

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KÖPEK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN İN-VİTRO NÖROJENİK
FARKLILAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Zeynep KURT

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2017**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Zeynep KURT tarafından hazırlanan “Köpek Mezenkimal Kök Hücrelerinin in-vitro Nörojenik Farklılaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 25/10/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN

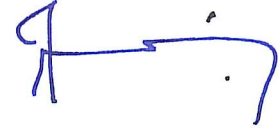


Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Rabia SARIKAYA
Gazi Üniversitesi Sınıf Eğitimi Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Mahmut SELVİ
Gazi Üniversitesi Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı



Üye : Yrd. Doç. Dr. Klara DALVA
Ankara Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalı



Üye : Yrd. Doç. Dr. Serap DURKUT
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

25.10.2017



Zeynep KURT

ÖZET

Doktora Tezi

KÖPEK MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN İN-VİTRO NÖROJENİK FARKLILAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Zeynep KURT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Bu çalışmada köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, kültürü, karakterizasyonu ve in-vitro ortamda nörojenik nesile farklılaştırılması incelenmiştir. Köpeğin iliak krestinden toplanan köpek kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (Kİ-MKH) hücre kültürü ortamında çoğaltıldı. Çoğaltılan hücrelerin karakterizasyonu için koloni oluşturma potansiyelleri, empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile hücre büyüme eğrisi, çoklu soy ve akım sitometri analizleri gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra köpek Kİ-MKH'leri, geliştirilen iki-aşamalı nörojenik farklılaştırma protokolüne tâbi tutuldu. Nöroküre oluşturmak amacıyla yapılan ilk indüksiyon aşamasında hücreler; epidermal büyüme faktörü (EGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) içeren nörobazal vasatta kültüre alındı. Üç gün süren ilk indüksiyon aşamasından sonra elde edilen nöroküreler ışık mikroskopunda görüntülendi. Nöroküre oluşum aşamasından sonra nörojenik farklılaşmanın ikinci basamağı olan nöron-benzeri hücre oluşum aşamasına geçildi. Dağıtılan nöroküreler, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin-kaynaklı nörotrofik faktörü (BDNF) içeren nörobazal vasatta altı gün kültüre alındı. İkinci indüksiyon aşaması sonunda nörojenik nesile farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin immunhistokimya boyamaları yapıldı. İn-vitro ortamda, köpek kemik iliğinden izole edilen hücrelerin mezenkimal karakterde olduğu, nöronal ve glial işaretçileri ifade eden hücrelere farklılaşabildiği ve bu hücrelerin ise gelecekte sinir doku hasarlarının tedavisinde fonksiyonel yenilenme için kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu gözlemlendi.

Ekim 2017, 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Hücre kültürü, Nörojenik farklılaşma, Nöroküre

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IN-VITRO NEUROGENIC DIFFERENTIATION OF CANINE MESENCHYMAL STEM CELLS AND EVALUATION OF PROPERTIES

Zeynep KURT

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

In this study, we have investigated the mesenchymal properties and neurogenic differentiation potentials of cultured canine bone marrow stem cells. Canine mesenchymal stem cells isolated from the iliac crest of canine were proliferated under sterile conditions. The mesenchymal properties of the cultured cells were confirmed using colony forming unit, impedance-based cell analysis system, lineage and flow cytometry analysis. At passage 2; BM-MSCs were induced into the neurogenic lineage by a two-step differentiation protocol. Cells were placed in tissue culture flasks coated with poly(hydroxyethylmethacrylate) and cultured in the B-27 and N-2 containing neurobasal medium. At the second step, the acquired neurospheres were disaggregated and the cell suspension was plated in tissue culture flasks which were coated with poly-L-ornithine. The neurosphere-derived cell suspension was then cultured for six days in the neurobasal medium supplemented with nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) for further induction into the neurogenic lineage. For determination of neurogenic differentiation of the mesenchymal stem cells, primary antibodies were used. The findings indicated that mesenchymal stem cells differentiate into cells expressing neuronal and glial markers in vitro and some mesenchymal stem cells exhibit neural potential.

