A. McCulloch ve James E. Till ilk kemik iliği hücrelerinin klonal doğasını ortaya koymuştur (45, 46). Kök hücre araştırmaları 1960’larda hemapoetik kök hücrelerin keşfi ile farklı bir boyut kazanmıştır. Daha sonra bu alanda yapılan çalışmalar, elde edilen olumlu sonuçlar neticesinde günümüze kadar gelişerek devam etmiştir (47). 1958 yılında Dr. Min Chueh Chang IVF uygulamasını tavşanlarda demonstre etti. 1959 yılında *İn vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemi ile ilk hayvan (tavşan) üretildi. John B. Gurdon, 1962 yılında kurbağalarda yaptığı bir çalışmada “özelleşmiş bir dokuya ait hücreden aldığı çekirdeği, çekirdeği önceden çıkarılmış bir hücreye yerleştirip yetişkin ve sağlıklı kurbağalar elde ederek hücre özelleşmesinin tersinir (reversible) olabileceğini” gösterdi. 1963 Ernest McCulloch ve James Till; Fare kemik iliği hücrelerinin kendi kendilerini yenileme kapasitelerinin olduğunu kantitatif olarak tanımladılar. Edwards ve Bavister ilk insan ovumunu 1968 yılında *in vitro* olarak fertilize ettiler. Friedenstein ve arkadaşları, 1970’li yıllarda kemik iliği hücrelerinin klonojenik potansiyeli ex-vivo çalışmalarla inceleyerek multipotent özellikleri olduğunu bildirmiştir (48, 49). İlk IVF insan bebeği 1978 yılında İngiltere’de doğdu. 1981 yılında Martin Evans ve Kaufman, fare blastositlerin iç hücre kitlelerinden EKH’leri elde ettiler. *İn vitro* ortamda pluripotent fare EKH’lerini çoğaltmak için, gerekli kültür şartlarını tanımladılar E. Donnall Thomas HKH’leri ilk defa lösemili bir hastada 1990 yılında başarı ile uygulamıştır. 1994 yılında IVF yöntemiyle oluşturulan insan blastositlerinin kültürasyonu yapılmıştır. Rhesus maymunlarından ve maromasetlerden primat EKH’leri ilk defa 1996 yılında elde edildi ve bu hücreler, *in vitro* ortamda yetiştirildi (50).

1997 yılında Dolly adı verilen, somatik hücrelerden elde edilen dünyanın ilk memeli hayvanının (koyun) klonlandığı duyurulmuştur. Klon koyun aslında 1996’da doğmuştu. Embriyolojist Ian Wilmut ve arkadaşları, İskoçya’da Roslin Enstitüsü’nde, yetişkin bir koyunun memelerinden aldıkları hücrelerle Dolly’i kopyalamışlardır. Thomson ve arkadaşları 1998 yılında ilk insan embriyonik kök hücrelerini elde ettiler. İnsan

embriyonik kök hücrelerinin pluripotent olduğu 2000 yılında anlaşıldı (51). 2001 yılında Amerika Birleşik Devletleri Başkanı George W. Bush, kök hücre çalışmalarına kısıtlı bir bütçe ayrılmasına ve sadece o güne kadar tüp bebek yöntemlerinden artan embriyolarla çalışma yapılmasına izin verdi. Science Dergisi, 2003 yılında, yılın en önemli 10 tıp olayı arasında “Kök Hücreler” ile ilgili gelişmeleri göstermiştir. 2004 yılında Güney Koreli bilim adamları, 30 insan embriyosunu klonlamış ve blastosist aşamasına kadar getirmiş, ancak bu embriyolardan sadece bir tanesinden kök hücre elde edebilmişlerdir. Günümüzde embriyonik kök hücrelerin kullanılarak yapıldığı onaylanmış herhangi bir tedavi bulunmamaktadır. Shinya Yamanaka, 2006 yılında “farenin olgunlaşmış (farklılaşmış) hücrelerini gen aktarımı yöntemleriyle sadece 4 gen ekleyerek farklılaşmamış kök hücrelere çevirmeyi” başardı. 2009 yılında ilk insan denemesi ABD Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından uygulamaya kondu (52). Ancak bu insan deneyi, Atlanta'da 13 Ekim 2010 tarihindeki omurilik hasarlı kurbanlara kadar kabul edilmemiştir. 14 Kasım 2011'de deneyi uygulayan şirket, kök hücre tedavi uygulamalarına devam etmeyeceğini açıkladı (53). Kök Hücre araştırmacısı John B. Gurdon ve Shinya Yamanaka'ya 2012 yılında, farklılaşmış hücrelerin ‘pluripotent’ olmak üzere yeniden programlanabileceğini keşfettikleri için Fizyoloji ve Tıp dalında Nobel ödülü verildi. Bu iki çalışma, 1900'lü yılların ilk yarısında genel kanı olan hücre farklılaşmasının tek yönlü ve geri dönüşü olmayan bir süreç olduğu görüşünü ortadan kaldıran temel çalışmalar olarak gösteriliyor.

Türkiye’de kök hücre araştırmaları, insan ömrünü uzatmanın yolunun doğum sonrası atılan plasentalarda ve kordon kanı hücrelerinde olduğunu söyleyen araştırmacı Ord. Prof. Dr. Vet. Hek. Tuğ. Gen. Süreyya Tahsin Aygün’ün 1950 ve 1960 yılları arasında yaptığı araştırmalar ile başlamıştır. Prof Dr. Aygün, kök hücre tedavisi üzerine dünyada belki de ilk çalışmaları yapan kişidir. Aygün, hayvanlarda fetal ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisi konusunda çalışmalar yapmıştır. 1960’lı yıllarda bunları kitap ve makaleler halinde uluslararası dergilerde yayımlamış, yurtdışında uluslararası kurultaylarda bildiri olarak sunmuş ve kitap Almanca olarak kitap haline getirerek Almanya’da yayımlamıştır (54, 55).

1967 yılında, ilk olarak tanımladığı embriyonal karsinoma hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması, kök hücre çalışmalarında ileri doğru atılmış önemli bir adım olmuştur. Bu

hücrelerin farklılaşması; embrioid cisimcikler olarak adlandırılan embriyo benzeri oluşumların meydana gelmesi ile oluşan hücre kümelenmesi ile sonuçlanır. Söz konusu embrioid cisimcikler ilk olarak, embriyonal karsinomlu farelerin asit sıvılarında gözlenmiştir. Bu hücreler bilim adamları için de önemli birer model oluşturmuştur (54, 55).

2.5. KÖK HÜCRE PLASTİSİTESİ

Dokuya özgü kök hücrelerinin, kaynak dokudan daha farklı bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine “yetişkin kök hücre plastisitesi” denmektedir. Trans-differansiasyon (trans-farklılaşma) terimi ise, kök hücrelerin plastisite potansiyeli anlamında sıklıkla kullanılmaktadır (56). Kök hücre biyolojisindeki en tartışmalı konulardan biri kök hücre plastisitesiyle ilişkilidir. Önceleri, kök hücrelerinin yalnızca içinde bulundukları dokuların hücrelerini verdiklerine inanılırdı. Örneğin, kemik iliğinde ve kanda bulunan hematopoietik kök hücrelerinin yalnızca kan yapımından sorumlu olmaları gibi. Ancak, kısa bir süre önce, uygun uyaranlar ile karşılaşmaları sonucunda bu hücrelerin kas hücrelerine, nöronlara, hepatositlere, kıkırdak, yağ hücresi ve endotel hücrelerine dönüşebilme yeteneğinde oldukları gösterilmiştir. Bu farklılaşmalar özgün biyolojik, immünolojik, biyokimyasal, elektrofizyolojik ve moleküler çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu yeni tanımlanan hücrenin biyolojik farklılaşma süreci “Kök Hücre Plastisitesi” olarak tanımlanmaktadır (16). Böylece, “Kök hücre plastisitesi” kavramı, kök hücrelerinde bilinen farklılaşma yeteneklerine trans-farklılaşma gibi bir yeni bir görev daha eklemektedir. Dokulardaki kök hücrelerinin başka organlarda bulunan farklılaşmış hücelere dönüşebilme yetenekleri ya farklı bölgelerdeki kök hücrelerin aynı-ortak özelliklere sahip multipotent hücreler olduğunu ve ileriki dönemlerde kullanım için yedekte (reserv) tutuldukları veya bu hücrelerin gereksinim halinde farklı görev yapabilecek *in vivo* programlanma kabiliyetine sahip olmaları ile izah edilmektedir.

2.5.1. YKH Plastisitesini Açıklayan Mekanizmalar

- a. Doku ve/veya organlarda multipotent kök hücreler vardır.
- b. Doku ve/veya organlarda pluripotent kök hücreler vardır.

c. Trans-farklılaşma.

d. De-differensiasyon (geri yönde farklılaşma) ve re-differensiasyon (ileri yönde farklılaşma).

e. Füzyon (kaynaşma).

Doku ve/veya organlarda multipotent ve pluripotent kök hücreler vardır. Olgun bir dokudaki hücrelerin çoğu, kendi bulundukları çevreye uyum sağlamış, belirli fenotipik özellikleri olan farklılaşmış hücrelerdir. Dolayısıyla, bir organın yenilenme kapasitesi yaşla birlikte ve etkin bir şekilde bölünebilen kök ve öncül hücrelerin sayısı ile orantılı olarak azalır. Bu sınırlamalarla birlikte vücut, dokuların yerine konulması ve yenilenmesi için iki büyük strateji geliştirmiştir (57). Birinci yolda, farklılaşmış ve işlev gören hücrelerdeki çoğalma kapasitesi söz konusudur. Hasar sonrası, o bölgede hücre kaybının sınırlı bir şekilde yerine konmasını yönlendirmeye yetecek düzeyde mitojenlerin salındığı ve böylece hücre bölünmesinin uyarıldığı karaciğer, iskelet kası ve damar endotel hücreleri bu gruba girmektedir. İkinci yolda ise, bölünebilen kalıntı kök hücrelerden gelen yeni nesil hücreler farklılaşmış hücrelerin yerini alır. Bu kategoriye hizmet eden prototip hücre grubu kan hücreleridir. Hematopoetik kuşağın bütün hücreleri, kendisini yenileyebilen, sınırlı sayıdaki çoğalma potansiyeline sahip hücrelerden türerler ve bu hücreler, olgun kan hücrelerine farklılaşmayı kontrol eden uygun stokinlerin ve büyüme unsurlarının etkisi altındadır.

YKH plastisitesini açıklamak için girişilen çabaların sonucunda bazı bilim insanlarının gündeme getirdikleri görüş, yetişkinlerdeki çoğu dokularda (beyin, kemik iliği, periferik kan, kan damarları, iskelet kasları, deri, karaciğer, akciğer, göz, pankreas, kulak, burun ve sindirim kanalı mukozası gibi) sessiz biçimde bölünmeden bekleyen kök hücreler olduğu yönündedir. Ancak bazı araştırmacılar, bu kalıntı kök hücrelerin multipotent özellikte olduklarını savunurken son zamanlarda bu hücrelerin embriyonik dönemin kalıntı hücreleri olduğu, dolayısıyla pluripotent özellikte oldukları yönünde kanıtlar sunmuşlardır.

Kök hücre plastisitesini göstermek için gerçekleştirilen ve yukarıda açıklanan birçok araştırma sonucu, genellikle kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı kök hücrelerini

içermekteyse de organizmamızdaki hemen tüm doku ve organlarda kaynaklandıkları doku ve organlardan, farklı doku ve organların hücrelerine farklılaşma yeteneği gösteren birçok *in vitro* ve *in vivo* kanıt sunulmuştur. İlginç olan, son zamanlarda bazı araştırmacılar, çeşitli organlarda tanımladıkları bu karakterdeki hücrelerin embriyonik kök hücrelere benzer şekilde pluripotent potansiyele sahip olduklarına ilişkin raporlar yayınlamasıdır (58).

2.5.2. Kök Hücre Plastisitesi İçin Kanıtlar ve *in vitro* Farklılaştırma Yöntemleri

2.5.2.1. Kültür Koşullarının Modifikasyonlarına Yönelik Girişimler

Çeşitli doku ve organlarımızda yerleşik ve esas olarak rejenerasyon olarak isimlendirilen doku ve organ yenilenmesinden sorumlu olan, farklılaşmamış hücrelerin varlığı uzun zamandır bilinmektedir. Bunlardan derinin bazal tabakasında yerleşik olanları, genç bireylerde yaklaşık 18 günde derinin yenilenmesinden sorumludur. Benzer olarak, sindirim kanalında yerleşik olanlar, tüm mukozayı yenilemekte ve saatte yaklaşık 250 milyar yeni hücre üretmektedir. Yaklaşık olarak 2/3'ünü çıkarttığımızda birkaç hafta içinde yenilenen karaciğer, dakikada 350 milyon kırmızı kan hücresi üreten kemik iliği ve herhangi bir hasar durumunda iskelet kası liflerimizin tamirinde rol oynayan satellit (uydu) hücreleri de benzer özelliklere sahiptir. Son yıllarda, kök hücre olarak isimlendirilen ve bulundukları doku veya organların yenilenmesinden sorumlu olduğu bilinen bu hücrelerin umulmadık şekilde farklı doku veya organların hücrelerine dönüşebilme yetenekleri (kök hücre plastisitesi) öncelikle *in vitro* koşullarda gösterilmiştir. Kolay elde edilebilir bir kaynak oldukları için kemik iliği kök hücrelerinin (KİKH) *in vitro* koşullarda farklı sinyal moleküllerine yanıt olarak farklılaşma potansiyelleri iyi bilinmektedir. 1966'lı yıllardan beri bildiğimiz KİKH havuzunun özgün iki alt hücre tipinden biri olan mezenkimal kök hücreler, ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonileri geliştirmiştir. Sonraki yıllarda gerçekleştirilen birçok çalışma ile farklı kaynaklardan elde edilen yetişkin kök hücrelerin, farklı kültür koşullarında multipotent pluripotent farklılaşma potansiyelleri immunofenotipik ve immunogenetik çalışmalarla gösterilmiştir (59).

Doku ve organları yenilenmesinden sorumlu olduğu bilinen kök hücrelerin farklı doku veya organların hücrelerine dönüşebilme yetenekleri (kök hücre plastisitesi) ilk olarak *in vitro* koşullarda gösterilmiştir. Kolay elde edilebilir bir kaynak oldukları için kemik iliği kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda farklı sinyal moleküllerine yanıt olarak farklılaşma potansiyelleri iyi bilinmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen YKH'lerin, farklı kültür koşullarında multipotent ve pluripotent farklılaşma potansiyelleri immunofenotipik ve immunogenetik çalışmalarla gösterilmiştir (56).

Kök hücrelerin istenilen hücre çeşidine farklılaşmasını uyaracak *in vitro* koşulların sağlanmasına yönelik girişimlerden biri, özellikle son zamanlarda “niş” olarak isimlendirilen hücrelerin farklılaşıp yaşamlarını devam ettirdikleri mikro çevre ya da yatak anlamına gelen ortamın farklılaşma mekanizmaları üzerine etkilerinin anlaşılmasıdır. Moleküler araştırmalarda arzu edilen hücre çeşidinin mikroçevresini taklit etmeye yönelik girişimler artmıştır. Bu amaçla, kök ya da öncül hücreler çeşitli kimyasal kültür koşullarında elde edilmek istenen hücre çeşidinin mikroçevresinin özgün hücreleri, doku parçacıkları ya da hücre dışı matriks elemanları ile ko-kültüre edilmektedir (56). Son zamanlarda bazı araştırmacılar, kültür koşullarının yanında bazı mekanik etkiler uygulayarak kök hücreden istedikleri hücreleri elde etmeyi denemektedirler. Bu alandaki iki tipik çalışma Güney Asya ülkelerinden gelmiştir. Bu çalışmalardan ilkinde sıçan kemik iliği stromal hücreleri sıvı akımının teşvik ettiği mekanik güçlere maruz bırakılmış ve yapılan incelemelerde bu hücrelerde düz kas hücresi-özgün hücre iskeleti proteinin ekspresyonunda belirgin bir artış saptanmıştır (60). Son olarak, Lee ve ark. insan MKH'lerini mekanik strese maruz bırakarak anterior cruciate ligament-benzeri hücreler elde etmişlerdir (61).

2.5.2.2. Genomu Değiştirmeye Yönelik Girişimler (Genetik Modifikasyonlar)

In vitro koşullarda genomu değiştirerek farklılaşmanın yönlendirilmesine ilişkin yöntemler de kullanılmıştır. Hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerin ektopik transfeksiyonu ve RNAi vasıtasıyla farklılaşmanın yönlendirilmesi vb çalışmalar örnek gösterilebilir (165). YKH'lerin farklılaşmadan kendini yenilemesinde (self renewal) ya da multipotent ve pluripotentliğin devamında rol oynayan bazı sinyal yollarının ortaya konulması neticesinde, bu yolların bazı

yöntemlerle (Cre/LoxP sistem kullanılarak) genomdan bazı genlerin çıkarılarak (knock-down) kök ya da öncül hücrelerden farklılaşmanın uyarılması veya yönlendirilmesine yönelik girişimler de bulunmaktadır (58).

Hücrenin akıbeti, özgün gen ekspresyon programlarını baskılamak ya da aktive etmek için moleküler anahtarlar olarak işlev gören transkripsiyon faktörleri tarafından tanımlanır. Bunun yanında, moleküler biyolojideki gelişmelere koştur olarak hücrelerinin farklılaşmasında önemli rol oynayan transkripsiyonel faktörlerin (pdx1 ve pax4 gibi) ektopik transfeksiyonuyla da kök ya da öncül hücreden arzu edilen hücre çeşidine farklılaşma yönlendirilebilmiştir. Bunun yanında, son zamanlarda embriyolojik gelişim sürecinde kök ya da öncül hücrelerden farklılaşma süreçlerinde rol oynayan bazı sinyal proteinlerinin kültür ortamına eklenmesiyle de benzer sonuçların elde edilmesine çalışılmıştır. Tümör Nekroz Faktör (TNF), kemik iliği stromal hücrelerin osteoklastogenezisini (59) ve Wnt 11 dolaşımdaki öncül hücrelerin kardiyomiyojenik hücrelere (60) farklılaşmasını uyarmak amacıyla kullanılmıştır.