October 2017, 81 pages

Key Words: Mesenchymal stem cell, Cell culture, Neurogenic differentiation, Neurosphere

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilgi birikimini ve tecrübesini benden esirgemeyen, her konuda bana yardımcı olan ve kendimi geliştirmemde değerli fikir ve önerileri ile katkıda bulunan saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kimya ABD) desteği için sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarında çok büyük emeği bulunan, her konuda bana destek olan ve tezimi bitirmem konusunda beni her zaman motive eden, benim için çok kıymetli olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü) teşekkür ederim.

Doktora yapmam konusunda beni teşvik eden, hedeflerime ulaşmam konusunda bana her türlü imkanı sağlayan, bütün varlığını sadece çocuklarına adayan canım annem ve babama, kardeşleri olduğum için gurur duyduğum ağabeyim Ahmet AKTAŞ'a ve kardeşim Oğuzhan AKTAŞ'a ve hala olma duygusunu bana yaşatan ailemizin en küçük üyesi Batuhan AKTAŞ'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği günden beri varlığına her gün şükrettiğim, sevgisiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren, en zor zamanlarımda beni ayağa kaldıran sevgili eşim Mehmet KURT'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Zeynep KURT

Ankara, Ekim 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	9
2.1 Kök Hücre Tarihi.....	9
2.2 Kök Hücre Potansiyeli	11
2.2.1 Totipotent kök hücreler	11
2.2.2 Pluripotent kök hücreler	12
2.2.3 Multipotent kök hücreler	12
2.2.4 Oligopotent kök hücreler.....	12
2.2.5 Unipotent kök hücreler.....	12
2.3 Kök Hücre Türleri	13
2.3.1 Embriyonik kök hücreler	13
2.3.2 Erişkin kök hücreler	14
2.3.2.1 Kemik iliği kök hücreleri.....	15
2.3.2.1.1 Kemik iliği hematopoetik kök hücre	15
2.3.2.1.2 Kemik iliği stromal kök hücre	15
2.3.2.2 Multipotent erişkin öncül hücreler.....	16
2.3.2.3 Mezenkimal kök hücreler.....	16
2.3.2.4 Adipoz kaynaklı kök hücreler.....	19
2.3.2.5 Deri kök hücreleri	20
2.3.2.6 Kardiyak kök hücreleri	20
2.3.2.7 Pankreatik kök hücreler.....	20
2.3.2.8 Nöral kök hücreler	21
2.3.2.8.1 İzolasyon, kültür ve nörojenik farklılaşma.....	22
2.4.1 Sinir dokuyu oluşturan hücre tipleri.....	25
2.4.1.1 Nöronların yapısı ve fonksiyonu	26
2.4.1.2 Nöroglia	28
2.4.2.2 Astrositler.....	29
2.4.2.3 Oligodentrositler	30
2.4.2.4 Mikroglialar.....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1 Materyal	33
3.2 Yöntem	36
3.2.1 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH'lerin) izolasyonu ve kültürü	36
3.2.1.1 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu	36

3.2.1.2 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin kültürü	37
3.2.1.3 Hücre sayımı	37
3.2.2 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH'lerin) karakterizasyonu	38
3.2.2.1 CFU-F (Koloni oluşturma potansiyeli) protokolü	38
3.2.2.2 Empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi	39
3.2.2.3 İmmünofenotip karakterizasyon metodolojisi (Akım Sitometri)	41
3.2.2.4 Çoklu soy farklılaşması	42
3.2.2.4.1 Adipojenik soya farklılaşma	42
3.2.2.4.1.1 Oil Red O (ORO) boyaması	42
3.2.2.4.2.1 Alsiyan mavisi boyaması	43
3.2.2.4.3 Osteojenik soya farklılaşma	44
3.2.2.4.3.1 Alizarin kırmızısı (AR-S) boyaması	44
3.2.2.4.3.2 Von Kossa boyaması	45
3.2.3 Kİ-MKH'lerden nörokürelerin oluşturulması (in-vitro Nörojenik Farklılaştırmanın 1. Basamağı)	45
3.2.4 Dağıtılan nörokürelerin nörojenik farklılaştırması (in-vitro Nörojenik Farklılaştırmanın 2. Basamağı)	46
3.2.5 İmmünohistokimyasal Tanımlama	46
4. BULGULAR	48
4.1 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin hücre kültürü bulguları	48
4.2 Hücre Sayımı	49
4.4 Empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile hücre büyüme eğrisi	52
4.5 Akım Sitometri Bulguları	52
4.6 Çoklu soy farklılaşması	55
4.6.1 Adipojenik soya farklılaşma	55
4.6.1.1 Oil Red O boyaması	55
4.6.2 Kondrojenik soya farklılaşma	56
4.6.2.1 Alsiyan Mavisi boyaması	56
4.6.3 Osteojenik soya farklılaşma	57
4.6.3.1 Alizarin Kırmızısı (AR-S) boyaması	57
4.6.3.2 Von Kossa boyaması	58
4.7 Nörojenik Farklılaşma	58
4.7.2 Dağıtılan nörokürelerin nörojenik farklılaştırması (In-vitro nörojenik farklılaştırmanın 2. basamağı)	60
4.8 İmmünohistokimyasal Boyamalar	61
4.8.1 MAP-2 (anti-ERK1 + anti-ERK2) boyaması	61
4.8.2 CNPaz (anti-2',3'-Siklik Nükleotid--3'-Fosfodiesteraz) boyaması	62
4.8.3 Beta III tübülün boyaması	63
4.8.4 GFAP (anti-Gliyal Fibriler Asidik Protein) boyaması	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	81

KISALTMALAR DİZİNİ

AEC	3-amino-9-etilkarbazol
AgNO ₃	Gümüş nitrat
ALS	Amiyotrofik lateral skleroz
AR-S	Alizarin kırmızısı
α-MEM	Minimum Essential Alpha Besiyeri
AMKH	Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler
Anti-CNPaz	Anti-2',3'-Siklik Nükleotid--3'-Fosfodiesteraz
Anti-GFAP	Anti-Glial Fibriler Asidik Protein
BDNF	Beyin-kaynaklı nörotrofik faktörü
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BOS	Beyin – omurilik sıvısı
BSA	Sığır serum albümini
CD	Farklılaşma kümesi (Cluster of Differentiation)
CFU-F	Koloni oluşturma potansiyeli
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle F12 Besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EKH	Embriyonik kök hücre
FBS	Fetal sığır serumu
H&E	Hematoksilin ve Eosin
HCl	Hidroklorik asit
HLA-DR	İnsan lökosit antijenleri
IBMX	3- izobutil-1-metilksantin
iPKH	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
İEKH	İnsan embriyonik kök hücre
ISCT	Uluslararası Hücre Tedavi Derneği
ITS	İnsulin–transferrin–selenöz asit
Kİ-MKH	Kemik iliği mezenkimal kök hücre
L-Glu	L-Glutamin
MAP2	Mikrotübül-bağlantılı protein 2

MKH	Mezenkimal kök hücre
MSS	Merkezi sinir sistemi
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NeuN	Nöral Nükleer Antijen
NGF	Sinir büyüme faktörü
NKH	Nöral kök hücreler
NSE	Nöron Spesifi Kenolaz
ORO	Oil Red O
Pen/Strep	Penisilin/Streptomisin
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
pHEMA	Poli(hidroksietil metakrilat)
PSS	Periferik sinir sistemi
RTCA	Eş-zamanlı hücre analiz sistemi
RPE	Retina pigmentli epitel hücre
SH	Schwann hücre
SKP	Deri kaynaklı öncül kök hücre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Dölllenmiş yumurtadan fetusa kadar geçen sürede gerçekleşen olaylar ve hücre tipleri	13
Şekil 2.2 Embriyonik kök hücre oluşumu	14
Şekil 2.3 Kemik iliği stromal kök hücrelerin kültürdeki görünümü.....	16
Şekil 2.4 Mezenkimal kök hücre farklılaşma potansiyeli	17
Şekil 2.5 Sinir Dokusu	25
Şekil 2.6 Nöron yapısı	27
Şekil 2.7 Nöroglia hücrelerinin yapısı.....	29
Şekil 2.8 Astrosit yapısı	30
Şekil 2.9 Oligodendrosit ve miyelin kılıf	31
Şekil 2.10 Beyin dokusu ve kültürlerinde fare mikrogliası.....	32
Şekil 3.1 Nörojenik farklılaşmanın birinci basamağının şematik gösterimi	35
Şekil 3.2 Nörojenik farklılaşmanın ikinci basamağının şematik gösterimi.....	35
Şekil 3.3 Köpekten izole edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kültürünün yapılması.....	36
Şekil 3.4 Hemasitometre ile hücre sayımı.....	38
Şekil 3.5 Eş zamanlı hücre analizi sistemi	40
Şekil 4.1 Pasaj-0 (P-0)'ın 14. gününde kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin inversiyon mikroskobu görüntüsü.....	48
Şekil 4.2 CFU-F deneyi için 100 hücre/cm ² (A-C) ve 1000 hücre/cm ² (D-F) yoğunluğunda ekilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 14. günde elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri (Hematoksilin ve eosin boyaması)	50
Şekil 4.3.a.c. CFU-F deneyi için 100 hücre/cm ² , b.d. 1000 hücre/cm ² yoğunluğunda ekilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 14. günde H&E boyaması ile elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri	51
Şekil 4.4 Empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile elde edilen hücre büyüme eğrisi	52
Şekil 4.5 Köpek Kİ-MKH'lerin akım sitometri sonuçları.....	54