2.6. HÜCRE FARKLI LAŞMASI

2.6.1. Hücre Farklılaşması Yolları

Kök hücrelerin yeteneklerinin korunması ve devam ettirilmesi sürecinde etkili olan sinyal ileti yolları ve birbirleri ile olan etkileşimleri moleküler biyolojinin temel araştırma konularındandır. Kök hücreler, hücre içi regülasyon mekanizmaları ve bulundukları mikroçevreden(niche) aldıkları sinyaller ile kendilerini yenileyebilir ya da farklılaşabilmektedirler. Kök hücrelerin kapasitelerinin sinyal ileti yolları, transkripsiyon faktörleri, hücre siklusu düzenleyicileri ve miRNA'lar üzerinden kontrol edildiği ve bunu sağlandığı bilinmektedir. Kök hücrelerin farklılaşmasında ve kendilerini yenilemesinde görevli olan "LIF-STAT, MAPK-ERK, P13 ve Wnt gibi sinyal yolları bu mekanizmalardan en önemlileridir. MAPK-ERK yolağının kök hücrelerde özellikle farklılaşmada görev aldığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (64). MAPK/ERK yolağının kök hücrelerin proliferasyonundaki etkinliği de bilinmektedir. Sıçanların kemik iliğinden izole edilmiş mezenkimal kök hücreler kültüre alınıp, düşük doz iyonize radyasyona maruz bırakıldıklarında, proliferasyonda belirgin şekilde artış tespit edilen hücrelerde MAPK/ERK yolağı ve bu yolaktaki moleküllerin

aktivasyonu tespit edilmiştir (65). Mezenkimal kök hücrelerin yağ doku hücrelerine farklılaşması amacıyla yapılan bir çalışmada p38 yolağı inhibe edildiğinde daha az farklılaşma görülürken ERK yolağının inhibisyonu belirgin bir şekilde yağ doku hücresi oluşumuna neden olmuştur. Böylece, ERK yolağının aktifleşmesi ile mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasının baskılandığı, bu yolağın özellikle mezenkimal kök hücrelerde spesifik karakterlerinin devam ettirilmesinde rol aldığı belirlenmiştir (66). Kök hücrelerin farklılaşmadan stabil kalmalarında da PI3K yolağının aktivasyonun önemli rolü vardır. Bu yolağın inaktivasyonu özellikle mezenkimal kök hücrelerin kemik, sinir, kardiyak gibi dokulara farklılaşmasına yol açmaktadır (67). Kök hücrelerin farklılaşma sürecinde bunların yanı sıra hücre içi mekanizmaları, miRNA'lar ve Oct4, Sox2, Nanog gibi transkripsiyon faktörleri aracılığı ile düzenlenmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri özellikle kök hücrelerin pluripotensi karakterlerinin sürdürülmesi için gereklidir. Ayrıca gen ifadelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan kromatin modifikasyonları ve epigenetik değişimler de kök hücrelerin yeteneklerinin ve karakterlerinin belirlenmesinde görevli temel mekanizmalardandır (68).

Lösemi inhibitör faktör (LIF), Wnt, PI3K gibi sinyal yolları ve Oct4, Sox2 gibi transkripsiyon faktörleri, embriyonik kök hücrelerde çeşitli genlerin anlatımını düzenleyerek hücrenin farklılaşmadan, pluripotent kök hücre biçiminde kalmasını sağlamaktadırlar. Bir transkripsiyon faktörü olan Nanog'ta bu yolların etkilediği ve hücrede embriyonik kök hücre stabilizasyonunda rol oynayan önemli bir moleküldür. Nanog'un anlatımının düzenlenmesinde sinyal ileti yollarının dışında, FoxD3, p53 ve Oct4 gibi transkripsiyon faktörleri de görev almaktadır. Fonksiyonel olarak ise Nanog, Sox2 ve Oct4 gibi diğer önemli pluripotent faktörleriyle birlikte görev yapmakta ve çeşitli genlerin regülasyonunu sağlamaktadır. Bu üç önemli regülatörün hem hücre içi miktarları hem de birbirleriyle olan fiziksel etkileşimleri, yine bu 3 faktörün aktivasyonunu düzenlemekte ve kök hücrelerin karakterlerini bozmadan pluripotensi özelliğinin korunmasını sağlamaktadır (69). Öte yandan, Nanog, LIF'in inaktif olduğu durumlarda bile EKH'lerin kendini yenilenmesinde rol oynamaktadır.

Günümüzde kök hücrelerin yeniden programlanarak embriyonik kök hücre gibi davranması için sinyal yolları bulunmuştur. Bu sinyal yolları, c-Myc gibi onkogenler de bulunduran bazı transkripsiyon faktörlerini kapsamaktadır. İlk çalışmalar,

fare hücrelerinin bu anti-farklılaşma sinyalleri kombinasyonlarıyla farklılaşmayı geri döndürebildiklerini ve yetişkin hücrelerin tekrar pluripotent hale getirilebileceklerini göstermektedir (70). Ancak, bu hücrelerin geri dönüştürmesinde yer alan süreçte onkogenlerin de bulunması, bu tarz çalışmaların tedavideki kullanımlarını engelleyecek gibi gözükmemektedir. Hücrel farklılaşması araştırmalarında, kombine edilmiş transkripsiyon faktörlerinin diğer somatik hücrelerin de kaderlerini etkileyebileceğini gösteren bulgular elde edilmiştir. Yakın zamanlarda bazı araştırmacıların yaptığı çalışmalar, nöral hatta özgül olan üç transkripsiyon faktörünün, fare fibroblastları doğrudan işlevsel nöronlara dönüştürebileceğini göstermektedir (71). Mezenkimal kök hücrelere uygulanan çeşitli kromatin modifiye edici ajanlar (histon deasetilaz inhibitörü, trichostatin A -TSA- ve demetilleyici ajan 2'deoxyctidine -5azadC-), adipoz hücrelere dönüşümü teşvik etmekte ve hücreleri epigenetik düzeyde etkileyerek farklılaşmayı sağlamaktadırlar (72).

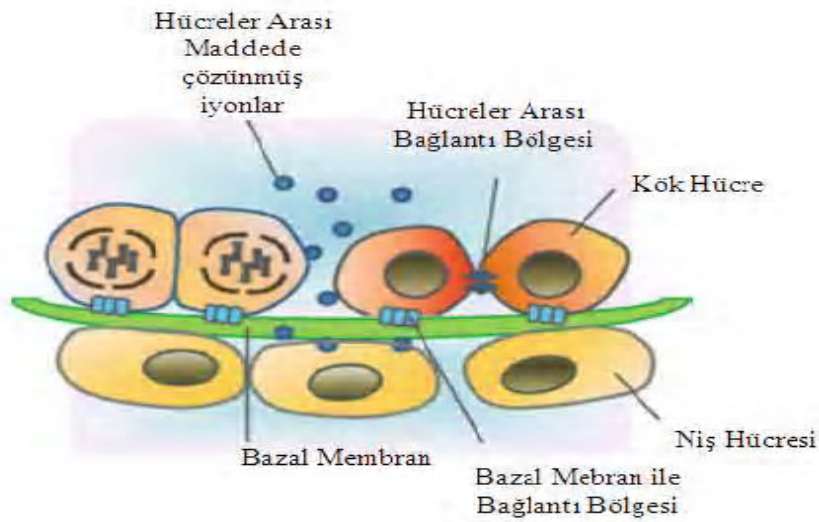
2.6.2. Pluripotenside Büyüme Faktörlerinin Etkisi

FGF4 ve FGFR2 barındırmayan embriyolar implantasyondan hemen sonra ölürlerken, İHK hücreleri de *in vivo* koşullarda bile çoğalamaz ve dejenere olurlar. Ancak, sadece FGF4 yok olan EKH çoğalabilir, bu da FGF4' ün en azından *in vitro* şartlarda hücre çoğalması için gerekli olmadığını gösterir. FGF4 ve ERK2 genleri kapatılmış olan İHK hücreleri nöral ve mezodermal hücrelere farklılaşmazlar. Bu hücreler Oct 4 ve Nanog düzeyleri yüksek kalır. Nöral kök hücrelerde (NKH) de yapılan çalışmalar fibroblast büyüme faktörlerinin MAPK/ERK aktivasyonu aracılığıyla NKH'lerin Schwann hücrelerine farklılaştıklarını göstermiştir (73). Spermatogonial kök hücreler, memelilerde sperm üretiminden sorumlu ve belirli hücre döngüleri olan eşey kök hücreleridir. ERK1 ve ERK2'nin Sertoli hücrelerinin kendini yenileme ve proliferasyon fazlarında periyodik olarak aktive olduğu, ayrıca ERK1/2'nin büyüme faktörü pozitif spermatogonial kök hücrelerin farklılaşmadan korunmalarında da görev aldığı belirlenmiştir (74).

2.6.3. Kök Hücre Mikroçevresi (Niche; Niş)

Kök hücrelerin bulundukları doku içerisinde, hücrelerin yaşamını sürdürebilmesini sağlayan diğer hücrelere farklılaşabilmesini destekleyecek bir yaşam alanı vardır. Kök

hücrelerin kendilerini yenileyebilmeleri ya da farklılaşma yönüne gidecek progenitör hücreleri üretmeleri kök hücre kimliğini yönlendiren sinyalleri üreten mikroçevreye ya da 1978 yılında Schofield'in terminolojiye kazandırdığı ifade şekliyle, 'kök hücre nişi'ne bağlıdır (75). Bu yaşam alanı, dokudaki oksijen ve büyüme faktörlerinin hücrelere ulaşmasını sağlayarak hücrelerin birbiri ile iletişimini destekler. Hücreler arası maddenin oluşturduğu bu üç boyutlu ortama hücre nişi denilmektedir (76, 77) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Kök hücrelerinin *in vivo* ortamdaki nişinin şeması (77).

Kök hücreler, yaşam boyunca doku homeostazında ve onarımında kritik bir role sahiptir. Bu hücrelerin kendini yenileme ya da farklılaşma yönündeki kaderi, kök hücre içsel belirleyicileri ve özgülleşmiş bir mikroçevrenin, yani kök hücre nişinin ürettiği sinyaller tarafından kararlaştırılır. Kök hücrelerin istenilen hücre çeşidine farklılaşmasını uyarak *in vitro* koşulların sağlanmasına yönelik girişimlerden biri de, özellikle son zamanlarda 'niche' olarak isimlendirilen, hücrelerin farklılaşıp yaşamlarını devam ettirdikleri mikroçevre ya da yatak anlamına gelen ortamın, farklılaşma mekanizmaları üzerine etkilerinin anlaşılmasıdır (78).

Niche kavramı ilk kez, kök hücreleri destekleyen sınırlı mikroçevre olarak Schofield tarafından 1978 de ortaya konmuştur (79). Kemik iliğinde, mezankimal kök hücrelerden oluşan kemik iliği stroma hücreleri niş'in fiziksel yapılarını oluştururlar. Kemik iliği stroma hücreleri salgıladıkları sitokinler ve hücre-hücre adezyonuyla

başlatılan hücrelerarası sinyallerle HKH'lerin kendilerini yenileme ve farklılaşmasını düzenlerler (80). Kök hücreler kendilerini destekleyen mikroçevre (niş) adı verilen fiziksel ortamla ilişki halinde olup mikroçevrenin ürettiği sinyaller sonucunda farklılaşabilir ya da kendilerini yenileyebilirler (81). Mikroçevreden alınan sinyaller sonucu aktifleşen LIF-STAT, MAP-ERK, PI3K, Wnt gibi sinyal ileti yolları bir dizi proteinin etkileşimiyle kök hücrelerin gelişim ve farklılaşma kaderlerini belirlerler (64). Oct4, Sox2 ve Nanog gibi önemli transkripsiyon faktörleri, kök hücrelerin karakterlerinin oluşumunda ve bu karakterlerin uzun süre korunmasında görevlilerdir. Kök hücrelerin kendi kendilerini yenileyebilme özellikleri ekstraselüler matriksten gelen sinyallerle olmaktadır. Örneğin insan embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmadan üreyebilmesi için bazal fibroblast büyüme faktörü (bFGF); fare embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmaması için de LIF kullanılmaktadır (82).

Kök hücrelerin bulundukları bölgelerdeki “niş” lerinden hasarlı dokuya doğru mobilizasyonu, migrasyonu gerekmektedir. Bunu sağlayan uyarının da, hasarlı dokunun değişen mikroçevresinden geldiği gösterilmiştir. Hasarlı bölgede salınan solubl faktörlerden stromal derived factor-1 (SDF-1) ve kompleman C3 fraksiyonunun önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir. Burada yüksek konsantrasyon gelişmesi sonucu oluşan gradient diğer bölgelerdeki kök hücrelerin hasarlı bölgeye mobilizasyonu için bir uyarı oluşturmaktadır (83- 85). Yetişkin yaşamda kök hücre nişlerinin yerleşimleri, kemik iliği, deri ve bağırsak gibi bazı dokular için iyi bilinmektedir. Niş hücreleri ile fiziksel etkileşimler, kök hücre mitozu sırasında yarıklanma düzleminin oriyantasyonu ve niş alanlarında, Wnt, Notch ve kemik morfogenetik protein yollarının katılımıyla gerçekleşen moleküler çapraz iletişim, kök hücrelerinin simetrik ve asimetrik bölünmesi arasındaki dengeyi ve bununla ilişkili sonuçları kontrol altında tutar. Bu olayların kontrolündeki fazlalık ya da eksiklik şeklindeki bir düzen bozukluğu, doku homeostazının, onarımının yetersizliği veya tümör oluşumu ile sonuçlanır (85).

Kök hücre nişleri ve bunların moleküler düzenlemesine gösterilen yoğun ilgi, modern tıpta kök hücre işlevlerini etkileme potansiyelinin yarattığı heyecandan kaynaklanmaktadır. Yakın gelecekte, kök hücre nişlerinin hedeflenmesi, doku onarımını ve doku homeostazını yeniden sağlamak için hücresiz bir strateji oluşturabilir. Kök

hücrelerin istenilen hücre çeşidine farklılaşması olasılığı, arzu edilen hücre çeşidinin mikroçevresini taklit etmeye yönelik girişimleri artırmıştır. Bu amaçla, kök ya da öncül hücreler çeşitli kimyasal kültür koşullarında arzulanan hücre çeşidinin mikroçevresinin özgün hücreleri, doku parçacıkları ya da hücre dışı matriks elemanları ile ko-kültüre yöntemi kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar kültür koşullarının yanında bazı mekanik etkiler uygulayarak kök hücreden istedikleri hücreleri elde etmeyi denemektedirler. Bu alandaki iki tipik çalışma Güney Asya ülkelerinden gelmiştir. Bu çalışmalardan ilkinde sıçan kemik iliği stromal hücreleri sıvı akımının teşvik ettiği mekanik güçlere maruz bırakılmış ve yapılan incelemelerde bu hücrelerde düz kas hücresi-özgün hücre iskeleti proteinin ekspresyonunda belirgin bir artış saptanmıştır (86).

Son yıllarda gerçekleştirilen birçok çalışma, yetişkin dokuya özgü kök hücrelerinin sayet normal mikroçevre ya da yataklarından başka bir mikroçevreye yerleştirilirse yeni mikroçevrelere uygun hücre çeşitlerini üretmek için yeniden programlanabileceğini göstermiştir. Yeni mikroçevre ya da yataklarına yerleşmiş yetişkin doku özgün kök hücreleri daha sonra bu yeni mikroçevreye yanıt olarak ya doğrudan farklılaşmış hücrelere transdifferensiye olurlar ya da “çoğaltıcı transit hücreler” (transit-amplifying cells)’i oluştururlar. Çoğaltıcı transit hücrelerinin birincil görevi, kök hücrelerin bölünmelerinden doğan farklılaşmış hücrelerin sayısını çoğaltmaktır. Böylece, kök hücreler sınırsız bölünme yeteneğine sahip olmalarına rağmen yapmaları gerekenden daha az bölünme yapabilirler (87). Bu bilgiler bize gösteriyor ki, yetişkin kök hücreleri kendi mikroçevrelerinden uzaklaştırıldıklarında ve yeni bir genetik programı etkinleştiren sinyalleri yayan farklı bir mikroçevreye ya da yatağa yerleştirildiklerinde yeniden programlanabilirler.

Mikroçevrelerinden aldıkları farklı sinyaller ile farklı hücre türlerine dönüşebilen hücreler, çoğalma ve farklılaşma ile ilişkili sinyal yollarındaki düzenleme bozukluğu sonucu kanser kök hücrelerine (KKH) de dönüşebilmektedir. KKH’ler, tümör hücreleri arasında tümör oluşumundan ve tedavi direncinden sorumlu küçük bir alt popülasyon olup, tümör kökenli dokudaki normal kök hücrelerle asimetrik hücre bölünmesi, kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşabilme gibi özellikleri paylaşırlar. KKH’leri, kök hücrelere özgü özellikler taşıdığı için sıklıkla farklılaşma kapasitelerinin

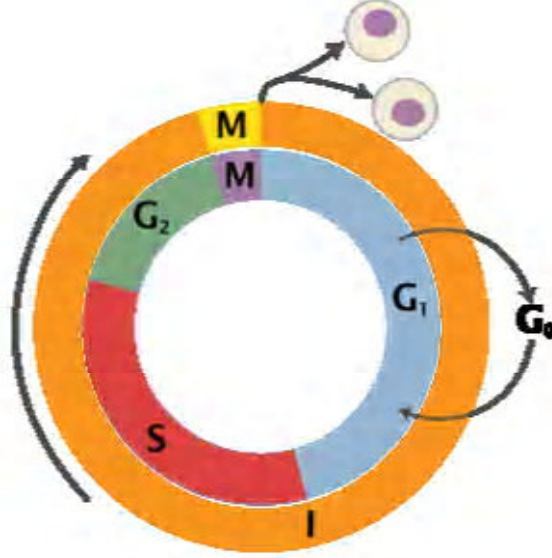
incelendiği görülmektedir. Günümüzde birçok kanser tipine ait farklı kanser kök hücre alt popülasyonlarının farklılaşma kapasitesi *in vitro* olarak gösterilmiştir.

2.6.4. Hücre Siklusu ve Düzenleyicileri

Hücre siklusu hücrenin doğumundan kardeş hücrelere ayrılmasına dek olan değişimleri içine alan bir süreçtir. Bu süreç 4 basamağa ayrılır. Bunlar G₁, S, G₂ ve M fazlarıdır. G₁, S ve G₂ fazları kombinasyonu interfaz adını almaktadır. M fazı sonunda iki kardeş hücre ortaya çıkar ve her biri G₁ fazına girer. Bu dönemde diğer hücre siklusu için gerekli olan metabolitlerin çoğu üretilir. Aynı zamanda bu dönemde hücrenin bir daha bölünüp bölünmeyeceğinin kararı alınır. Eğer bölünmeyeceklerse hücreler G₀ adı verilen sessiz faza girerler. G₁ süresince hücreler diğer bölünmeye girilmeyi uyarmak için büyüme faktörlerine cevap verme aşamasındadır. Eğer cevap verilirse artık geri dönüş olmaz ve hücre bölünmeye başlar. Büyüme faktörleri aynı zamanda G₀'da bulunan hücreleri de uyarak hücre siklusuna girmeye zorlar. Bununla birlikte, tümör baskılayıcı genler (tumor supressor genes) adı verilen proteinler hücre siklusunu G₁ fazında bloke eder. Bu nedenle G₁ fazı hücre bölünmesinin düzenlenmesinde çok önemli olan bir dönemdir. Onkogen adı verilen proteinler bu dönemde patolojik olarak bu düzenlenmeyi bozarak kontrolsüz hücre büyümesine neden olmaktadır.