Şekil 4.6 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 14. günde Oil Red O boyaması	55
Şekil 4.7 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 21. günde Alsiyan Mavisi boyaması	56
Şekil 4.8 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 28. günde Alizarin kırmızısı (AR-S) boyaması	57
Şekil 4.9 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 28. günde Von Kossa boyaması	58
Şekil 4.10 Nörojenik indüksiyonun ilk aşamasından sonra elde edilen Nestin-pozitif nörokürelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Boyut çubuğu: 100µm	59
Şekil 4.11 Nörojenik indüksiyonun ilk aşamasından sonra elde edilen nörokürelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Boyut çubuğu: 200µm	59
Şekil 4.12 Nörojenik indüksiyonun ikinci aşamasından sonra elde edilen nöron-benzeri hücrelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri	60
Şekil 4.13 Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin MAP -2 boyamaları.....	61
Şekil 4.14 Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin CNPaz boyamaları	62
Şekil 4.15 Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin beta III tübülün boyamaları.....	63
Şekil 4.16 Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin GFAP boyamaları.....	64
Şekil 5.1 Nörokürelerin mikroskobik görüntüleri A. Chung vd. tarafından 2013 yılında elde edilen nöroküre görüntüsü B. Tez çalışmasına ait nöroküre görüntüsü	69
Şekil 5.2 Nöron-benzeri hücrelerin mikroskobik görüntüleri A. Oda vd. tarafından 2013 yılında elde edilen nöron-benzeri hücre görüntüsü B. Tez çalışmasına ait nöron-benzeri hücre görüntüsü.....	70
Şekil 5.3 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin nörojenik indüksiyonunun ikinci aşamasından sonra elde edilen nöron-benzeri hücrelerin immunhistokimya boyama sonuçları A: MAP-2 boyaması, B: CNPaz boyaması, C: Beta III tubulin boyaması, D: GFAP boyaması	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Embriyonik kök hücre uygulama alanları.....	2
Çizelge 1.2 Nöral kök hücre çalışmaları ve uygulama alanları	4
Çizelge 2.1 Temel mezenkimal kök hücre tipleri için yüzey antijen profili	18
Çizelge 4.1 Kemik iliği biyopsileri alınan köpeklerin özellikleri.....	49
Çizelge 4.2 Kİ-MKH'lerin yüzey antijen paneli.....	53



1. GİRİŞ

Kök hücreler vücudumuzda bütün doku ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme, kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir ve gerekli koşullar sağlandığında istenilen hücre tipine dönüşebilmektedir.

Son yıllarda kök hücre alanındaki araştırmaların hızlanması ve bu konuda artan bilgi birikimi kök hücrelerin potansiyel klinik uygulamalarına yönelik ilgiyi artırmıştır (İnanç vd. 2011). Bunun sonucu olarakta; kök hücre çalışmalarının sayısı ve çalışılan kök hücre türlerinde de artış gözlenmektedir (Trounson vd. 2015). Ayrıca kök hücre klinik çalışmalarının izlenmesi ve değerlendirilmesiyle ilgili çok önemli yatırımlar yapılmaktadır. Örneğin 2014 yılında gerçekleştirilen hücresel tedavi çalışmalarının yaklaşık % 70'i akademik kurumların (kamu finansmanı), % 30'u ise özel şirketlerin sponsorluğunda gerçekleştirilmiştir (Bersenev 2015).