DNA replikasyonu S fazı süresince gözlenir ve bu dönem sonunda DNA içeriği 2 katına çıkar. G₂ fazı süresince hücre bölünmeye hazırlanır ve çekirdek zarı parçalanması ile bu dönem sona erer (88-90). Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra siklus G₁-S-G₂ (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanır. Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelmekte veya bölünme sinyali almadıkları sürece istirahat fazı G₀ da durmaktadırlar <http://www.adutfdergi.org/text.php3?id=254 - r2>(91). G₁, S, G₂ fazları hücre siklusunun %90'nını kapsar ve 16-24 saat sürer. Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir. Hücre büyümesi G₁ fazında kısıtlayıcı nokta (R point) tarafından koordine edilir. Kısıtlayıcı noktada hücre duracak veya hücre siklusunu tamamlayacaktır (92). G₁ fazında hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. Bu fazda DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezi olur. S fazında ise DNA sentezlendikten sonra, G₂ fazında hücre büyümeye devam eder aynı zamanda RNA sentezi, protein sentezi gerçekleşir ve hücre mitozu hazırlanır. Mitoz;

profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşmaktadır. Telofazda sitoplazmik bölünme tamamlanır ve aynı genetik materyalli iki yeni hücre meydana gelir (92-95) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Ökaryot hücre siklusu. I: İnterfaz; G1: Büyüme; S: DNA sentezi; G2: Büyüme ve mitoz hazırlık ; G0: Dinlenme aşamasında olan, bölünmeyen hücreler; M: Mitoz bölünme (profaz, metafaz anafaz ve telofaz) fazlarından oluşur (95).

Hücre siklusu, siklin ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) tarafından düzenlenir. Memeli hücrelerinde farklılaşma, G1 fazından S fazına geçiş sürecinin düzenlenmesiyle kontrol edilmektedir. Retinoblastoma proteini (Rb), G1/S geçişini kontrol eden önemli moleküllerden biri olup aktivasyonu fosforilasyonla sağlanmaktadır. De-fosforile Rb, (G1 fazında) S fazına girişi sağlayan genlerin ekspresyonunu baskımlarken, S fazına yaklaşıldıkça siklinler tarafından fosforlanması sağlanır. Böylelikle, E2F serbest kalır ve S fazına geçiş için çeşitli faktörlerin aktivasyonunu sağlar. Normal hücrelerden farklı olarak, embriyonik kök hücreler Rb'nin de-fosforile halinin bulunmadığı kısa bir G1 fazı geçirir (96-98).

2.6.5. Kendini Yenileme (Self-Renewal)

Kök hücreler, yüksek çoğalım potansiyellerini sahip oldukları yüksek telomeraz enzim aktiviteleri sayesinde sağlarlar. Farklılaşmadan bu işlevi devam ettirmelerini ise, bulundukları mikroçevrelerden kaynaklanan bazı sinyal yollarının (Wnt, Notch ve Jak/Stat3 gibi) aktivasyonuna bağlı olarak kendini-yenilemeden sorumlu olan

transkripsiyon faktörlerinin (OCK3, Nanog gibi) devam eden ekspresyonlarıyla sürdürürler. LIF, gp130 reseptörü üzerinden JAK-STAT (Signal transducer activator of transcription) ve SHP2-Erk yolaklarının uyarılmasıyla STAT3'ün uyarılması ve çekirdekte ilgili genlerin transkripsiyonundan ve OCT4 (octamer-binding transcription factor 4) morula evresinde trofoektoderm ve iç hücre kitlesinin gelişiminden sorumludur. Nanog ilkel endodermin oluşumunda ve gastrülasyonda etkilidir. Notch/Wnt sinyal yolları EKH ve yetişkin kök hücrelerde kendini yenilemeyi sağlar (99-102).

MAPK-ERK sinyal ileti yolağı: gp130'un stimüle ettiği sinyal ileti yolaklarından bir diğeri ise Ras/ MAPK (mitogen-activated protein kinase) sinyal yolağıdır. ERK (extracellular signal-regulated kinase) ve MAPK yolları, somatik hücrelerde birçok hücresel süreçte görev almakla birlikte özellikle kök hücrelerin yeteneklerinin korunmasında, çoğalmalarında ve farklılaşmalarında rol aldığı bilinmektedir. ERK yolağı, hücre zarında Grb2 adaptörü ve Sos guanin-nükleotid-değişim faktörü içeren aktif reseptörlerle ilişki halindedir. Sos'un zardaki konumu Ras proteininin aktivasyonunu belirlemektedir. Ras'ın aktivasyonu, Raf ve MAPK'nin ardından, ERK'nin aktivasyonuna neden olan bir transfosforilasyon kaskadı oluşmasına neden olmaktadır. Aktive olmuş ERK, sitoplazmik bazı proteinleri fosforile edebildiği gibi transkripsiyon düzenleyicileri olan Elk, Ets ve Myc gibi proteinlerin aktivasyonunda da rol oynamaktadır (103). MAPK/ERK yolağının kök hücrelerin proliferasyonundaki etkinliği de bilinmektedir. Sıçanların kemik iliğinden izole edilmiş mezenkimal kök hücreler kültüre alınıp, düşük doz iyonize radyasyona maruz bırakıldıklarında, proliferasyonda belirgin şekilde artış tespit edilen hücrelerde MAPK/ERK yolağı ve bu yolaktaki moleküllerin aktivasyonu tespit edilmiştir (76). Ayrıca nöral kök hücrelerde (NKH) de yapılan çalışmalar fibroblast büyüme faktörlerinin MAPK/ERK aktivasyonu aracılığıyla NKH'lerin Schwann hücrelerine farklılaştıklarını göstermiştir (77).

2.6.6. CD Yüzey Belirteçleri

Kök hücre belirteçlerini kullanarak kök hücre tipini belirlemek, günümüzde en yaygın başvurulmuş yöntemlerden birisidir. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçlerden birçoğu kısaca “CD” (Farklanma Kümeleri=Clusters of Differentiation)

olarak bir başlık altında toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar (104). Kök hücreler, bulundurdıkları özgül hücre yüzey belirteçlerine göre saflaştırılabilirler. Ancak, *in vivo* hücre kültür ortamları, hücrenin aynı tutumu sergileyip sergilemeyeceğini belirsiz hale getiren şekilde hücrenin davranışını değiştirebilmektedir. Bu durumda, önerilen ergin hücre popülasyonlarının gerçekten kök hücreler olup olmadığı konusunda önemli tartışmalar bulunmaktadır. Kök hücreler, diğerlerinden ayıran bu önemli özellikleri sayesinde organizmanın hücresel yapım ve onarım olaylarında eksilen hücreleri yenilemek üzere geniş bir olanak sunarlar.

2.7. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik iliğinin stroması içinde yer alan uzantılı fibroblast benzeri multipotent hücrelerdir. CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49 ($\alpha 5$ -integrin) gibi belirteçleri eksprese ederler. Uygun koşullarda, osteojenik, kondrojenik, adipojenik yönde farklılaşabilmektedirler (105, 106).

MKH, hücrelerin bağ dokularında bulunan, yetişkin haldeki kök hücre tipidir ve dokuların destek bölümü olan "stroma hücre"sinin de temelini oluşturmaktadırlar. MKH'ler, bulunduğu dokudan, hasarlı bir dokuya geçebilmektedirler. Bu sayede hasarlı dokuda doku tamirini sağlarlar. Mezenkimal kök hücrelerin en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun koşullarda başta bağ dokusu olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. Yetişkin vücudundaki birçok farklılaşmış hücre, köken ve özyapı açısından yakın ilişkili ailelere ayrılabilir. Bağ dokusu hücre ailesi, sadece birbirleriyle ilişkili olmayıp alışılmadık bir şekilde birbirine dönüşebilirler. Kendi kendini yenileyen multipotent özelliklerinden dolayı bu hücrelere (olgunlaşmamış fibroblast) mezenkimal kök hücreler denir. Bu bağ dokusu hücreleri, hemen hemen tüm doku ve organların destek ve onarımında temel rol oynar ve farklılaşmış karakterlerin uyarlanabilirliği, pek çok hasar tipine yanıt verebilmelerini sağlayan önemli bir özelliğidir. Fibroblastlar kimyasal sinyallere yanıt olarak karakter değiştirirler.

Bağdoku ailesinin en az özelleşmiş hücreleri olan MKH, Tip I ve Tip III kolajenden zengin katı olmayan bir matris salgırlar. Bir doku yaralandığı zaman, yakındaki

fibroblastlar çoğalarak yaranın içine göç eder ve hasarlı dokuyu izole edip onarmaya yardım edecek kollajen matrsten çok miktarda üretirler. Yara yüzeyinde iyi çoğalabilme yetenekleri, kendi başlarına yaşayabilmeleri ile birleşince, neden fibroblastların kültürde en kolay üreyebilen hücreler olduğu ve hücre biyolojisi çalışmalarında tercih edildikleri anlaşılmaktadır (107).

MKH'ler ilk kez Friedenstein tarafından 1976 yılında düşük yoğunluklu kültür ortamında gelişen kemik aspiratında olduğu gözlenmiştir. MKH'ler bugün özellikle immünoregulator özellikleri ve rejenerasyon kapasiteleri nedeniyle klinik kullanıma girmeleriyle Avrupa Birliği (AB) tıp ajansı tarafından İlaç Hücre (Cell-Drug) kapsamına alınmıştır (108). MKH'ler, yetişkin kök hücre tiplerinden biridir. Mezenkimal kök hücreler tek hücre düzeyinde osteoblastları, kondroblastları, adipositleri, fibroblastları ve iskelet myoblastlarını da içeren mezodermal hücrelere diferansiye olabilmektedirler. Mezenkimal kök hücreler, Owen ve Friedenstein'in 1960'lı yıllardaki öncü çalışmaları ile ilk kez gündeme gelmiştir (109). 1980 ve 90'lı yıllarda ise Caplan'ın araştırmaları konuya ilgiyi artırmıştır. Bu hücrelerin, *in vitro* ortamda kemik, kırık, adiposit, miyosit ve kardiyomiyositlere farklılaştıkları gösterilmiştir (110). Haynesworth ve ark. ise MKH'lerin kemik, kırık doku, tendon, ligaman, kemik iliği stroması, yağ dokusu, kas ve bağ dokusuna farklılaşma özelliğine dikkati çekmiştir (111).

Kemik iliği stromal hücrelerinin, miyogenik farklılaşma ve yetişkin organize kontraktıl protein oluşturduğu, alıcı kardiyomiyositler ve gap junctionlar aracılığı ile ilişki kurduğu gösterilmiştir (112). Kemik iliği stromal hücrelerinin miyositler dışında endotel ve düz kas hücrelerine de farklılaştığı bildirilmiştir (113). Bu hücrelerin basit bir kemik iliği aspiratından 10 hafta içinde yaklaşık 50 kez ikiye katlanarak çoğaltılması mümkündür.

2.7.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin, karakteristik özelliklerini tanımlamada araştırmacılar arasında bazen çelişkiler yaşanmaktadır. Özellikle hücre esaslı bir tedavi ya da doku mühendisliğinde kullanılmak üzere en uygun hücre kaynağının seçilmesi söz konusu olduğunda, mevcut hücre kaynaklarının birbiriyle kıyaslanarak en uygun olanının seçilmesi önemlidir. Böyle bir durumda, çeşitli yöntemlerle izole edilmiş ve farklı

kıstaslara göre kök hücre olarak adlandırılmış bu hücrelerin, birbirleriyle biyolojik özellikleri ve deney sonuçları açısından doğrudan bir kıyaslamanın yapılabilirliği ile ilgili karışık görüşler ileri sürülmüştür (114). Elde edilen hücrelerin kıyaslanması ile ilgili bu gibi tartışmalar kısmen, MKH'yi tanımlayan uluslararası olarak kabul edilmiş kriterlerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenlerden ötürü International Society of Cellular Therapy (ISCT), hem laboratuvar hem de pre-klinik çalışmalar için insan MKH'leri tanımlamada gerekli kriterleri önermiştir (114, 115) (Tablo 2.1). Halen MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; plastik yüzeye yapışması (plastik adherens), spesifik yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir. MKH'ler standart kültür koşulları altında plastik doku kültür kaplarına yapışmaktadır. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerinin ilk izolasyonu 1970'li yıllarda Friedenstein ve arkadaşları (51) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda aspire edilen kemik iliğinin *in vitro* kültüründe, diğer hücrelerden farklı olarak plastik kültür kabına yapışarak koloni oluşturabilen fibroblast benzeri hücre kolonilerini rapor etmişlerdir. Günümüzde de MKH'lerin izolasyonu için bu basit protokol yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MKH'ler, çok özel koşullar sağlanarak doku kültür flasklarına yapışmadan da çoğaltılabilmektedir.

Tablo 2.1. ISCT tarafından MKH tanımlaması için gerekli kriterlerin özeti

1. Standart kültür koşullarında plastik adherensi olması		
2. Fenotip	<u>pozitif (%95≤, +)</u>	<u>negatif (%2≥, +)</u>
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 veya CD11b
		CD79α veya CD19
3. <i>In vitro</i> diferansiasyon: osteoblast, adiposit, kondroblast		
HLA-DR		

(115).

Bir hücre popülasyonunun hızlı bir şekilde tanımlanmasına imkan tanıyan yüzey antijeni ekspresyonu, immünoloji ve hematolojide çok yaygın olarak kullanılmaktadır. ISCT kriterlerine göre, bir MKH popülasyonunun % 95 veya daha fazlasının CD105 (endoglin olarak bilinir ve orijinal olarak MAb SH2 şeklinde tanımlanmıştır), CD73

(ekto-5W'-nukleotidaz olarak bilinir ve orijinal olarak MAb SH3 ve SH4sekinde tanımlanmıştır), CD90 (Thy-1 olarak da bilinir) antijenleri için pozitif olması gerekmektedir. Spesifik Yüzey Antijenlerinin Ekspresyonu önemlidir. Ayrıca, heterojen MKH popülasyonunu diğer hücre popülasyonlarından ayırt etmek için hematopoetik kök hücreler veya hücrelerin izole edildiği dokuya ait spesifik antijenlerin negatif olması gerekmektedir. Buna göre hücre popülasyonunda CD45, CD34, CD14 veya CD11b, HLA sınıf II, CD79 α veya CD19 ve gibi hematopoetik antijenlerdeki pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir (114, 115).

2.7.2. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

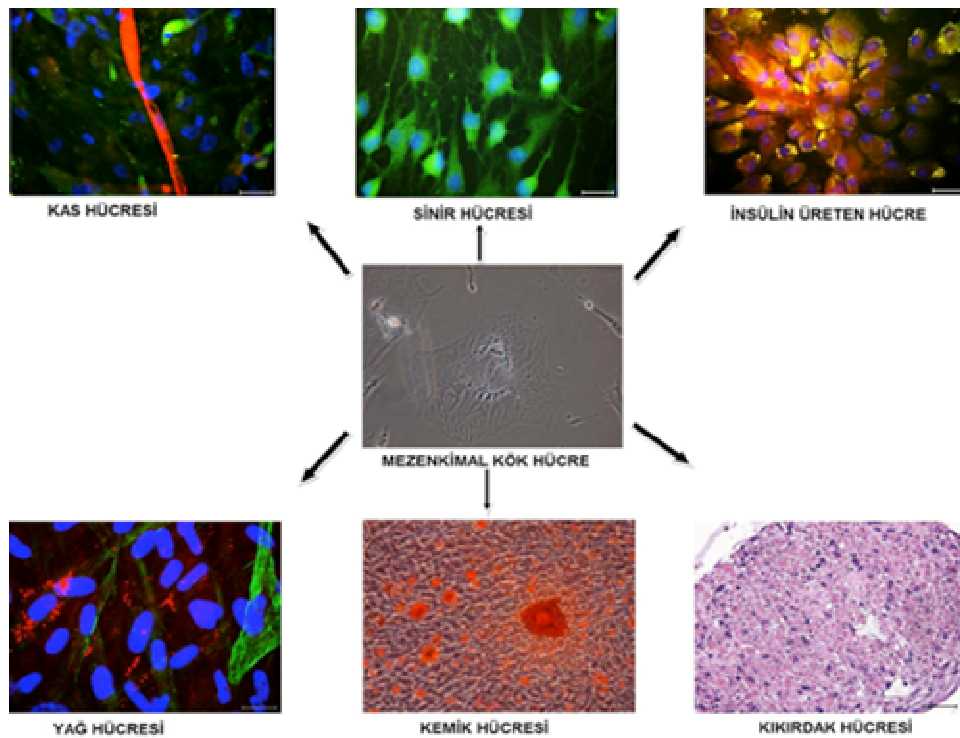
Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök/progenitor hücreler bulunmaktadır. Kemik iliğinde non-hematopoetik kök hücrelerin varlığı 130 yıl önce Alman patolog Cohnheim tarafından ile sürülmüş olmakla birlikte, bu hücreler ilk olarak 1976 yılında Friedenstein tarafından tanımlanmışlardır. Friedenstein, fetal buzağı serumu içeren kemik iliği materyalinin ortama yayılması sonucunda, adezyon yeteneği olan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kemik hücreleri ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip hücre kolonilerinin varlığını bildirmiştir (51). Kemik iliği mikro çevresi kemik homeostazisi ve hematopoezini destekleyen birçok farklı elementten oluşur. Bu elementlerden biri de mezenkimal hücreler olup kas, kan, vasküler ve ürogenital sistemi oluşturan mezodermal orijinli primordial hücrelerdir. Bugün mezenkimal hücrelerin hematopoetik karakterli olmayan bir grubunun, mezenkimal ve mezenkimal dışı hücreleri oluşturan kök hücreler olduğu saptanmış olup bu hücrelere mezenkimal kök hücreler adı verilmektedir. Kemik iliğinde her 10.000-100.000 tek çekirdekli hücreden birinin MKH olduğu hesaplanmaktadır. Bu oran kordon kanında 1/108'e kadar düşebilmektedir. Kemik iliği stromal hücreleri, mezenkimal kök hücre olarak tanımlanmıştır. ISCT tarafından mezenkimal kök hücre yerine "multipotent mezenkimal stromal hücre" (115) denilmesi önerilmisse de çok yönlü (multilineage) farklılaşma özellikleri bulunan bu hücreleri "mezenkimal kök hücre" olarak isimlendiren araştırmacılar çoğunluktadır. Mezenkimal kök hücreler bugün birçok farklı dokudan elde edilebilmektedir. Göbek kordonu, periferik kan, amniyotik sıvı (116), periost (117), yağ dokusu (118, 119), sinoviyal membran

(120) ve kas (121), wharton jeli, diş, karaciğer vd. kaynaklardan elde edilebildikleri araştırmalarda gösterilmiştir.

2.7.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli

Mezenkimal kök hücreler, birçok mezodermal dokuya farklılaşabilmektedir. İlk *in vivo* farklılaşma, 1983 yılında Sale ve Storb tarafından tanımlanmıştır. Allojenik kemik iliği kaynaklı hematopoetik kök hücre nakli yapılan bir köpekte beklenmeyen bir fenomen olarak solunum yetmezliği tablosu geliştiği tespit edilmiş ve yapılan biyopsilerde akciğerlerde yaygın ossifikasyon saptanmıştır (122). Kök hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yalnızca kaynaklandıkları doku ve organların hücrelerine değil, vücudumuzun diğer işlevsel hücrelerine de dönüşebildiklerini (plastisite) gösteren birçok rapor yayımlanmıştır. Diğer yetişkin kök hücre kaynaklarına oranla daha kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle kemik iliği kaynaklı kök hücreleri öncelikli olmak üzere olmak üzere farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler rejeneratif ve reperatif tıpta oldukça önemli bir kaynak olmuşlardır.

Farklılaşma Potansiyeli, mezenkimal kök hücrelerin özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliğidir. Uygun mikro çevre koşullarında başta bağ doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyelidir. Caplan ve arkadaşlarının ardından çeşitli araştırmacılar *in vitro* koşullarda uygun uyaranlarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerini ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir (2, 123) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. MKH'lerin farklı sinyal moleküllerine yanıt olarak gösterdikleri değişik yöndeki farklılaşmaları (123).

İlerleyen zamanda MKH'lerden pankreas beta hücreleri, hepatosit, endotel ve epitelooid hücrelere dönüşüm olduğu gösterilmiştir (124). Ding ve ark. tarafından farklılaşmanın transkripsiyon faktörlerini de içeren bir genetik kontrol mekanizması olduğu da gösterilmiştir (125). Ancak uygun koşullar sağlansa bile nöronların farklılaşma potansiyelleri halen tartışmalıdır. Uygun uyaranlarla nöronal morfolojiye sahip ve nöronal antijenleri taşıyan hücreler görülmekle beraber bu hücrelerin gerçek nöron özelliklerinde ve fonksiyonunda olduğu kanıtlanmamıştır. Farklılaşma potansiyeli ile ilgili diğer bir konu ise MKH'lerin kendi kökeninden değil de farklı bir doku hücresine farklılaşmasının *in vivo* koşullarda çok düşük olmasıdır.

2.7.4. Kök Hücre ve Mezenkimal Kök Hücrelerin Rejeneratif Tıptaki Terapötik Potansiyeli

Rejeneratif tıpta, embriyonik ve yetişkin kök hücreler olmak üzere iki genel gruptan yararlanılmakla beraber yetişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelerin oluşturduğu immün uyumsuzluk, tümör oluşturma potansiyelleri ve etik problemler gibi sebeplerden dolayı son yıllarda tercih sebebi olmaktadır (126). Yetişkin kök hücrelerin önemli bir

tipi olan MKH veya multipotent mezenkimal stromal hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında başta konnektif doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. MKH'ler tek hücre düzeyinde osteoblastları, kondroblastları, adipositleri, fibroblastları ve iskelet myoblastlarını da içeren mezodermal hücrelere diferansiye olabilmektedirler (8, 127). MKH'ler kemik iliği veya yağ dokudan kolay bir şekilde izole edilebilmekte ve *in vitro* koşullarda klinik uygulamalarda kullanılmak üzere büyük miktarlarda çoğaltılabilmektedirler. Ayrıca, uzun süreler farklılaşma potansiyellerini kaybetmeden saklanabilmekte ve immün sistem üzerindeki düzenleyici etkilerinden dolayı allojeneik MKH nakillerinde ciddi yan etkiler oluşturmamaktadırlar (128). Diğer yandan, MKH'ler çeşitli immünomodülatörler faktörler salgılayarak ve adeziv özellikleri sayesinde hücre/hücre, hücre/matriks ilişkileri oluşturarak hasar görmüş doku veya organın hızlı bir şekilde kendini yenilemesine yardımcı olacak rejeneratif mikroçevreler oluşturmaktadırlar. Bu özellikler, MKH'lerin başta diyabet, karaciğer, kalp ve kemik hastalıkları gibi inflamatuvar/otoimmün hastalıklar olmak üzere birçok hasar durumunda potansiyel bir tedavi yöntemi olarak ortaya çıkmasına yol açmıştır (129, 130). Ayrıca, ortopedi, diş hekimliği, kardiyoloji, nöroşirürji, spor hekimliği ve plastik cerrahi gibi çok geniş bir alanda kullanım potansiyelleri bulunmaktadır (131). Tüm bu kullanım alanları dışında, MKH'ler değişik retroviral veya vektörlerle değiştirilebilir, sistemik ve lokal hastalıkların somatik gen terapileri içinde kullanılabilir olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (132).

2.7.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kullanım Avantajları

1. Mezenkimal kök hücreler bağ doku kökenli olmaları nedeniyle stromal destek sağlayarak ilgili doku hücrelerinin gelişimine ve fonksiyonlarına katkı sağlarlar.
2. MKH'lerin tedavide önemli olan özellikleri, doku onarım ve rejenerasyon potansiyelleri immunosupresif ve migratuvar (gezici) özellikleridir. İntravenöz infüzyon sonrası genellikle kemik iliğine yönelir ve burada yerleşme eğilimi gösterirler ise de eğer inflamasyonun bulunduğu bir bölge/doku varsa bu bölgeye de yerleşebilirler (133).

3. Hücrelerin gidip yerleştikleri (engrafman) ve fonksiyonel etkilerini gösterdikleri dokuyu tanımlayan homing, önemli bir özelliğidir. MKH'nin hareketleri, kemokinlerin az yoğun olduğu bölgeden daha yoğun olduğu bölgeye doğrudur. İnflamasyon bölgesinde artmış kemokin düzeyleri MKH'lerini bulundukları bölgeye çekerler. CD44 gibi bazı yüzey antijenleri ise endotele tutunmaları ve endoteli geçmelerinde görev alır (134).

4. MKH'lerin tam olarak tanımlanamamış immunsupresif etkileri vardır. Bu etkilerini genellikle T hücre fonksiyonlarını baskılamak suretiyle gösterirler. MKH'lerde sadece Majör histocompatibilite (MHC) I antijenleri bulunur. MHC II antijenleri yoktur. Hayvanlarda immuno supresif gerektirmeksizin MHC bariyerlerine aşarak nakledilebilme avantajına sahiptirler. Bu MKH'lerin tedavide kullanımlarını kolaylaştıracak bir faktör olup, akraba dışı gönüllü vericilerden alınarak çoğaltılan MKH'lerin dondurulması ve ihtiyaç halinde kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır. *In vitro* çalışmalar MKH'lerin immün düzenleyici etkilerini dentritik hücreler, natural killer (NK) hücreleri, T ve B hücreleri üzerinde göstermektedir. Monositik dendritik hücrelerin çoğalmasını ve olgunlaşmasını ve bu hücrelerden salınan proinflamatuvar sitokinleri baskılar. Öte yandan olgun plasmositoid dentritik hücrelerden B hücre aktivasyonunu baskılayan ve regülatuar T hücrelerini uyaran IL-10 salınımını arttırır (135).

5. Kalıtsal hastalıklarda MKH tedavilerinin gelecek vadede yararlarından biri de gen tedavisi imkanıdır. Bu hücrelere gen aktarımının kolay olması ve deneysel çalışmalarda lökodistrofi gibi modellerde başarı sağlanması kalıtsal hastalıklarda MKH'lerin geniş bir kullanım alanı bulabileceğinin işaretidir. Ancak, bu konuda çalışmalar henüz çok yeni olup uzun deneyim gerekmektedir.

2.7.6. Mezenkimal Kök Hücre Kullanım Zorlukları, Komplikasyon ve Potansiyel Riskler

1. MKH'lerin klinik kullanım açısından en önemli dezavantajı sayılarının çok az olması nedeniyle *in vitro* olarak haftalarca süren kültürlerde çoğaltılması gereğidir. Bu da ciddi bir teknoloji, alt yapı, deneyim gerektirir ve maliyeti yüksektir (136). Bu nedenle dünyada ve Avrupa'da sayılı sayıda merkezde klinik kullanıma uygun MKH üretimi

yapılmaktadır. Bu işlem için gerekli tüm *in vitro* işlemlerin uluslararası kabul edilmiş standartlarda iyi üretim uygulamaları Good Manufacturing Practice (GMP) koşullarında üretiminin yapılması gerekmektedir. Bu nedenle, halen MKH tedavilerinin uygulandığı literatürde bildirilen hasta sayısı oldukça azdır.

2. MKH'lerin kültür ortamında pasajlanmaları sonucu, maruz kaldıkları çeşitli uyaranlar ve faktörlerin etkisiyle fenotipik, immünolojik ve diğer biyolojik özelliklerinde farklılıklara yol açmaktadır. Klinik uygulamalar sonucunda emboli gelişimi, infüzyona bağlı ciddi sorunlar da bildirilmemiş ancak MKH çoğaltılmasında kullanılan fetal calf serumuna bağlı immünolojik reaksiyon bildirilmiştir. Bir de bu hücrelerin immunosupresif özelliğinin enfeksiyon riskini (özellikle sitomegalovirus gibi) artırmada katkısı olabileceği ancak enfeksiyondan ölüm oranını değiştirmedeği ifade edilmektedir. Bu konuda henüz yeterli deneyim ve literatür bulunmamaktadır.

3. Deneyimli yetişmiş elemana ihtiyaç vardır.

4. Pasaj sayılarının artmasıyla birlikte fazla manipule edilmiş hücrelerde stres belirtileri ortaya çıkmakta ve bunların hücrelerin *in vivo* durumundan sapmalara yol açabileceği bilinmektedir.

5. Mikroorganizma kontaminasyonun yanı sıra sitogenetik patoloji gelişimi, kültürde hücre yaşlanması, telomer kısalması, kanser gelişimi gibi ciddi riskler de söz konusudur. Diğer bir sorun ise bu hücrelerin immunosupresif özelliklerinin enfeksiyon riskini arttırmada etkili olmasıdır (136).

6. Bu hücrelerin *in vitro* ortamda çoğaltılması sonucu mikroorganizma kontaminasyonu yanında sitogenetik patolojiler gelişimi, kültürde hücre yaşlanması, kanser gelişimi gibi ciddi riskler söz konusudur. Enfeksiyöz riskler: Mezanşimal hücre kültürlerinde genellikle %10–20 fetal calf serumu kullanılmaktadır. Prionlar ve tanımlanmamış zoonozlar ile bulaşma riski bulunmaktadır.

7. İmmün yanıt oluşturabilir. Bu bakımdan fetal calf serumu alternatif olarak taze donmuş plazma ve plateletler, platelet çözeltisi insan platelet lizat (hPL) gibi insan kaynaklı mediumlar önerilmektedir (137). hPL'nin alloantijen kaynaklı lenfosit proliferasyonunu daha etkin bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir (138).

8. Bu hücrelerin immunosupresif özelliğinin enfeksiyon riskini (özellikle sitomegalovirus gibi) artırmada katkısı olabileceği ancak enfeksiyondan ölüm oranını değiştirmedeği ifade edilmektedir. Transformasyon (dönüşüm) riski: Kültür ortamında

çoğaltılan MKH'lerin dönüşüm göstermesi mümkündür. Bu kaygılar fare MKH deneylerinden kaynaklanmaktadır. Uzun süreli kültürlerde fare MKH'nin kromozom anormalliklerini biriktirdiği ve buna bağlı olarak malign (sarkoma) dönüşüm gösterebildiği bildirilmiştir (139). İnsanda MKH davranışlarının benzer bir özellik gösterdiğine, geç dönem pasajlarda kromozom anormalliklerinin biriktiğine dair bir kanıt olmamakla beraber (140) beraber kötücül dönüşüm kaygıları tümü ile ortadan kalkmamıştır.

9. Latent tümörlerin büyümesi: MKH'lerin var olan bir latent tümörün büyümesine yol açabileceği kaygısı, kolon, over kanseri, Kaposi sarkomu ve melanom gibi tümörlerin hayvan modellerinde tümör stromasına yerleştiğinin ve tümör nekrozu ve anjiogenezi arttırmak sureti ile tümörün büyümesine yol açtığından gösterilmesinden kaynaklanmıştır (141).

Yukarıda bahsedilen bu riskler, MKH'in GMP koşullarında üretilmesi ve hastalara verilmesinden önce fenotipik fonksiyonel, mikrobiyolojik ve genetik özelliklerinin kontrol edilmesi zorunluluğunu doğurmaktadır (142).

2.8. ADİPOZ (YAĞ) DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Adipoz doku, adiposit adı verilen ve %95'i yağ damlacığıyla kaplı hücrelerce oluşturulan bir dokudur. Diğer organlardan farklı olarak, vücut boyunca dağılım gösteren adipoz doku oldukça dinamiktir. Vücut yerleşimlerine göre adipoz doku hücrelerinin gen ifadenme kalıplarında küçük farklılıklar görülebilir. Yağ dokusu sadece yağ depolamadan sorumlu olmayıp aynı zamanda polipeptidik sitokinler ve hormon benzeri moleküller salgılama yeteneğine sahip hücrelerden oluşan organize bir endokrin dokudur (143).

Yağ dokusu da kemik iliği gibi embriyonik mezodermden oluşur ve bir stroma içerir. Adipoz dokudaki stromal hücreler, aralarında daha az farklılaşmış oldukları düşünülen stromal-damarsal hücrelerin de olduğu, olgunlaşmanın çeşitli aşamalarındaki adiposit öncüllerini içerir. İn vivo ortamdaki stromal-damarsal hücreleri, soğuk aklimasyon esnasında ve kalori aşımı sonrasında çoğalmak ve olgun adipositlere farklılaşmak üzere uyarılırlar. Hem stromal-damarsal hücreleri hem de kemik iliği kökenli mezenkimal öncül hücreler, glukokortikoidlerin, insulin ve insulin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF-1) verilmesi yoluyla adipositlere farklılaşma yönünde uyarılabilirler. Dolayısıyla

stromal-damarsal hücreleri adipositlere ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilen, en azından iki yönlü farklılaşma potansiyeli sergileyen ve yağ dokusunda yerleşik vaziyette bulunan mezenkimal öncül hücre grubudur. Yağ dokusundaki öncül hücreler tarafından sergilenen yaygın farklılaşma potansiyeline ilişkin ek bulgular, kemik iliği yağından izole edilen klonlanmış hücrelerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilmiştir (144).

2.9. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE FARKLI LAŞMASI

MKH'ler uygun koşullarda, osteojenik, kondrojenik, adipojenik, miyojenik, hepatojenik, nörojenik ve endotelyal yönde farklılaşabilmektedirler (112, 113). Her bir hücre tipine farklılaşma ise histolojik ve immunolojik yöntemler ile belirlenebilmektedir.

Tavşan yağ dokusu kaynaklı MKH'leri ko-kültüre ederek, hücre dışı matriks elemanı kollagen ve bal peteği şekilli çatı ile birlikte kondrojenik medium kullanılarak farklılaşma potansiyelleri denenmiş ve artiküler kıkırdak elde edilmiştir. (145)

MKH'lerin *in vitro* kondrogenetik farklılaştırılması, TGF'nin varlığında mikro kütlelerin oluşumu ile karakterizedir (146). Kondrojenik farklılaşma mikromas kültür tekniği kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (147). Özetle, 8×10^7 hücre peleti kültür kabının ortasına küçük damlacık halinde konulur ve 37 °C de 2 saat yapışmaları için beklendikten sonra hücreler, 6.25 mg/ml insulin, 10 mg/ml TGF- β 1, 50nM askorbat-2-fosfat ve yüzde 1'lik antibiyotik/antimikotik içeren kültür medyumunu ile 2 hafta kültüre edilebilmektedir. İki haftalık kültür sonrası kondrojenik farklılaşma kıkırdak matriksinde bulunan fosfatlı proteoglikanların (Örn. Alcian blue ile) boyanması yapılarak histokimyasal olarak tespit edilebilmektedir. Ayrıca kondrojenik farklılaşma tip 1 ve tip 2 kollojenin immuno histokimyasal/immun floresan yöntem ile belirlenmesi ile de gösterilebilmektedir (148).

Farklılaşmanın başlangıç safhalarında kondrositler, tıpkı osteoblast farklılaşmasında olduğu gibi tip I kollajen sentezlemektedirler. Olgun kondrositler ise, karakteristik olan kollajen tip II ve IX sentezlerler. TGF- β , protein kinazlar aracılığıyla (hücre-dışı sinyal düzenleyici kinaz 1, p38, protein kinaz A, protein kinaz C, Jun kinaz) kondrogenezi indüklemektedir (149) (Şekil 2.9). TGF β , matriks moleküllerinin ekspresyonunu

düzenler, fibronektin, proteoglikan, kollajen ve tenaskin üretimini uyarır. TGF- β 'nın önemli bir etkisi de matriks moleküllerini degrade eden proteazlara karşı bunların inhibitörlerinin üretimini uyarmasıdır. Böylece proteazların matriks moleküllerini degrade ederek yapının stabilitesini ve bütünlüğünü bozmasına karşı dokuyu korumaktadır (150). TGF β 'nın kondrojenizdeki görevi hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinaz 1, p38, protein kinaz A, protein kinaz C ve Jun kinaz gibi çeşitli protein kinazları uyarmaktır. TGF β , MKH'lerin kondrojenizde BMP6 ile sinerjik bir ilişkiye girerek onun etkisini de artırır (150).

2.10. KIKIRDAK DOKU ve KONDROSİT HÜCRESİ

Kıkırdak, embriyonun mezoderm tabakasında gelişen bir bağ dokudur. Kemik dokusu hariç diğer bağ dokulardan daha sert olmasına rağmen, bükülebilecek bir esnekliğe sahiptir. Damar ve sinir bulunmayan bu dokunun matriks yapısı çok önemlidir (151). Kondroblastlar, kıkırdak matriksinin sentezinden ve salgılanmasından sorumludurlar. Kıkırdağın ileri gelişmesi ise interstisyel ve apozisyonel olarak iki şekilde devam eder. İnterstisyel tipte kıkırdağın içinden doku gelişirken; diğerinde çevre dokunun perikondriumun kondrojenik aktivitesiyle dokunun gelişmesi söz konusudur. Mitozla çoğalan kondrositler interstisyel büyümeyi; perikondriumdaki hücreler ise apozisyonel büyümeyi gerçekleştirirler (152). Her iki türdeki kıkırdaklaşma da gelişim çağına kadar devam eder. Ancak perikondriumun kondrojenik özelliği saklı kalır ve herhangi bir kıkırdak hasarı durumunda rejenerasyonu sağlar. Kıkırdaklaşma oluşurken dokunun ara maddesinin miktarı artar ve hücreler tek veya gruplar halinde birbirlerinden uzaklaşırlar. Olgun kıkırdak hücresine kondrosit denir (153). Bu hücreler aktif yapıda olmayıp, doku yenilenmesi sırasında kondroblastlara dönüşerek aktif hücre olurlar; yani sentez yapabilme özelliklerini kazanırlar. Hücrelerin etrafı sentez edilen ara madde ile çevrilmiştir, lifler ise daha azdır. Yapıdaki kollajen, hyaluronik asit, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler tüm kıkırdak tiplerinde bulunan makromoleküllerdir (154). Yetişkinlerde kıkırdak doku uzun kemiklerin yüzeylerinde, trake ve bronşlarda, burun, kulak, larinks, intervertebral disk'in yapısında bulunmaktadır. Kıkırdak, kıkırdak doku hücreleri, fiberleri ve amorf zemin maddesi denilen jelimsi ve hiç hücre içermeyen yapısında proteoglikan, su ve matriks proteinleri

içeren bir yapıdan oluşmaktadır. Kıkırdak doku hücresiz maddenin çok bulunduğu, kan damarı ve sinirlerin bulunmadığı bir yapıdır (155). Kıkırdak dokunun en karakteristik özelliği, fetal dönemdeki iskelet yapısının kıkırdaktan oluşmasıdır. Yetişkinlerdeki birçok kemik fetal dönemde kıkırdak yapıdadır. Tanınmış üç tip kıkırdak doku bulunmaktadır

Hyalin kıkırdak; insan vücudunda baskın olarak bulunan mavimsi bir dokudur. Kemiklerin eklem bölgelerinin yüzeyinde, kaburgaların ventral kısımlarında, trake ve larinksin yüzeyinde bulunan dokudur. Hyalin kıkırdak, aynı zamanda gelişme dönemindeki çocuklarda ve fetüste kemiklerin epifiz uçlarını sarmaktadır (156). Elastik kıkırdak; dış kulağın yapısında, kulak kepçesi ve işitme yolunda bunlara ek olarak küçük dilin yapısında, östaki borusunda ve larinksin bir kısmında bulunmaktadır. Asıl görevlerinden biri, vücudumuzdaki tüplerin lümenlerini sararak bu dokulara elastiklik katmasıdır (157). Fibröz kıkırdak; omurgaların yapısında, kasık kemiğinde, geniş eklemlerin yapısında ve eklemlerin tendonlara bağlandıkları noktalarda bulunmaktadır. Onu oluşturan hücrelerin sadece %2'sini gelişmiş kıkırdak dokusu oluşturmaktadır. Bu durumun tersi fetal dokuda görülebilmektedir. Fetal kıkırdak dokuda hücre yoğunluğu fazla iken; yaşa bağlı olarak hücreler azalmaktadır (158).