Her ne kadar klinik araştırma ve çalışmaların sayısı zamanla etkileyici sayılara ulaşmış olsa da; uygulamalar sonucunda elde edilen başarı oranı oldukça düşüktür. Bununla birlikte hala devam eden klinik çalışmalar ile bu alandaki ilerlemelerin devam etmesi beklenmektedir.

Farklı kök hücre türleri ile yapılan tedavilerin çeşitli hastalık ve yaralanmalara maruz kalan hastalara fayda sağlayabileceği düşünülmektedir. Literatür incelendiğinde; sinir kök hücrelerinin rejeneratif onarım için umut verici olduğu, pluripotent kök hücrelerin rejeneratif tıpta geniş bir potansiyele sahip olduğu ve mezenkimal kök hücrelerin (MKH'ler) klinik çalışmalarda en çok tercih edilen kök hücre türü olduğu açıkça görülmektedir (Trounson vd. 2015).

Hem embriyonik kök hücreler (EKH), hem de indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) tedavi edici özellikleri sebebiyle klinik araştırmalarda geniş yer bulmaktadır. Embriyonik kök hücreler ile yapılan çalışmalar çizelge 1.1'de görülmektedir.

Çizelge 1.1 Embriyonik kök hücre uygulama alanları (Trounson vd. 2015)

Sponsor	Hastalık Türü	Hücre Tedavisi	Hasta Sayısı	Faz
Chabiotech Co. Ltd. (S. Korea)	Maküla dejenerasyonu	İnsan embriyonik kök hücre (İEKH) kaynaklı retina pigmentli epitel hücreleri	12	Faz I/II
Ocata Therapeutics (MA, USA)	Stargardt's maküla distrofisi	İEKH kaynaklı retina pigmentli epitel hücreleri (RPE'ler)	16	Faz I/II
Pfizer (UK)	Maküla dejenerasyonu	İEKH kaynaklı retina pigmentli epitel hücreleri (RPE'ler)	10	Faz I
Cell Cure Neurosciences Ltd. (Israel)	Maküla dejenerasyonu	İEKH kaynaklı retina pigmentli epitel hücreleri (RPE'ler)	15	Faz I/II
ViaCyte (CA, USA)	Tip 1 diyabet	İnsan-EKH-kaynaklı pankreatik endoderm hücresi	40	Faz I/II
International Stem Cell Corp. (Australia)	Parkinson hastalığı	insan parthenogenetik kaynaklı sinir kök hücreler	-----	Faz I/II
Asterias Biotherapeutics (CA, USA)	Omurilik yaralanması	İnsan-EKH kaynaklı oligodendrosit öncül hücreleri	13	Faz I/II

Dünyada embriyonik kök hücre naklinin bir tedavi seçeneği haline gelmesi beklenmesine karşın henüz faz denemesi aşamasındadır. Güney Kore’de maküla dejenerasyonunun tedavisinde embriyonik kök hücrelerin kullanımı faz I/II aşamasındadır. Amerika Birleşik Devletleri’nde ise embriyonik kök hücrelerin Stargardt’s maküla distrofisinde, maküla dejenerasyonunda, omurilik yaralanmalarında ve Tip 1 diyabet tedavisinde kullanımı faz I ve faz II aşamasındadır. Embriyonik kök hücreler İsrail’de yine maküla dejenerasyonunda, Avusturalya’da ise Parkinson hastalığının tedavisinde faz I/II aşamasında kullanılmaktadır (Çizelge 1.1).

Ülkemizde ise mevcut tüm tedavi yöntemleri denenmesine karşın başarı sağlanamazsa izin merci olan Sağlık Bakanlığı tarafından kök hücre kullanımına izin verilmektedir. Bu konuda en mağdur hasta grupları ise omurilik ve travmatik rahatsızlıklara sahip olan hastalardır.