2.10.1. Kıkırdak Dokusunun Önemi

Kıkırdak dokusu destek materyali olarak önemli bir göreve sahiptir. Özellikle eklem bölgelerinde bulunan kıkırdak dokusu, eklem rahat hareket etmesini sağlayarak kişiye büyük bir hareket kolaylığı sağlamaktadır. Bu bölgelerdeki kıkırdak dokusunda meydana gelebilecek hasarlar ağrılara neden olarak kişinin hareket yeteneğini büyük ölçüde kısıtlamakta ve yaşam standardını düşürmektedir. Kıkırdak dokusunda karşılaşılan belli başlı rahatsızlıklar; artrit (eklem iltihabı), kalıtsal anormallikler, travma, artroz (eklem yıpranması, yaşlanması), kalsifikasyon (hücre dışı matriksin mineralizasyonu, kireçlenme), ossifikasyon (kemikleşme), lifsel bozulma, iyi ve kötü huylu tümörlerdir. Ayrıca çeşitli yaralanmalar ve kazalar, kıkırdak dokusunda özellikle de eklem kıkırdağında hasara yol açmaktadır (159). Eklem kıkırdak hasarı her yıl binlerce insanın eklemlerini etkileyen yaygın bir problemdir. Burada temel sorun yüksek oranda diferansiye olmuş, vasküler kan desteği eksik ve yalnızca sınırlı

rejenerasyon kabiliyetine sahip olan yetişkin eklem kıkırdağıdır (160, 161). Kıkırdak dokusu avasküler yapıya sahiptir. Buna bağlı olarak kan ve lenf kapillerleri ile sinir hücrelerini içermemektedir. Beslenmesi, komşu bağ dokusundaki (perikondrium) kapillerlerden ve eklem kavitelerinin sinoviyal sıvısından difüzyonla gerçekleşmektedir. Bütün avasküler dokularda olduğu gibi, kıkırdak hücreleri de düşük metabolik aktivite göstermektedir. Kan kapillerlerinin olmayışı nedeniyle kondrositler, düşük oksijen konsantrasyonlarında solunum yapmak zorundadırlar. Bu nedenlerden ötürü kıkırdak dokusunun kendini yenileme ve tamir etme yeteneği çok düşüktür (162). Eklem kıkırdak hasarı sonucu meydana gelen ağrı ve yetersizlik (fonksiyon kaybı), kıkırdak tamirini kolaylaştıracak ve arttıracak yolların araştırılmasını başlatmıştır (160,163-165). Tamir veya rejenere olan kıkırdağın, eklem dokusu olarak tatmin edici bir performans göstermesi için, sinovyal eklem normal ağrısız hareketi yeniden sağlanmalıdır. Bunun oluşması için de tamir dokusunun yapısı, kompozisyonu, mekanik özellikleri ve sağlamlığı doğal eklem yüzeyine benzer bir şekilde olmalıdır. Hasarlanan eklem kıkırdağı ya da kemik gibi organların da, uygun farmasötik taşıyıcılar kullanılarak kişilerden elde edilen otolog hücreler ile onarılması mümkündür (166, 167).

Hücre boyutta olan bu tarz tedavilerin ilk adımı, etkin ve sağlıklı olan hücreler elde edebilmektir. Hücre kültür aşamalarında, *in vitro* ortamda ya da *in vivo* deneyler öncesinde elde edilen hücrelerde, çoğalma (proliferasyon) veya farklılaşma (diferansiyasyon) için hücre kültür ortam içeriğine ilave edilen farmakolojik bileşenlerinin her birinin önemi giderek daha açık bir şekilde anlaşılmaktadır (168). Artiküler kıkırdağın devamlılığını kondrositler sağlar. Bu nedenle kıkırdak defektlerinin tamirinde farklılaşmış kondrositlerin kullanılması doğaldır (169). Otolog kondrosit implantasyonu, sağlam kıkırdaktan edinilen kondrositlerin ayrılması ve hücre kültürü ile üretilen hücrelerin, üzeri periost ile örtülmüş kıkırdak defektine enjekte edilmesi ile gerçekleştirilir. Periost ya da perikondrium implantasyonu bazı başarılı sonuçlar elde edilmişse de daha kaliteli bir kıkırdak elde edebilmek için yeni yöntem arayışına girilmiştir (170).

2.10.2. Kondrogenezi Etkileyen Faktörler

Organizmada, kondrositlerin fonksiyonu düzgün bir hormonal dengeye dayanmaktadır. Kıkırdak dokusunun gelişimine ve fonksiyonlarına etki eden bazı sitokinler ve büyüme faktörleri aşağıda açıklanmıştır.

Somatotropin: Kıkırdak büyümesi genel olarak hipofizden salgılanan büyüme hormonu somatotropine bağlıdır. Bu hormon, doğrudan doğruya kondrositleri etkilemez ancak karaciğerdeki somatomedin-C sentezini uyarır. Somatomedin-C (IGF-1) ise doğrudan kondrositleri etkileyerek büyümelerini kolaylaştırmaktadır (171).

C vitamini: Matriks üretimine özellikle kollajen üretimine uyarıcı etkisi vardır. Kollajenin yapısında bulunan hidroksilizin ve hidroksiprolin amino asitleri organizmada bu şekilde bulunmaz. Bu amino asitlerin hidroksilasyonu, sentezlenen kollajen peptidi minimum uzunluğa ulaştığında ve halen ribozomlara bağlı iken peptidil prolinhidroksilaz ve lizinhidroksilaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Askorbik asit (C vitamini) ise bu enzimlerin kofaktörü olarak görev almaktadır.

Trioksin ve Testosteron: Sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAG) sentezini hızlandırır.

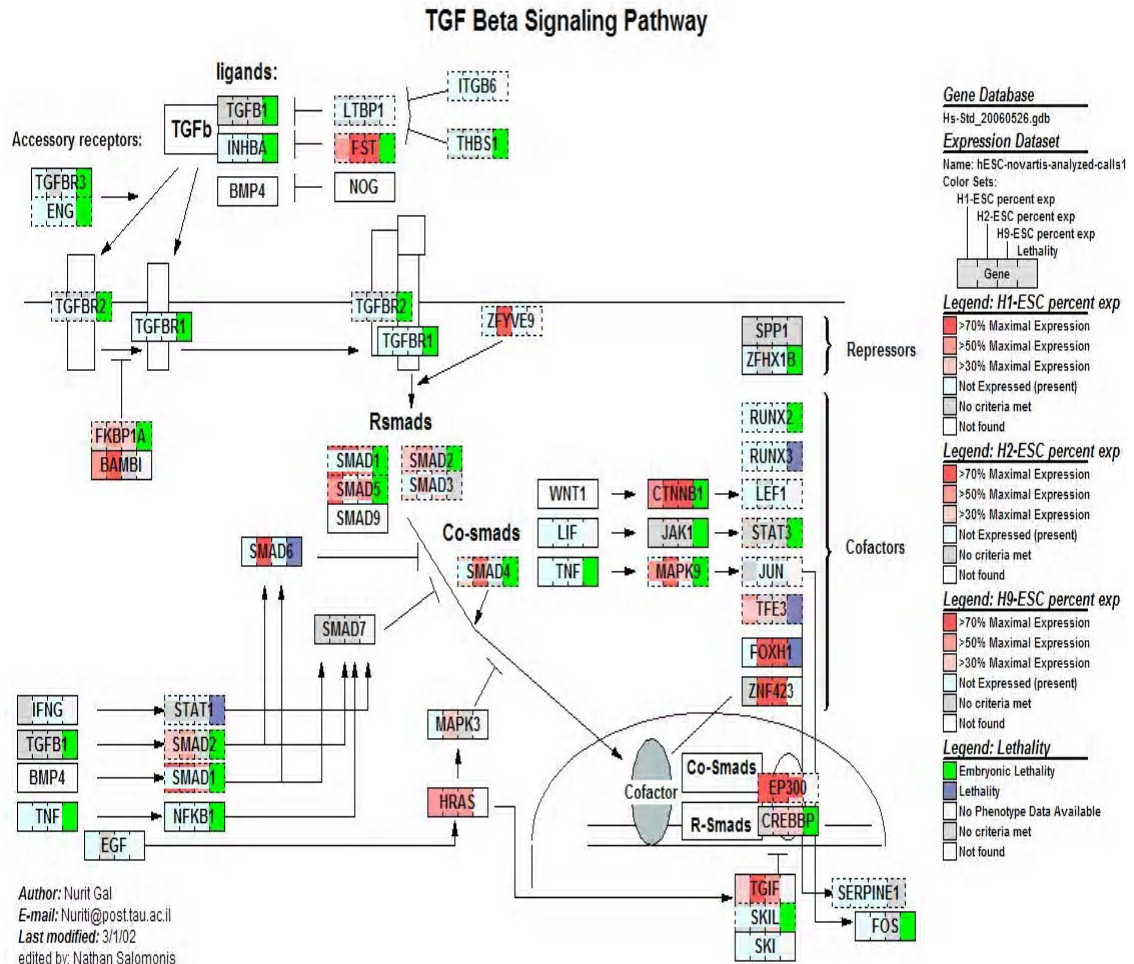
D vitamini: Kondrositlerin olgunlaşmasını ve matriks sentezini uyarır. Ancak kalsifikasyonu ve vasküler invazyonu da uyararak “hipertropik fenotipi” de destekler.

Estradiol: Sülfatlanmış GAG sentezini geciktirir. **FGF-2:** Kondrositlerin çoğalmasını uyarır. Hücrelerin, hipertropik fenotipe farklılaşmasında kuvvetli bir baskılayıcı faktördür (172).

TGF- β (Dönüştürücü büyüme faktörü): TGF- β 1, 25 kDa ağırlığında bir polipeptid büyüme faktörüdür ve kondrosit, osteoblast, osteoklast ve mezenkimal prekürsör hücreler gibi iskelet sistemine spesifik hücrelerin çeşitli tiplerinin proliferasyonunu düzenler. Lokal TGF- β 1 yapımı, kemik doku remodeling aşaması ile erken mezenkimal proliferasyon aşamasına kadar kırık onarımını düzenlemektedir. Yapısında kapiller içermeyen kıkırdak dokusu içerisinde bu uyarıcı moleküllerin bağlanarak fonksiyonlarını yapabilmesi ve matriks içerisinde depolanabilmesi için özel bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. *In vitro* kıkırdak hücre kültürlerinin başarılı olabilmesi için bazı şartların sağlanması gerekmektedir. Kıkırdak hücreleri, gelişmeleri ve fonksiyon gösterebilmeleri için bir zemine yapışma ihtiyacı duyan bağlanma bağımlı hücrelerdir. İzole edilmiş kondrositlerin *in vitro* kültür ortamına bağlanabilmesi için dışarıdan bazı

müdahaleler yapılabilmesine karşın bu aşamada yine bazı matriks molekülleri bu işlem için yardımcı olmaktadır. Bu tür matriks moleküllerinden fibronektin, laminin, vitronektin (VTN), tip-1 ve tip-4 kollajen polistiren doku kültür kaplarına yapışarak hücre eklenmesini, büyümeyi ve farklılaşmayı iletir.

VTN: *in vitro* olarak seruma yapışabilme yeteneğini; serum da doku kültür kabı ile polimerik biyomalzemelere yapışabilme yeteneğine sahiptir. İzole edilmiş kondrositler, kültür ortamına alındıklarında hemen kendi hücre dışı matrikslerini üretmeye başlamaktadır. Hücre dışı matrix moleküllerinden bazılarının üretimi ilk bir saat içerisinde tamamlanmaktadır. Bunlardan kollajen liflerinin üretiminin ilk dört saatte tamamlandığı gözlenmiştir. Hücreler bulundukları ortama uyum sağlayabilecek molekülleri sağlayarak, kendi organoid yapılarını üretmektedir.



Şekil 2.9. Kondrojenik farklılaşma için gerekli indükleyici ajanlar. Protein bazlı sitokin ve büyüme faktörleri; Hücre dışı matriks; Protein olmayan kimyasallar; Sıcaklık ve O₂ stresi gibi fizyolojik parametreler; Hücre yoğunluğu (149).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden kondrosit farklılaşması yaptığımız bu çalışmada, sırasıyla mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, mezenkimal kök hücrelerin kültürü, pasajlanması ve kondrojenik farklılaşma uygulamaları yapılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması, mikromas kültür tekniği kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (147). Bu yöntemde TGF- β (Dönüştürücü büyüme faktörü) kullanılarak, mezenkimal kök hücrelerin kondrosit hücrelerine farklılaşması sağlandı. TGF- β süper ailesi, çok sayıda büyüme faktörü içermektedir. Bunların içinden TGF- β 1 ve TGF- β 2 kondrositlerin olgunlaşmasını ve çoğalmasını uyarmaktadır.

3.1. Kullanılan Ekipman ve Gereçler

Demirbaş Ekipman Adı (Marka ve Modeli)

1. Tam Güvenlikli Laminar Air Flow Kabin (Telstar Bio II Advance)
2. CO₂'li İnkübatör (Sanyo – MCO-19AIC)
3. Su banyosu (Mettler WNB 10)
4. Vorteks (MRC SI-100)
5. İnverted mikroskop (Leica – DM-IL)
6. Santrifüj (HETTICH – UNIVERSAL 320R)

7. Hassas terazi (Shimadzu – AUX220)
8. Derin dondurucu (Panasonic – MDF-U5312)
9. Buzdolabı (Sanyo Biomedicool MPR-514)
10. Otomatik pipet (Eppendorf)
11. Şarjlı otomatik pipetleyici (Gilson Pipetman)

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

1. Kollejenaz Tip 1 (Gibco, 17100-017)
2. MesenPRO RS Medium (Gibco,12746-012)
3. StemPRO Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, A10071-01)
4. Penisilin/Streptomisin (Lonza, 17-602E)
5. Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, 03-031-1B)
6. Ham's F-10 (Biological Industries, 01-090-1B)
7. L-Glutamin (200mM, 1X) (Biological Industries, B103-020-1C)
8. L-glutamin (200 mM, 100X) (Gibco, 25030)
9. Tripsin EDTA (% 0.05 Tripsin/ 0.53 mM EDTA), (Wissant, 325-042)
10. Trypan mavisi (Trypan blue, % 0.5, Euroclone, ECM0990D)
11. Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, A5533)
12. Formaldehit (Merck)
13. Petri kabı (60 mm'lik plastik)
14. Petri kabı (100 mm'lik cam)
15. Serolojik pipet (10 ml'lik steril, Greiner bio-one)
16. Serolojik pipet (5 ml'lik steril, LP Italiana SPA)

3.3. Yöntem

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik-Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Polikliniğine estetik amaçlı veya fonksiyonel bozukluklar sebebiyle başvuran ve herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, 20-50 yaş aralığında 4 kadının yağ dokusu çalışmamız için

kullanılmıştır. Cerrahi girişimle yağ dokuları alınan kadın gönüllülerden, bilgilendirme sonrası yazılı onamları alınmıştır.

Çalışma için Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır (**Etik Kurul Karar No: 2012/627**).

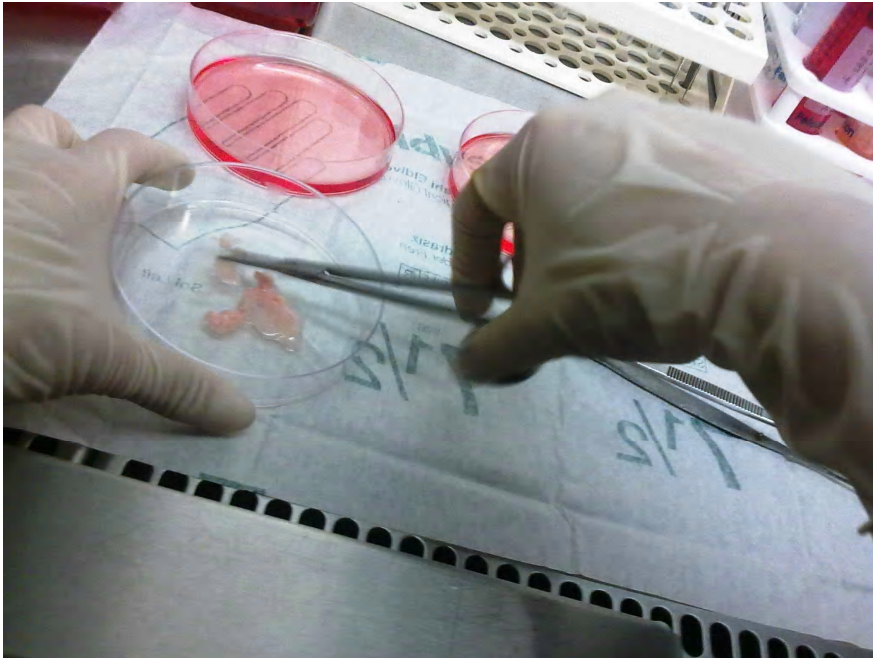
3.3.1. Kullanılan Solusyonların Hazırlığı

- 1. Kollejenaz Tip 1 Solusyonu (% 0.1):** Kollejenaz Tip 1 (Gibco, 17100-017), 50 mg tartıldı ve 50 ml PBS (with Ca^{++} Mg^{++}) içinde çözüldü. İçersine 1 ml (% 2 oranında) Penisilin/Streptomisin (Lonza, 17-602E) eklendi. Hazırlanan solusyon, 37 °C'de 10 dk çalkalamalı su banyosunda aktive edildi ve sonra 0.22 µm filtre ile süzüldü.
- 2. MesenPRO RS Medium:** 100 ml MesenPRO RS Basal Medium (Gibco, 12747-010) içersine 2 ml MesenPRO RS Growth supplement (Gibco,12748-018), 100 µl 2 mM L- glutamin (Gibco, 25030) ve 1 ml Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, 03-031-1B) eklenerek hazırlandı.
- 3. StemPRO Chondrogenesis Differentiation Medium** (Kondrojenik farklılaştırma medyum): 90 ml StemPRO Chondrocyte Differentiation Basal Medium (Gibco, A10069-01) içersine 10 ml StemPRO Chondrogenesis supplement (Gibco, A10064-01), ve 1 ml Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, 03-031-1B) eklenerek hazırlandı.
- 4. Alizarin Red S Solusyonu (% 2):** 2 gr Alizarin Red S tartıldı ve 100 ml distile su içersinde çözüldü. Amonyum hidroksit ile pH'ı 4.1-4.3'e ayarlandı.

3.3.2. Yağ Dokusundan Mezenkimal Hücre İzolasyonu Yöntemi:

1. Herbir kişi için yağ dokusu, her biri 2.5 ml Ham's F-10 medyum içeren 10 ml'lik iki kültür tüpüne alındı.
2. Yağ dokusu, % 2'lik Penisilin/Streptomisin içeren (Ca^{++} Mg^{++})'lu PBS ile yıkandı.
3. Yağ dokusu petri kabı içinde makas ve bisturi kullanılarak bağ dokulardan ayrıldı ve iyice parçalandı (Resim 3.1).
4. Üzerine 5 ml kollejenaz Tip 1 solusyonu eklenerek tekrar parçalandı ve 50 ml'lik 2 falkona aktarıldı.

5. 37 °C'lik su banyosunda 90 dk bekletildi. Arada bir elle çalkalandı.
6. Tüplerin üzerine 7.5 ml, % 2'lik Penisilin/Streptomisin içeren, (Ca⁺⁺ Mg⁺⁺)'lu PBS eklendi ve karıştırıldı.
7. Tüpler 1200 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
8. Santrifüjden sonra tüpün üst kısmında biriken yağ tabakası ve supernatant atıldı.
9. Tüplerin üzerine 7.5 ml % 2'lik Penisilin/Streptomisin içeren, (Ca⁺⁺ Mg⁺⁺)'lu PBS eklendi ve karıştırıldı.
10. Tüpler 1200 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
11. Santrifüjden sonra tüpün üst kısmında biriken yağ tabakası ve supernatant atıldı.
12. Tüplerin üzerine 7.5 ml % 2'lik Penisilin/Streptomisin içeren, (Ca⁺⁺ Mg⁺⁺)'lu PBS eklendi ve karıştırıldı.
13. Tüpler 1200 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
14. Süpernatantlar dikkatlice çekildi ve atıldı.
15. Kök hücrelerin bulunduğu pellet üzerine 6 ml MesenPRO RS Medyum eklendi.



Resim 3.1. Adipoz dokunun bağ dokulardan ayrılması ve parçalanması işlemi

3.3.3. Yağ Dokusundan Mezenkimal Hücre Kültürü Yöntemi:

1. Kök hücrelerin bulunduğu pellet üzerine 6 ml MesenPRO RS Medyum eklenmişti.
2. Hafif pipetaj yapılarak, 25 cm²'lik flasklara ekim yapıldı ve flasklar 37 °C %5 CO₂'lik inkübatöre kaldırıldı.
3. Ekimden bir gün sonra flasklar etüvden dikkatlice çıkarıldı.
4. Flaskların medyumunu değiştirmek için üzerindeki medyum pipetle çekilip atıldı.
5. Flaskların içerisine 6 ml MesenPRO RS Medium eklendi ve etüve kaldırıldı.
6. Flasklar 4 gün sonra kontrol edildiğinde, kök hücrelerin çoğaldığı ve tüm flaskı kapladığı (% 80-90 konfluent) görüldü.
7. Pasaj yapılmasına karar verildi.

3.3.4. Tripsinizasyon

1. Pasajlama için önce flasklardaki medyum çekildi ve atıldı. Flasklar iki kere 2 ml % 2'lik Penisilin/Streptomisin içeren, (Ca⁺⁺ Mg⁺⁺)'suz PBS ile yıkandı.
2. Flasklara 3 ml Tripsin EDTA konuldu. 37 °C %5 CO₂'lik inkübatörde 5-7 dk bekletildi.
3. Hafifçe yanlarına elle vurularak hücrelerin hareketlenmesi sağlandı.
4. İnverted mikroskopta bakıldı ve hücrelerin tabandan ayrılarak kalkmış olduğu gözlemlendi.
5. Tripsini inaktive etmek için her flaska 2 ml MesenPRO RS Medyum eklendi.
6. Hücre süspansiyonu 50 ml'lik falkon tüpe alındı ve 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı ve hücre pelletinin üzerine her flask için 5ml olacak şekilde 10 ml MesenPRO RS Medyum eklendi ve karıştırıldı.
8. Hücreler 2 flaska bölündü ve flasklardaki hücelere bakıldı. Flasklar 37 °C %5 CO₂'lik inkübatöre kaldırıldı.
9. İki gün sonra flasklarda yapışma ve çoğalmanın çok iyi olduğu gözlemlendi (% 80-90 konfluent).
10. Tekrar pasajlama yapıldı.

3.3.5. Hücre Canlılığı Testi

1. Pasajlama sırasında, hücre canlılığını test etmek için bir parça parafilm üzerinde 10 µl hücre süspansiyonu ve 10 µl trypan mavisini pipet ile karıştırıldı.
2. Karışımdan 10 µl hemositometreye yerleştirilir. Mikroskop yardımıyla 10x objektif kullanılarak canlı (boyayı absorbe etmemiş) ve cansız (boyayı absorbe etmiş) hücreler sayıldı (4 kare sayıldı).
3. Mililitredeki canlı ve ölü hücre sayısı;

$$\frac{\text{Total hücre sayısı} \times \text{Dilasyon oranı}}{\text{Kare Sayısı}} \times 10^4 = \text{Hücre sayısı / ml}$$

formülü kullanılarak bulundu.

1. Canlılık oranını belirlemek için ise aşağıdaki formülden yararlanıldı.

$$\frac{\text{Sayılan canlı hücre sayısı}}{\text{Sayılan toplam hücre s.}} \times 100 = \% \text{ Canlılık oranı}$$

3.3.6. Kondrojenik Farklılaştırma Yöntemi:

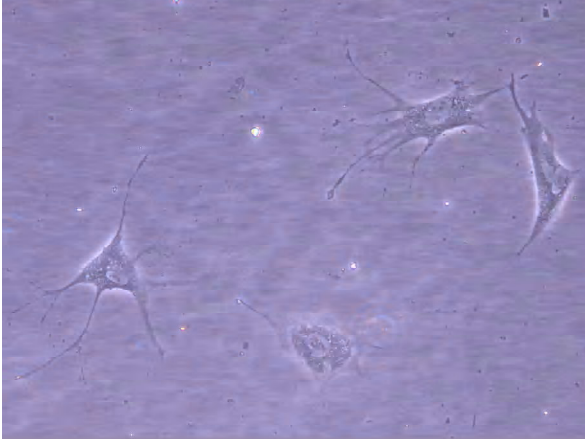
Kondrojenik farklılaştırma için mikromas kültür tekniği kullanıldı.

1. Kondrojenik farklılaştırma işlemi için, 3-4 pasajlamadan sonra, hücreler 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üzerindeki süpernatant dipte çok az hücre kalana kadar çekilip atıldı.
2. Otomatik pipetle (10 µl'lik), 60 mm'lik 2 petriye her petride 4 yere 4-6 kere 5 µl eklenerek damla oluşturacak şekilde konuldu (her damla 20-30 µl). 37 °C %5 CO₂'lik inkübatöre kaldırıldı.
3. Ertesi sabah yaklaşık 20 saat sonra peletlerin hafif kurumuş olduğu gözlemlendi.
4. Petrilere StemPRO kondrojenik farklılaştırma medyumundan 3.5ml eklendi. Hücre peletlerinden kalkan olmadı.
5. StemPRO kondrojenik farklılaştırma medyumu kullanılarak 3-4 günde bir petrilerin medyumu değiştirildi.

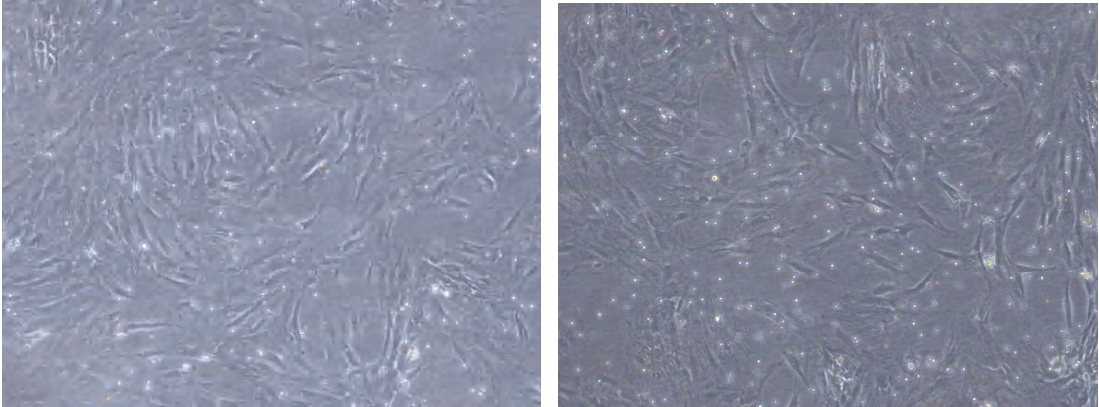
6. 15 gün gün sonra, oluşan kondrojenik pelletlerin Alizarin Red ile boyanmasına karar verildi.
7. Petrilerin medyumunu çekildi. Petrilere 1ml %10 luk formaldehit konuldu. 10 dk bekletildi. Formaldehit çekilerek, petriler iki kere 1 ml PBS (without Ca^{++} Mg^{++}) ile yıkandı. Dipte kalan sıvı otomatik pipetle çekildi.
8. Petrilere 1.5 ml Alizarin Red boyası eklendi. Karanlık ortamda 15 dk bekletildi.
9. Sonra boya çekildi ve petriler 2 kere distile su (1.0-1.5 ml) ile yıkandı.
10. Kondrojenik pelletlerin boyanması inverted mikroskopta kontrol edilerek, fotoğraflandı.

4. BULGULAR

Çalışmamız için, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Polikliniğine, herhangi bir sistemik hastalığı olmayan estetik amaçlı veya fonksiyonel bozukluklar sebebiyle başvuran, 4 kişiden bilgilendirilmiş onamları da imzalatılarak cerrahi girişim ile adipoz doku örnekleri alındı. Dokular saklama medyumunu Ham's F-10 medyum içerisinde GENKÖK Araştırma Laboratuvarı'na getirildi. Gereç ve Yöntem kısmında belirtildiği gibi mezenkimal kök hücre elde etmek için sırasıyla dokuyu yıkama, bistüri ile petri kabında parçalama işlemleri yapıldı. Hücreler kollejenaz tip 1 ilave edilerek, 90 dk bekletildi. Daha sonra, santrifüj edilerek dipteki hücre pelleti üzerine hazırladığımız MesenPRO RS Medyum eklendi. Her bir kişi için 2 flaska ekim yapıldı ve flasklar 37 °C %5 CO₂'lik inkübatöre kaldırıldı. Flasklarda üreme olup olmadığı bir gün sonra kontrol edildi ve medyum (MesenPRO RS Medyum ile) değişimi yapıldı. İnkübatöre bırakılan flasklar 4 gün sonra kontrol edildi. 4 gün sonra hücrelerin flask tabanına yapıştığı gözlemlendi (Resim 4.1). Yapışan hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu düşünüldü. Flow sitometri cihazında mezenkimal kök hücrelerin immunfenotipik karakterizasyonu yapılabilirdi ancak bu işlem için bütçemiz kısıtlıydı. Mezenkimal kök hücre kültürlerinde yüzde 80-90 yapışma olduğunda, hücreleri yapıştığı tabandan kaldırmak üzere tripsinizasyon işlemi yapılarak pasajlama işlemine geçildi (Resim 4.2). Hücre topluluğumuzda farklı hücreleri uzaklaştırmak ve mezenkimal kök hücrelerin stabilizasyonu için her bir doku örneği için 3 ve 4 pasajlama yapıldı.



Resim 4.1. Adipoz dokudan MKH izolasyonu sonucunda hücrelerin kültür ortamına alındığında tabana yapışan MKH'lerin mikroskopik görünümüleri (x 200)



Resim 4.2. Adipoz kaynaklı MKH'lerin, ikinci pasaj sonrası mikroskopik görünümüleri (x 100)

Her bir doku için pasajlama uygulamalarındaki son pasajlamada, hücreler trypan mavisi ile boyanıp canlı ve cansız (ölü) hücreler sayıldı. Gereç ve yöntem kısmında verilen formüller kullanılarak, her bir kişi için ml'deki hücre sayıları ve hücrelerin % canlılık oranları hesaplandı. Dört kişi için skorlanan hücre sayıları, ml'deki hücre sayıları ve hücrelerin % canlılık oranları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda adipoz kaynaklı MKH'lerin CD29, CD44, CD49, CD105, CD73, CD90 gibi yüzey beliteçleri ile tanımlanabilirdi. Ancak, proje bütçe imkanlarının kısıtlılığı nedeniyle bakılamadı.

Tablo 4.1. Dört kişinin skorlanan hücre sayısı, ml’de hücre sayıları ve hücrelerin canlılık oranları (%).

Kişiler	Total hücre sayısı	Canlı hücre sayısı	Cansız hücre sayısı	Hücre sayısı/ml	Hücrelerin % canlılık oranı
1	57	54	3	285.000	% 95
2	52	48	4	260.000	% 92
3	66	59	7	330.000	% 89
4	54	49	5	270.000	% 91

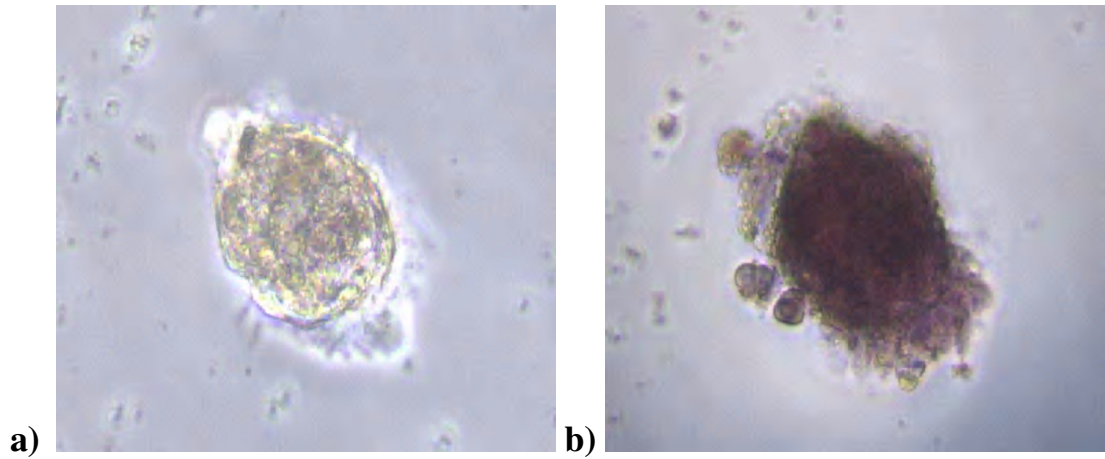
Mezenkimal kök hücrelerin kondrosit farklılaşması, 3. ya da 4. pasaj aşamasından sonra yapıldı. Pasaj sonrası hücreler santrifüj edildi. Kök hücrelerin farklılaştırma yöntemlerinden bir tanesi olan damla metodu ile dipteki hücre pelletleri, otomatik pipetle, 60 mm’lik 2 petriye her petride 4 yere damla oluşturacak şekilde konuldu (her damla 20-30 μ l). 37 °C %5 CO₂’lik inkübatöre kaldırıldı. Ertesi sabah yaklaşık 20 saat sonra peletlerin hala nemli olduğu gözlemlendi. StemPRO kondrojenik farklılaştırma medyumundan petrilere eklendi. Hücre peletlerinden kalkan olmadı. StemPRO kondrojenik farklılaştırma medyumunu kullanılarak 3-4 günde bir petrilerin medyumunu değiştirildi.

15 gün gün sonra, oluşan kondrojenik pelletlerin Alizarin Red ile boyanmasına karar verildi. Farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerinde ekstrasellüler kalsiyum depoları bulunmaz. Farklılaşmış kondrosit ve osteoblastlar ise ekstrasellüler kalsiyum depolarını içerirler. Böylece, kondrosit farklılaşmasına uğrayan mezenkimal kök hücreler Alizarin Red boyası ile parlak turuncu-kırmızı renge boyanırlar.

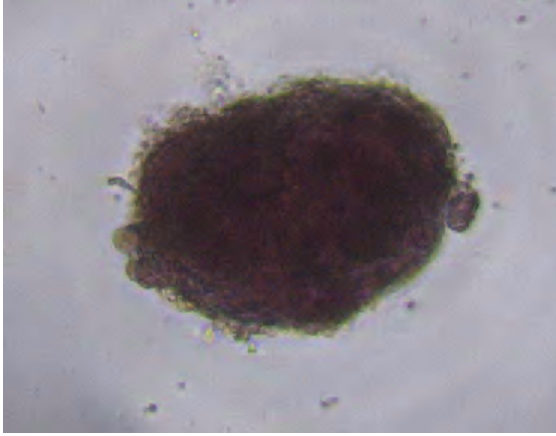
Kondrosit farklılaşmasına uğrayan mezenkimal kök hücreler ve pelletlerin Alcian blue ve Safranin-O gibi boyalarla da çok iyi sonuçlar elde edilebilirdi ve kondrositlerin varlığı

desteklenebilirdi. Ancak bütçe yetersizliği nedeniyle, uygulama için yalnızca Alizarin Red boyası kullanılmıştır.

Çalışmamızda kondrojenik pelletlerden iyi görünenler, boyanmadan önce inverted mikroskopta fotoğraflandı (Şekil 4.3). Petrilerin medyumunu çekildi. Petrilere 1ml formaldehit (%10'luk) eklendi. 10 dk bekletildi. Formaldehit çekilerek, petrilere iki kere 1 ml (Ca^{++} Mg^{++})'suz PBS ile yıkandı. Dipte kalan sıvı otomatik pipetle çekildi. Petrilere 1.5 ml Alizarin Red boyası eklendi. Karanlık ortamda 15 dk bekletildi. Sonra boya çekildi ve petrilere 2 kere distile su ile yıkandı. Kondrojenik pelletlerin boyanması inverted mikroskopta kontrol edildi ve fotoğrafları çekildi (Resim 4.3 ve 4.4).



Resim 4.3. Adipoz kaynaklı MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma medyumunda kültüre edilmesi sonucu oluşan kondrojenik pelletlerin Alizarin Red ile boyanmadan (a) ve Alizarin Red ile boyandıktan sonraki (b) görünimleri (x 100).



Resim 4.4. Adipoz kaynaklı MKH'lerin kondrojenik farklılaştırma medyumuna ile kültüre edilmesi sonucu oluşan kondrojenik pelletler (x100).