Pluripotent kök hücreler sinir dejenerasyonlarında, parkinson gibi rahatsızlıklarda, amiotrofik lateral skleroz hastalıklarında ve omurilik yaralanmalarında daha çok tercih edilmektedir (Pettersson vd. 2011).

Sinir kök hücre türevleri, klinik deneme uygulamaları için kullanılan kök hücre türlerinden bir diğeridir. Çalışmalar genellikle hasar görmüş olan merkezi sinir sistemini tedavi etmeye yöneliktir. Merkezi sinir sisteminin rejeneratif tedavisi için tercih edilmesi gereken en iyi nöral hücre tipi hala tam olarak belirlenememiştir. Hastalığa ve yaralanmaya bağlı olarak seçilecek hücre çeşidinin farklılık gösterebileceği düşünülmektedir. Genel olarak kabul edilen düşünce; nöron, astrosit veya oligodendrositleri içeren bir sinir kök hücresinin kök hücre havuzu elde etmek için ideal olduğudur. Ancak spesifik hücre tiplerinin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için olgun sinir hücrelerine de ihtiyacı vardır. Örneğin; Parkinson rahatsızlığında nigral A9 dopaminerjik nöronlara ihtiyaç vardır. Önümüzdeki dönemde yapılan klinik çalışmalarla sinir kök hücresinin mi yoksa oligodendrosit öncül hücresinin mi daha yararlı olacağı belirlenecektir (Trounson vd. 2015).

Trafik ve iş kazaları sebebiyle meydana gelen omurilik ve periferik sinir yaralanmaları Avrupa’da her yıl yaklaşık 100 bin insanı etkilemektedir (Asplund 2009, van den Berg 2010). Omurilik yaralanması sonunda hastaların hemen hemen yarısının el ve ayak fonksiyonlarında kayıp olurken hastaların diğer yarısının belden aşağısında felç kalma durumu ortaya çıkmaktadır. Bu tip hastalar genç yaşta olmalarına rağmen tedavilere cevap verememiş, daha sonra çalışma potansiyelini kaybetmiş ve normal hayatlarına dönememiştir (Pettersson vd. 2011). Travmatik rahatsızlıklar dışındaki nörodejeneratif rahatsızlıkların beyindeki nöronların körelmesine ve ölmesine neden olduğu bilinmektedir (Fu vd. 2008). Bu hastalıklar için herhangi bir tedavi yolu henüz bulunamamıştır. Bu konuda yapılan bütün uygulanabilir tedaviler sadece semptomatik olarak devam etmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda kök hücre naklinin, erişkin beyindeki endojen kök hücrelerle mobilizasyonunun, nörodejeneratif rahatsızlıkların gelecekteki tedavisini sağlayabileceği düşünülmektedir (Reynold vd. 1992). Nöral kök hücrelerin nöral hastalıkların tedavisinde kullanılmasına yönelik çalışmalar çizelge 1.2’de görülmektedir.

Çizelge 1.2 Nöral kök hücre çalışmaları ve uygulama alanları (Trousseau vd. 2015)

Sponsor	Hastalık Türü	Hücre Tedavisi	Hasta Sayısı	Faz
City of Hope (ABD)	Tekrarlayan yüksek dereceli gliomlar	<i>E. Coli</i> CD-ifade eden sinir kök hücreleri	24	Faz I
Neuralstem Inc. (ABD)	ALS (Amiyotrofik lateral skleroz)	Fetal kökenli sinir kök hücreler	18	Faz I
Stem Cells Inc. (ABD)	Nöronal seroid lipofuzkinoz	İnsan MSS kök hücreleri	9	Faz I
	Maküler dejenerasyon	İnsan MSS kök hücreleri	50	Faz I/II
	Toraksik omurilik yaralanması	İnsan MSS kök hücreleri	15	Faz I/II

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 24 hastada *E. Coli* sinir kök hücreleri ile tekrarlayan yüksek dereceli gliomlar üzerinde yapılan çalışmalar ve 18 hastada ALS hastalığının tedavisinde fetal kökenli sinir kök hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalar faz I aşamasındadır (Çizelge 1.2).

Her ne kadar nörodejeneratif rahatsızlıklar sebebiyle kaybedilen hücrelerin yenilenmesi günümüzde gerçekdışı gibi görünse de, hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarla nöronal yenilenme ve zarar görmüş nöronal devrelerin bir kısmının yeniden yapılanmasının mümkün olduğu yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Harrison vd. 2015).

Bilim insanları yaptıkları araştırmalar sonucu; nörojenik olarak farklılaşmış hücrelerin, nörodejeneratif rahatsızlığı olan hastaların beynindeki ölü hücrelerin yerini almak için transplante edilecek hücre grubu olarak tercih edilebileceklerini açıklamışlardır. İki farklı laboratuvar tarafından mezenkimal kök hücrelerin nöral kök hücre kültür şartlarında benzer protokoller kullanılarak kültüre edilmesiyle nöroküre benzeri yapılar olan klonojenik nöral kök hücrelerine dönüşebildiği rapor edilmiştir (Bez vd. 2003, Lim vd. 2010). Ayrıca sıçan mezenkimal kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin kayda değer bir kısmının (% 20–60) in-vitro koşullarda nöral kök hücrelerine dönüştüğü belirlenmiştir (Lei vd. 2007). İnsan erişkin mezenkimal kök hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada ise mezenkimal kök hücrelerin % 60'tan fazlasının in-vitro koşullarda klonojenik nöral kök hücrelerine dönüştüğü rapor edilmiştir (Shakhbazau vd. 2010). Her iki çalışmada da mezenkimal kök hücrelerin nöral kök hücrelere dönüşümünün bir transdiferansiyon olayı olduğu kanısına varılmıştır. Bunun yanı sıra mezenkimal kök hücre kaynaklı nöral kök hücrelerin nöronların, astrositlerin ve oligodendrositlerin morfolojik ve fonksiyonel karakteristik özelliklerini taşıyan hücrelere farklılaştığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda Kİ-MKH'nin başarılı bir şekilde nöronal hücrelere farklılaşabildiği ve omurilik yaralanmalarında da fonksiyonel yenilenme için kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, kemik iliği

mezenkimal kök hücreler hasarlı sinir dokusunun rejenerasyonunda hücre kaynağı olarak tercih edilmektedir (Mu vd. 2015).

Kİ-MKH başarılı bir şekilde nöronal hücrelere farklılaşan ilk erişkin kök hücre tipidir. Ayrıca omurilik yaralanmalarında da fonksiyonel yenilenme için kullanılmaktadır. Dolayısıyla, kemik iliği mezenkimal kök hücreler hasarlı sinir dokusunun rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda hücre kaynağı olarak tercih edilmektedir (Muñoz-Elías vd. 2003). Buna ek olarak, in-vitro ortamda kültüre edildiği zaman aksonları ifade eden motor nöron-benzeri hücrelerin sayısını artıran Schwann hücrelerinin fenotipini gösteren hücrelere farklılaştığı belirlenmiştir (Kingham vd. 2007).

Mezenkimal kök hücre araştırmalarında karşılaşılan en büyük zorluk insan rahatsızlıklarında deneyimlenen karmaşıklığı yansıtan iyi hayvan modelleri bulmaktır. Rejeneratif tıpta yeni tıbbi yöntemlerin uygulanmasından önce, hayvan modellerinde klinik çalışmalar yapılması oldukça önemlidir. Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalar ile *Canis familiaris* türünün insan hastalıkları için uygun bir model olabileceğini göstermiştir. Öncelikle; insanlar ve köpekler aynı çevresel hayatı paylaşmaktadır. Fizyolojik olarak bakıldığında ise; diğer geleneksel hayvan modelleriyle karşılaştırıldığında köpeklerdeki hastalıklar ve klinik semptomlar insanlardakine daha çok benzerlik göstermektedir. Hayvan türlerindeki kalıtsal bozuklukların gen veri tabanı incelendiğinde; insan hastalıkları için hayvan modeli olarak köpeklerin en önemli potansiyel olduğu görülmektedir. Ayrıca, genomik olarak, köpeklerdeki hastalıkların genetik temelleri insanlardakine büyük ölçüde örtüşmektedir. Bu nedenle, *C. Familiaris* türü insan rejeneratif tıbbi için umut verici hayvan modeli olarak kabul edilmektedir (Kim vd. 2014).