MKH'lerin *in vitro* kondrojenetik farklılaştırılması, TGF'nin varlığında mikro kütlelerin oluşumu ile karakterizedir (146). Kondrojenik farklılaşma mikromas kültür tekniği kullanılarak gerçekleştirilebilmiştir. Özetle, 8×10^7 hücre peleti kültür kabının ortasına küçük damlacık halinde konulur ve 37°C de 2 saat yapışmaları için beklendikten sonra hücreler, 6.25 mg/ml insulin, 10 mg/ml TGF- β 1, 50nM askorbat-2-fosfat, ve yüzde 1'lik antibiyotik/antimikotik içeren kültür medyumuna ile 2 hafta kültüre edilmiş. İki haftalık kültür sonrası kondrojenik farklılaşma kıkırdak matriksinde bulunan fosfatlı proteoglikanların Alizarin Red ile boyaması yapılarak histokimyasal olarak tespit edilmiştir. Farklılaşmanın başlangıç safhalarında kondrositler, tıpkı osteoblast farklılaşmasında olduğu gibi tip I kollajen sentezlemektedirler. Olgun kondrositler ise, karakteristik olan kollajen tip II ve IX sentezlerler. TGF- β , protein kinazlar aracılığıyla (ki bunlar; hücre-dışı sinyal düzenleyici kinaz 1, p38, protein kinaz A, protein kinaz C, Jun kinaz) kondrogenezi indüklemektedir (149)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mezenkimal stromal hücrelerin bağ doku hücrelerine farklılaşma potansiyeli bulunduğunun gösterilmesi, bu hücreleri iskelet sistemi bozuklukları tedavisinde kullanılabilecek önemli hücreler haline getirmiştir (114, 178). Kemik iliğindeki stromal hücrelerin kırıldak dahil olmak üzere birçok bağ dokusu hücresi oluşturma özelliği olduğu saptanmıştır (114, 179). Dekametazon kullanılarak yapılan kültürlerde 16. günde kondrosit nodülleri, 21. günde mineralize kemik nodülleri saptanmıştır (180). Mezenkimal kök hücre araştırmalarında bu hücrelerin multipotent özelliği, kültür koşullarında kolayca çoğaltılabilmeleri, doku onarımlarındaki ve gen tedavilerindeki potansiyelleri nedeniyle belirgin bir artış görülmektedir. Bu özelliklerinden ötürü MKH'lerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıptaki terapötik önemi gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. MKH'ler, birçok klinik tarafından bir dizi hastalıkta denenmektedirler. Özellikle, osteogenezis imperfecta (174) metakromatik lökodistrofi ve Hurler sendromlu hastalarda (175, 176) uygulamada ümit vaad edici sonuçlar ortaya çıkmıştır. Kök hücrelerin özelliklerinin tanımlanmasındaki hızlı gelişmeler, insan doku hücrelerinin, kök hücrelerinden farklılaştırılarak elde edilebileceği yönünde ümit vermektedir (177).

Mezenkimal stromal hücrelerin kaynağı olarak, en sık kemik iliği ve lipoaspirasyon materyalleri kullanılmaktadır. Yağ dokusu da kemik iliği gibi embriyonik mezodermden

oluşur ve bir stroma içerir. Lipoaspirattan kısa süreli kollejenaz muamelesi ve santrifüj ile kolay elde edilmesi nedeniyle ilgi çekmektedir, elde edilen ürüne processed lipoaspirate (PLA) denilir. PLA'lar uygun stimuluslarla osteojenik, adipojenik, myojenik ve kondrojenik hücelere farklılaşır ve o diziye özel gen ve proteinleri içerir, bu da kök hücre fenotipini teyit eder. Bu nedenle bu doku mezodermal doku tamirinde kullanılabilir. Aspiratla elde edilen PLA fraksiyonu fibroblastik, endotelial hüceler, makrofaj ve düz kas hüceleri gibi heterojen bir grubu içerir, seri pasajlarla MKH'lere benzeyen homojen fibroblastik bir popülasyon kalır. Bu geri kalan grubun % 80'inin vimentin ve fibroblastik marker AS02 ekspresyonu göstermesi ile bu grubun MKH olduğu anlaşılır. Uzun süreli kültürlerle PLA'ların büyüme kinetikleri ve diferansiyasyon kapasiteleri değişmez. Hücre yüzey markerları kemik iliği kaynaklı MKH'lere benzer. Her ikisi de Stro-1, SH-3 içerirler, her ikisi de hematopoetik marker olan CD31 ve CD45 içermez. İn vitro kültürle CD34 gittikçe azalır. CD105/endoglin - transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β reseptör tip III MKH'ların TGF- β bağımlı kondrojenik diferansiyasyonunu gösterir. Böylece PLA ve MKH aynı hücre tipinin varyantları olarak bilinir (181). Adipoz dokudaki stromal hüceler, aralarında daha az farklılaşmış oldukları düşünülen stromal-damarsal hücelerin de olduğu, olgunlaşmanın çeşitli aşamalarındaki adiposit öncüllerini içerir. İn vivo ortamdaki stromal-damarsal hüceleri, soğuk aklimasyon esnasında ve kalori aşımı sonrasında çoğalmak ve olgun adipositlere farklılaşmak üzere uyarılırlar. Hem stromal-damarsal hüceleri hem de kemik iliği kökenli mezenkimal öncül hüceler, glukokortikoidlerin, insulin ve insülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF-1) verilmesi yoluyla adipositlere farklılaşma yönünde uyarılabilirler. Dolayısıyla stromal-damarsal hüceleri adipositlere ve kıkırdak hücelerine farklılaşabilen, en azından iki yönlü farklılaşma potansiyeli sergileyen ve yağ dokusunda yerleşik vaziyette bulunan mezenkimal öncül hücre grubudur. Yağ dokusundaki öncül hüceler tarafından sergilenen yaygın farklılaşma potansiyeline ilişkin ek bulgular, kemik iliği yağından izole edilen klonlanmış hücelerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilmiştir (144).

Adipoz dokudan MKH eldesi, kemik iliğine göre daha kolay, daha az invazif ve daha yüksek verimle ve az miktarda dokudan çok sayıda kökhücre elde edilebildiğinden dolayı

son yıllarda sıklıkla tercih edilmektedir (119, 182, 183). Yapılan bazı çalışmalarda adipoz doku kaynaklı MKH ile kemik iliği kaynaklı MKH'leri analiz etmişler ve aynı hastadan aynı koşullar altında alınan MKH'lerin kemik iliği kaynaklı olanının, kondrojenik farklılaşma yeteneğinin daha büyük olduğu gösterilmiştir (184). Bununla birlikte, 2003 yılında Winter ve arkadaşları, adipoz doku kaynaklı MKH ile kemik iliği kaynaklı MKH arasında farklılaşma yeteneği açısından belirgin şekilde fark olmadığını göstermiştir (185). Son dönemde yağ dokusu içinde, adipositler arasında SSEA-3 (Stage specific embriyonic antigen) olarak tanımlanan ve diğer adipoz kökenli kök hücrelerden farklı yeni multipotent master hücre türü keşfedilmiştir (186). Bu bilgi, biri yağ dokusu içinde lokalize ve sadece acil durumlarda aktive olan multipotent kök hücrelerin varlığını, diğeri ise kapillerler çevresinde yerleşen ve dokunun fizyolojik dönüşümünü düzenleyen progenitor hücrelerin varlığını ortaya koyması bakımından önemlidir. 150 cc yağda 1 milyon uykuda kök hücre yer alır. Araştırmalar gösteriyor ki aynı miktardaki kemik iliğinin 1.000 katı kadar kök hücre anlamına gelmektedir.

Kıkırdak doku mühendisliği alanında, adipoz kökenli ya da kemik iliği kökenli hangi mezenkimal kök hücrelerin kondrositler için iyi kaynak olduğu konusunda hala tartışmalar sürmektedir (176, 186). Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin izolasyonunda ise, adipoz doku kaynağı olarak genellikle lipoaspiratlar tercih edilse de, küçük boyuttaki adipoz doku biyopsilerinden yüksek verimle adipoz doku kaynaklı MKH elde edilebildiği bilinmektedir (182).

Çalışmamızda, cerrahi yöntemle alınan adipoz dokudan MKH izolasyonu yapılmıştır. *In vitro* kültür ortamında çoğaltılan adipoz doku kaynaklı MKH'lerin, kondrosite farklılaşması için kültür ortamı TGF- β ile uyarıldı. Kalsiyum depozitlerini oluşturan kondrosit hücreleri Alizarin red boyası ile boyanarak gösterildi. Bu amaçla farklı yöntemler kullanılmaktadır (187). Adipoz doku kaynaklı MKH'lerin farklılaştırma yöntemi olarak, mikromas tekniği ile kondrosit farklılaştırılması yöntemi kullanılmıştır (188). Bulgularımız Danišovič ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyum göstermektedir.

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle yaptığımız bu farklılaşma potansiyelini belirlemeye yönelik çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, literatürdeki benzer çalışmalarla genel olarak bir uyum göstermektedir. Zuk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada adipoz dokudan elde edilen MKH'lerin özellikle estetik cerrahide yağ doku kökenli kök hücre çok kullanılsa da giderek diğer alanlara yayılma potansiyeline sahip olduğu ortaya konulmuştur (119). MKH'lerin in-vitro farklılaştırma koşullarında kondrojenik farklılaşma yeteneğine sahip oldukları çalışmamızda ortaya konmuştur. Minguell ve arkadaşları stromal-damarsal hücreleri, adipositlere ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilen, en azından iki yönlü farklılaşma potansiyeli sergileyen ve yağ dokusunda yerleşik vaziyette bulunan mezenkimal öncül hücre grubudur. Yağ dokusundaki öncül hücreler tarafından sergilenen yaygın farklılaşma potansiyeline ilişkin ek bulgular, kemik iliğinden izole edilen klonlanmış hücrelerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilmiştir (144). Çeşitli çalışmalarda MKH'lerin TGF- β bağımlı kondrojenik farklılaşması gösterilmiştir (117, 178, 146). Çalışmamızda da TGF- β içeren hazır StemPRO kondrojenik farklılaştırma medyumunu kullanarak, adipoz doku kökenli MKH'lerin 3. ve 4. pasajlamadan sonra kondrositlere farklılaştığı gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara ve Fukumoto ve arkadaşlarının (117) çalışmasına dayanarak, mezenkimal kök hücrelerin kültür örneklerinin sadece ileri pasajlamalarda kondrojenik farklılaşmaya uğrayabildikleri sonucu çıkarılabilir.

Osteoblast ve kondroblastlar, ortopedide yeni üretilen biyomalzemelerin biyolojik etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır (189). Doku hasarlarının giderilmesi için hücrelerin eriyebilen polimer kalıplar üzerinde hasarlı bölgeye nakledilerek, yenileyici olarak kullanılması hedeftir. MKH'ler, özellikle bağ doku kökenli hücrelere kolayca farklılaşma özelliğinden dolayı kemik, kıkırdak defektleri onarımı için uygun gözükmektedir (154).

Deneylerde *in vitro* ortamda elde edilen bu bulgular, MKH'lerin *in vivo* ortamda da farklılaşabileceğini düşündürmektedir. Farklılaşma için gerekli uyarı, organizmanın hasarlı bölgesinin yakın çevresinden salınan çözünür faktörlerden sağlanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, hasarlı dokulardan salınan kemokin, sitokin ve diğer çözünür faktörlerin kök

hücrelerin göçü, çoğalması ve ihtiyaç olan yönde farklılaşmasında rol oynayabileceği öne sürülmektedir (190, 191).

Sunulan çalışmada, MKH popülasyonuna ait hücrelerin adipoz dokuda bulunduğu ve GENKÖK Araştırma Merkezi laboratuvarımızda elde edilebileceği gösterildi. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, diğer kaynaklara göre daha az karakterizasyon çalışması yapılmaktadır. Adipoz kaynaklı MKH'lerin, kondrosit hücrelerine farklılaşabildikleri çalışmamızda gösterilmiştir. Kondrosit hücreleri rejeneratif amaçlı kullanılmak üzere öncelikli olarak eklem bölgelerinde ve diğer kırık dokularda (burun, kulak, vb.) doku mühendisliğinde kullanılmak üzere yeni bir hücre kaynağı olabileceği bilgisi literatüre sağlanan diğer bir katkıdır.

Adipoz kaynaklı MKH'ler ortopedide ve spor hekimliğinde kemik, kırık dokuları gibi hasarlı dokuların tamirinde, plastik ve rekonstrüktif cerrahide yumuşak doku hacimlendirilmesinde ve kulak, burun gibi kırık dokuların üç boyutlu (3B) üretimi amacıyla kullanılabilir. Hedef doku veya organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek kadar sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabilir. Kök hücreler, bu amaca hizmet edebilecek yani hücre tabanlı tedavide kullanılabilecek başlıca unsur olarak görünmektedir. Geleceğin hücre tabanlı tedavilerinde, 3B biyo-yazıcı ile hastanın kendi normal hücreleri ile kök hücrelerini biyo-mürekkep olarak kullanılarak, ihtiyaç duyulan doku hatta organlarının birebir kopyasını üretebilmek mümkün olabilecektir.

Mezenkimal kök hücrelerle yürütülen az sayıda klinik uygulama, bu hücrelerin güvenilirliği yönünden ümit vericidir. Ancak bu hücrelerin rejeneratif tıp amaçlı kullanımı için yeterince deneyim kazanılması gerektiğine işaret ediyor. Öyle görünüyor ki; kök hücrelerle ilgili moleküler mekanizmalar ortaya kondukça ve deneyim kazanıldıkça, mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımları daha güvenli ve daha yaygın hale gelecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Scholer HR. The Potential of Stem Cells: An Inventory. İn: Knoepffler N, Schipanski D, Sorgner SL.(eds) Humanbiotechnology as Social Challenge. Ashgate Publishing 2007; pp 27-53.
2. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol 2007; 213: 341-7.
3. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells 2001; 19: 193–204.
4. Bayık M. Kök Hücre: Yaşamın Kaynağı, I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongre Kitabı 2004; ss 13-23.
5. Cauffman G. Rycke M. Sermon K. Liebaers I. Velde H. Markers that define stemness in ESC are unable to identify the totipotent cells in human preimplantation embryos, Human Reproduction 2009; 24: 63-70.
6. Molofsky AV. Parda R. Morrison JS. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal, Current Opinion in Cell Biology 2004; 16: 700-707.
7. Willnut P. Essentials of Stem Cell Biology, Elsevier Publishing 2009; 166:186-195
8. Pittenger MF. Mackay AM. Beck SC. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. Science 1999; 284:143-147.

9. Web (2014) biyolojisesi kok_hucre_ve_telomeraz.html
http://www.biyolojisesi.net/tum%20uniteler/biyoteknoloji/biyoteknoloji_ve_genetik_muhendisligi_dosyalar131/kok_hucre.jpg (13.11.2014)
10. Cavaleri F. Scholer HR. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 2003; 113: 551–552.
11. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Çev. Ed.: Prof. Dr. Ramazan Demir, 2006; ss 87
12. Weissman IL Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. *Science* 2000; 287:1442-1446.
13. Thore CB. Sudheer S. Janke D. et al. The Origins of Human Embryonic Stem Cells: A Biological Conundrum. *Cells Tissues Organs* 2008; 188: 9–22.
14. Chapman R. Frankel MS. Garfinkel MS. Stem cell research and applications: Monitoring the frontiers of biomedical research. Produced by The American Association for the Advancement of Science and Institute for Civil Society 1999;34:405–416.
15. Kansu E. Kök Hücre Biyolojisi ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36:191-197.
16. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspec Med* 2001; 22: 149–164.
17. Web: (2014) kemikiligi.org Kök Hücre Nedir?
http://www.kemikiligi.org/icerik.php?id=117&alt_id=137&tab=0, (13.11.2014. 2014).
18. Whittaker PA. Therapeutic cloning: The ethical limits. *Toxic Appl Pharmacol* 2005; 270:689–691.
19. Ulloa-Montoya F. Verfaillie CM. Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2005;100: 12–27.
20. Web: (2013) Mediplatform.com http://mediplatform.com/wp-content/uploads/2013/07/PluripotentStemCells_tr.jpg (13.11.2014).
21. Holtzer H. Weintraub H. Mayne R. Mochan B. The cell cycle, cell lineage, and cell differentiation. *Dev Biol* 1972;7:229–256.
22. Web: 13.11.2014. www. Mediplatform.com http://mediplatform.com/wp-content/uploads/2013/07/MultipotentStemCells_tr.jpg Erişim: 13.11.2014.

23. Wilmut I. Schnieke AE. McWhir J. Kind AJ. Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;386: 200.
24. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-168.
25. Shufaro Y. Reubinoff BE. Therapeutic applications of embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:909-27.
26. Odorico JS. Kaufman DS. Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193–204.
27. Moon SY. Park YB. Kim DS. Oh SK. Kim DW. Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications. *Mol Ther* 2006;13: 5–14
28. Okarma TB. Human primordial stem cells. *Hastings Cent Rep* 1999; 29: 30.
29. Web(2014) www.egitimkutuphanesi.com Erişim: 13 Kasım 2014. 06.02.2014. <http://www.egitimkutuphanesi.com/kok-hucre-stem-cell-nedir-kok-hucre-turleri-embriyonik-kok-hucreler-fetal-kok-hucreler-embriyonik-korsinoma-hucreleri-yetiskin-kok-hucreler-embriyonik-kok-hucreler-ve-potansiyel-uygulama-alanlari/>
30. Shambloott MJ. Axelman J. Wang S. et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Dev Biol* 1998; 95:13726,31.
31. De Coppi P. Barstch G. Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biothechnology* 2007; 25: 100–106.
32. Schwab KE. Chan RWS. Gargett CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2005;84:1124–1130.
33. Vats A. Bielby RC. Tolley NS. Nerem R. Polak JM. Stem cells. *Lancet* 2005;366:592–602.
34. Grove JE. Bruscia E. Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cell* 2004; 22: 487–500.
35. Masson S. Harrison DJ. Plevris JN. Newsome PN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: A critical review. *Stem Cell* 2004;22:897–907.

36. Cuneo S. Rangel R. Ruvalcaba L. et al. Stem cells from umbilical cord blood as a source for future genetic and therapeutic uses in patients from IVF donation programs. *International Congress Series* 2004;1271:167–170.
37. Mayani H. Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cell* 1998;16:153–165.
38. Lisker R. Ethical and Legal Issues in Therapeutic Cloning and the Study of Stem Cells. *Arch Med Res* 2003;34:607–611.
39. Gardner RL. Stem cells: potency, plasticity and public perception. *Journal of Anatomy* 2002;200: 277–82.
40. Takahashi K. Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
41. "Making human embryonic stem cells", *The Economist*. 2007;11-22.
42. Yu J. Vodyanik MA. Smuga-Otto K. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318: 1917-1920.
43. Gurdon JB. Melton DA. Nuclear reprogramming in cells. *Science* 2008;322:1811-1815.
44. Stewart S. *Stem Cells Handbook*. Humana Press. 2004, pp 1-18 S. 143.
45. Becker AJ. McCulloch EA. Till JE. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* 1963;197: 452-4.
46. Siminovitch L. McCulloch EA. Till JE. The Distribution of Colony-forming Cells Among Spleen Colonies. *Journal Of Cellular And Comparative Physiology* 1963; 62 :327-360
47. Tèrese M. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 231-238.
48. Friedenstein AJ. Deriglasova UF. Kulagina NN. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 1974; 2: 83-92.
49. Friedenstein AJ. Gorskaja JF. Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4: 267-74.

50. Thomson JA. Kalishman J. Golos TG. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 7844-7848.
51. Thore CB. Sudheer S. Janke D. et al. The Origins of Human Embryonic Stem Cells: Biological Conundrum. *Cells Tissues Organs* 2008; 188: 9–22.
52. Jadon G. Diwaker A. Bhadauria R. Joshi S. A Review on Embryonic Stem cell Information. *International Journal of Advanced Research in Pharmatuccutical & Bio sciences* 2012; 2:165-178.
53. Watt, S.M. Stem cell plashcity. *British Journal of Hemat.* 2003; 122:877-891
54. Çetiner M. Hücresel Tedaviler Tarihi ve Süreyya Tahsin Aygün. 2. Ulusal Kök Hücre Kongresi Program ve Özet Kitabı, Trabzon 2006; 29-34.
55. Dinçer, F. Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün Hayatı ve Bilimsel Çalışmaları. A. Ü. Vet. Fak. Dergisi 1982; 29: 256-276.
56. Karaöz E. Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. *Sağlıkta Birikim Dergisi* 2009; 1; 81-114
57. Gage FH. Cell therapy. *Nature* 1998; 392: 18-24
58. Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KOGEM) Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kurs Kitabı. 2012; 324: ss 58-76.
59. Karaöz E. Ovalı E. Kök Hücreler. *Atı Teknoloji Yayınları*, Yayın no:1 Trabzon 2004; ss:17-63
60. Kobayashi N. Yasu T. Ueba H. et al. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp Hematol* 2004; 32: 1238-1245.
61. Lee IC. Wang JH. Lee YT. Young TH. The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 5; 352: 147-152.
62. Wei S. Kitaura H. Zhou P. Ross FP. Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2005; 115(2): 282-290.

63. Koyanagi M. Haendeler J. Badorff C. et al. Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of human circulating progenitor cells to cardiomyogenic cells. *J Biol Chem* 2005 29; 280: 16838-16842.
64. Liu N, Lu M, Tian X, Han Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 2007;211:279-86. Review.
65. Liang X. So YH. Cui J. et al. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells. *J Radiat Res* 2011;52 :380-386.
66. Gu Y. Xue C. Zhu J. et al. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Facilitates Differentiation of Adult Dorsal Root Ganglia-Derived Neural Stem Cells Toward Schwann Cells by Binding to FGFR-1 Through MAPK/ERK Activation. *J Mol Neurosci* 2014;52 :538-551.
67. Huang W. Xiao DZ. Wang Y. et al. Fn14 promotes differentiation of human mesenchymal stem cells into heart valvular interstitial cells by phenotypic characterization. *J Cell Physiol* 2014;229:580-587.
68. Gonzales-Roybal G, Lim DA. Chromatin-based epigenetics of adult subventricular zone neural stem cells. *Front Genet* 2013;4:194.
69. Zhang J. Tam WL. Tong GQ. et al. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nature* 2006;10:1114-1123
70. Takahashi K. Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126 : 663–676.
71. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010 : 1035–41.
72. Zych J. Stimamiglio MA. Senegaglia AC. et al. The epigenetic modifiers 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A influence adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2013;46:405-416.
73. Hasegawa K. Namekawa SH. Saga Y. MEK/ERK signaling directly and indirectly contributes to the cyclical self-renewal of spermatogonial stem cells. *Stem Cells* 2013;31:2517-2527.

74. Voskas D. Ling LS. Woodgett JR. Signals Controlling Un-Differentiated States in Embryonic Stem and Cancer Cells: Role of the Phosphatidylinositol 3' Kinase Pathway. *J Cell Physiol* 2014;229 :1312-22
75. Moore K. Lemischka I. Stem cells and their Niches. *Science* 2006; 311: 1880-1885.
76. Smith GA. Heart KJ. Donaldson DD. et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336:688-690.
77. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001 Nov;414, 98-104.
78. Ural, AU. Kök Hücreler. *TOTBİD Dergisi* 2006; 5:140-145.
79. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4:7–25.
80. Ural AU. “Hematopoetik Kök Hücre” 7. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi 2012;ss. 232
81. Vallier L. Alexander M. Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*. 2005; 118:4495-4509.
82. Nagy A. Rossant J. Nagy R. Abramow-Newerly W Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Developmental Biology* 1993; 90:8424-8428
83. Valtieri M. Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *Journal of Cellular Physiology* 2008;217:296-300.
84. Arai F. Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Annals of New York Academy of Science* 2007;1106:41-53.
85. Metcalf D. Concise review: Hematopoietic stem cells and tissue stem cells: Current concepts and unanswered questions. *Stem Cells* 2007;25:2390-2395.
86. Kobayashi N. Yasu T. Ueba H. et al. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow Stromal cells. *Exp Hematol* 2004; 32: 1238-1245.
87. Fang TC. Poulosom R. Cell-based therapies for birth defects: A role for adult stem cell plasticity? *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69: 238-249.

88. Ross MH. Romrell LJ. Kaye GI. Histology A Text and Atlas, Third Edition, Williams and Wilkins International Edition, 1995;
89. Williams PL. Bannister LH. Berry MM. Gray's Anatomy Ed. by LH Bannister and M Dyson, Thirty-Eighth Edition, New York: Churcill Livingstone Inc, 1995.
90. McGee JOD. Isaacson PG. and Wright NA. Oxford Textbook of Pathology. Oxford University Press, 1992
91. Vermeulen K. VanBockstaele DR. Berneman ZN. The cell cycle : A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif 2003; 36: 131-49.
92. Vermeulen K. Berneman ZN. vanBockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. Cell Prolif 2003; 36: 165-75.
93. Bellamy COC. p53 and apoptosis. Br Med Bull 1996; 53: 522-38.
94. Lodish H. Berk A. Zipursky SL. et al. Molecular Cell Biology. 4th edition: WH Freeman and Co. New York 2000: pp.1084
95. Web: (2014) wikipedia.org, Cell cycle. http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle (13.11.2014)
96. Gagliardi A. Mullin NP. Tan ZY. et al. A direct physical interaction between nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. EMBO J 2013;32;2231-2247.
97. Robanus-Maandag E. Dekker M. Van Der Valk M. et al. p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. Genes Dev 1998;12:1599-1609.
98. Savatier P. Lapillonne H. Van Grunsven LA. Rudkin BB. Samarut J. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. Oncogene 1996;12:309-322.
99. Niwa H. Burdon T. Chambers I. Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. Genes Dev 1998;12:2048-2060.
100. Matsuda T. Nakamura T. Nakao K. et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. EMBO J 1999; 18: 4261-4269.
101. Paling NRD. Wheadon H. Bone HK. Welham MJ. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. J Biol Chem 2004;

- 279: 48063-48070.
102. Kunath T. Saba-El-Leil MK. Almousailleakh M. et al. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 2007; 134: 2895-2902.
 103. Chen JD. Xu FF. Zhu H. et al. ICAM-1 Regulates Differentiation of MKH to Adipocytes via Activating MAPK Pathway. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2014; 22: 160-165.
 104. Chan JKC. NG CS. Hui PKA simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology* 1988;12: 461–480.
 105. Chen ZX. Chang M. Peng YL. et al. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes: *Regul Pept.* 2007; 142:16-23.
 106. Pansky A. Roitzheim B. Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab* 2007; 53: 81-84.
 107. Alberts B. Johnson A. Julian L. Raff M. Roberts K. Hücrenin Moleküler Biyolojisi TÜBA Dördüncü Baskı, Ankara. 2008; 1530: 301-302
 108. Sensebe L. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Bio-Med Mat Eng* 2008; 18:3-10.
 109. Owen M. Friedenstein AJ. Stromal Stem Cells: Marrow Derived Osteogenic Precursors *Ciba Found Symp.* 1988; 136: 42-60.
 110. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9 641–650.
 111. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human bone marrow. *Bone* 1992;13: 81–88
 112. Wang JS. Shum-Tim D. Galipeau J. Et al. Marrow Stromal Cells For Cellular Cardiomyoplasty: Feasibility And Potential Clinical Advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:999-1006.
 113. Orlic D. Kajstura J. Chimenti S. Bone Marrow Cells Regenerate Infarcted Myocardium. *Nature* 2001; 410:701-705.

114. Dominici M. Le Blanc K. Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
115. Horwitz EM. Le Blanc K. Dominici M. et al. Clarification Of The Nomenclature For MSC: The International Society For Cellular Therapy Position Statement *Cytotherapy* 2005;7:393-5.
116. Tsai MS. Lee JL. Chang YJ. Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004;19:1450-6.
117. Fukumoto T. Sperling JW. Sanyal A. et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:55–64.
118. Zuk Pa. Zhu M. Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.
119. Zuk Pa. Zhu M. Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–4295.
120. De Bari C. Dell'accio F. Tylzanowski P. Luyten Fp. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928–42.67.
121. Cao B. Zheng B. Jankowski R. et al. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* 2003;5:640–6.64.
122. Sale GE. Storb R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoetic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 1983;11:961-6.
123. Web: (2014) kocaeli.edu.tr (<http://www.kocaeli.edu.tr/universitemizden-haberler.php?Haber=107>, (13.11.2014).
124. Chanda D. Kumar S. Ponnazhagan S. Therapeutic Potential of Adult Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Diseases of the Skeleton. *J Cell Bioc* 2010; 111:249-57.
125. Ding DC. Shyu WC. Lin SZ. Mesenchymal Stem Cells, *Cell Transplantation* 2011; 20: 5-14.

126. Salem HK. Thiernemann C. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells* 2010; 28:585–596.
127. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 2000;287:1442-1446.
128. Parekkadan B. Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2010; 12: 87–117.
129. Patel DM. Shah J. Srivastava AS. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells International* 2013; 2:4-8
130. Hibi H. Yamada Y. Ueda M. Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:551-5.
131. Kassem M. Kristaensen M. Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic and Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95: 209-14.
132. Ozawa K. Sato K. Oh I. et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun* 2008 ;30:121-7.
133. Le Blanc K. Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience *J Intern Med* 2007; 262: 509–525.
134. Brooke G. Cook M. Blair C. et al. Therapeutic application of mesenchymal stromal cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007;18: 846–858.
135. Pelagiadis I. Dimitriou H. Kalmanti M. Biologic characteristics of mesenchymal stromal cells and their clinical applications in pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30: 301–309
136. Wynn RF. Hart CA. Corradi-Perini C. et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004 :1;104:2643-5.
137. Lepperdinger G. Brunauer R. Jamnig A. Laschober G. Kassem M. Controversial issue: Is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell based therapies? *Exp Gerontol* 2008; 134-189
138. Bernardo ME. Avanzini MA. Perotti C. et al. Optimisation of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell therapy approaches: further

- insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* 2007; 211: 121–130
139. Miura M. Miura Y. Padilla-Nash HM. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006;24:1095–1103.
 140. Bernardo ME. Zaffaroni N. Novara F. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long term in-vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007; 67: 9142–9149.
 141. Zhu, M. et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 267–274
 142. Ovalı E. Türk Hematoloji Derneği. Mezenkimal Kök Hücre Kursu Notları Antalya, 2008; ss.17-20
 143. Irigaray P. Newby J.A. Lacomme S. et al. Overweight/Obesity And Cancer Genesis: More Than A Biological Link. *Biomed Pharmacother* 2007; 61:665-678.
 144. Minguell JJ. Erices A. Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Exp Bio Med* 2001; 226: 507-520.
 145. Masuoka K. Asazuma T. Hattori H. Tissue Engineering Of Artikuler Cartilage With Autologus Cultured Adipose Tissue- derived Stromal Cells Using Atelocollagen Honeycomb-shaped Scaffold With A Membrane Sealing İn Rabbits. *J Biomed Mater Res. B Appl biomater* 2006 :79: 25-34.
 146. Tuli R. Tuli S. Nandi S. et al. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and signaling cross-talk. *J Biol Chem* 2003;278: 41227-41236.
 147. Zhang L. Su P. Xu C. et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett* 2010;32:1339-46.
 148. Gou Z. Li Z. Li X. İn vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *Stem Cell* 2006;24:992-1000.

149. Li L. Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 605-631.
150. Wang D. Park JS. Chu SJF. et al. Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor β 1 stimulation. *J Biol Chem*. 2004;279:43725-43734.
151. Saris DBF. Joint Homeostasis in Tissue Engineering for Cartilage Repair. Utrecht 2002;197
152. Ceuninck F. Sabatini M. Pastoureaux P. Cartilage and Osteoarthritis, *Methods in Molecular Medicine*. Humana Press 2004: 127-152
153. Francis Suh JK. Matthew HWT. Application of chitosanbased polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000;21:2589-2598.
154. Martin KL. Otsuki S. Grogan PS. et al. Cartilage cell clusters. *Arthritis Rheum* 2010;62: 2206–2218.
155. Vinatier C. Bouffi C. Merceron C. et al. Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009;4:318–329.
156. Cameron TL. Belluoccio D. Farlie PG. Brachvogel B. Bateman JF. Global comparative transcriptome analysis of cartilage formation in vivo. *BMC Developmental Biology* 2009; 9:1-17.
157. Hollander AP. Dickinson SC. Kafienah W. Stem cells and cartilage development: complexities of a simple tissue. *Stem Cells* 2010;28:1992–1996.
158. Meyer U. Wiesmann HP. Bone and Cartilage Engineering. Springer 2010; 62: 442
159. Angel M. Razzano P. Grande D. Defining The Challenge: The basic science of articular cartilage repair and response to injury. Lippincott Williams & Wilkins, Inc 2003; 11: 168-181.
160. Alhanasioi K. Cartilage repair: A Viable option or an elusive problem? *Orthopaedic Tissue Engineering Congress Book*, 1997
161. Buckwalter JA. Mankin H. Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *J Bone Joint Surg* 1997;79 : 612-627.

162. Reinholz GG. Lu L. Saris DBF. Yaszemski MJ. O'Driscoll SW. Animal model for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 2003;1-11.
163. Brittberg M. Lindahl A. Nilsson A. et al. Treatment of Deep Cartilage Defection the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *New Eng J Med* 1994; 331: 889-895.
164. Buckwalter JA. Mankin H Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *J Bone join Surg* 1997; 79: 612-627.
165. Buckwalter JA. Mankin HJ. Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-matrix Interactions. *J Bone join Surg* 1997; 79: 600-608.
166. Gökçe A. Yılmaz I. Bircan R. ve ark. Synergistic Effect of TGF- β 1 And BMP-7 on Chondrogenesis and Extracellular Matrix Synthesis: An In Vitro Study. *Open Orthop J* 2012; 6: 406-13.
167. Gökçe A. Yılmaz I. Tonbul M. Gökay NS. Gökçe C. Effects of controlled release from the crosslinker and growth factor embedded hydrogel system: a systematic review and meta-analysis. *OTD Journal* 2012; 28: 25- 34.
168. Vater C. Kasten P. Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 2011;463-77.
169. Brittberg M. Tallheden T. Sjogren-Jansson B. Lindahl A. Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop Relat Res* 2001;391:337-48.
170. Koulalis D. Schultz W. Heyden M. König F. Autologous osteochondral grafts in the treatment of cartilage defects of the knee joint. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2004;12:329-34.
171. Junqueira LC. Carneiro J. Kelley RO. Basic Histology, 9th ed. McGraw-Hill International, UK, 1993;134–151.
172. Barbero A. Grogan S. Schafer D. et al. Age related changes in human articular chondrocyte yield proliferation and post expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12 :476-484

173. WEB_1 (2013) [www. genmapp.org](http://www.genmapp.org).
http://www.genmapp.org/showcase/StemCellMAPPs/Hs_TGF_Beta_Signaling_Pathway/Hs_TGF_Beta_Signaling_Pathway_1.htm (30.11.2014)
174. Horwitz EM. Gordon PL. Koo WK. et al. Isolated allogeneic bone marrow derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8932-8937
175. Koç ON. Day J. Nieder M. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002;30:215-222.
176. Barry FP. Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-84.
177. Becerra J. Andrades JA. Ertl DC. Sorgente N. Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 1996;11:1703-14.
178. Dennis JE. Merriam A. Awadallah A. et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999;14:700-9.
179. Butler PE. Lee WP. Sims CD. et al. Cell transplantation from limb allografts. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:161-8.
180. Kassem M. Kristiansen M. Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95:209-14.
181. Meirelles L, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion and characterization. *Br J Haematol.* 2003;123(4):702-11.
182. Gimble JM, Guilak F. Adipose derived adult stem cells: Isolation, characterization and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5: 362-369.
183. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stemcell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function* 2008;26: 664-675.
184. Sakaguchi Y. Sekiya I. Yagishita K. Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005;52:2521–2529.

185. Winter A. Breit S. Parsch D. et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 418–429.
186. Wakao S. Kitado M. Kuroda Y. et al. Multilineage-differentiation stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2011;108, 9875-80
187. Lee JW. Kim YH. Kim SH. Han SH. Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J* 2004; 45:41–47.
188. Danišovič L. Lesnýl P. Havlas V. et al. “Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells” *J Appl Biomed* 2007 ;5: 139–150, ISSN 1214-0287
189. Aybar B. Bilir A. Akcakaya H. Ceyhan T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:119-25.
190. Verfaillie CM. Pera MF. Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002;369-91.
191. Lakshmipathy U. Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev* 2005;19:29-38.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULUN ADI	: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Adipoz Dokudan Kondrosit Farklılaşması		
	ARIŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Hamiyet Dönmez Altuntaş		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Hamiyet Dönmez Altuntaş		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı/Kayseri		
	DESTEKLEYİCİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ			
	ARAŞTIRMA FAZİ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer İse Belirtiniz	☒	Yüksek Lisans Tezi	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ	☒	ÇOKMERKEZ	☐
	ULUSAL	☒	ULUSLARARASI	☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	
	SIGORTA	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	
	İLAN	
	YILLIK BİLDİRİM	
SONUÇ RAPORU		

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Prof. Dr. Hamiyet Dönmez Altuntaş
Fakülte Şefi

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2012/627	Karar Tarihi : 06.11.2012
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu	Bahri YANCIAR Fakülte Şefi
---------------	--	-------------------------------

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Prof. Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☐ H ☒ X	
Prof. Dr. Nazan DOLU	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rekonst.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Doç. Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Doç. Dr. Fatih TANRIVERDİ	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Doç. Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☐ H ☒ X	
Doç. Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Doç. Dr. Hasan B. ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Doç. Dr. Mehmet A. SOMDAŞ	KBB	Kayseri Eğitim Hastanesi	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Ferhan ELMALİ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	Sivil-Tiyatro Sanatçısı	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☐ H ☒ X	

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Doğa YAŞAR

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti (T.C)

Tel: +90 505 832 58 10

email: dogayasar@gmail.com

Yazışma Adresi:

Tunalı Hilmi Cad. No: 31 / 8

Kavaklıdere / Çankaya / ANKARA

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri,	2014
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ankara,	2006
Lisans	İnönü Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Sağlık Eğitimi Bölümü, Malatya,	2010
Lise	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Koleji, Ankara,	1989

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2012- halen	Sağlık Bakanlığı	Tıbbi Teknolog
1997–2012	Ankara İl Sağlık Müdürlüğü	Tıbbi Teknolog
1995-1997	Trabzon Ataköy Sağlık Meslek Lisesi	Öğretmen

YABANCI DİL :

İngilizce

BİLDİRİ ve YAYINLAR

1. Bildiri Özeti, “ Kök hücre dünyasına içeriden bir bakış” 4. Kök Hücre Sempozyumu, İstanbul, 20 Aralık 2013.
2. “Türk Basınında Alternatif Tıbbın Sunumu” Gazi Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2006.