Yapılan bir çalışmada köpek adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin nöral farklılaşma potansiyeli incelenmiştir. İntra-abdominal ve subkutanöz adipoz dokudan izole edilen köpek kemik iliği mezenkimal kök hücreleri kültüre edilmiştir. Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için çoklu soy farklılaşması çalışmaları yapılmıştır. Nöronal farklılaşma için forskolin, hidrokortizon, valproik asit içeren besiyeri kullanılmıştır. Farklılaşma sonrası morfoloji, immunhistokimya ve polimeraz zincir tepkimesi

analizleri ile nöron-benzeri hücrelerin elde edildiği ve bu hücreler arasında sinaps-benzeri etkileşimler olduğu gösterilmiştir (Blecker vd. 2017).

Yine bir diğer çalışmada fare kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerden nöral öncül hücreler elde edilmiştir. İzole edilen fare kemik iliği mezenkimal kök hücreleri kültüre alınmış ve istenilen hücre sayısına ulaşıncaya kadar kültür devam ettirilmiştir. Nöral farklılaşma aşamasında bFGF, butilhidroksianisol ve dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besiyeri tercih edilmiştir. Nöral farklılaşmış hücreler morfoloji, immunhistokimya ve gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi ile karakterize edilmiştir (Mohammad vd. 2016).

Mezenkimal kök hücreler, uygun farklılaşma koşulları altında nöral hücrelere farklılaşmaya indüklenir. Merkezi sinir sistemi, kendini yenileme açısından sınırlı kapasiteye sahip olduğundan MKH'lerin nöral gelişimi; spesifik nörolojik eksikliklerin giderilmesinde kaynak olarak kullanılabilmektedir. Araştırmacılar tarafından nörojenik farklılaşma ile ilgili birçok farklı protokol geliştirilmiştir. Ancak köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin nörojenik indüksiyonuyla ilgili çalışma sayısının azlığı bizi bu hücrelerle çalışmaya yönlendirmiştir.

Yapılan çalışmada hayvan modeli olarak köpek tercih edilmesinin sebebi ise büyük köpeklerin insan hastalıkları araştırmalarında; uzun yaşam beklentisi, büyük vücut kütlesi ve insan yapısını etkileyen hastalıkların doğal gelişimidir.

Yakın bir gelecekte etkin rejeneratif tedavilerin omurilik yaralanmalarında kullanılabileceği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. MKH'ler, hücresel tedavide hasarlı dokuların rejenerasyonu için tercih edilmektedir. İn-vitro ve in-vivo ortamda, mezenkimal kök hücrelerin, nöronal ve glial işaretleri ifade eden hücrelere farklılaşabildiği ve bazı mezenkimal kök hücrelerin nöral potansiyel gösterdiği, nörodejeneratif rahatsızlıklar için tedavi amaçlı kullanılabileceği belirlenmiştir. Bu sebeplerden dolayı yapılan tez çalışmasında köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin karakterizasyonu ve nörojenik nesile farklılaşma potansiyeli incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında; köpek Kİ-MKH'leri iliak krestten izole edildikten sonra kültüre edildi ve istenilen hücre yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri incelendi. Empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile hücre büyüme eğrisi belirlendi. Çoklu soy farklılaşması ve akım sitometri analizleri yapıldı. Hücrelerin mezenkimal özellikte olduğu belirlendikten sonra iki aşamadan oluşan nörojenik farklılaşma protokolüne geçildi. İlk indüksiyon aşamasında hücreler; nöroküre elde etmek amacıyla EGF ve bFGF içeren nörobazal vasatta kültüre alındı. Üç gün süren indüksiyon aşamasından sonra elde edilen nöroküreler ışık mikroskopunda görüntülendi. Üç gün sonunda dağıtılan nöroküreler, NGF ve BDNF içeren nörobazal vasatta altı gün kültüre alındı. İkinci indüksiyon aşaması sonunda nörojenik nesile farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin immunhistokimya boyamaları yapıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kök Hücre Tarihi

Kök hücreler; hücre bölünmesi yoluyla kendini yenileme özelliğine sahip, farklı hücre tiplerine farklılaşabilen, tüm çok hücreli organizmalar için ortak olan ve yetişkin vücudunda 200'den fazla hücre tipinin öncülleri olarak kabul edilen temel hücrelerdir ve bu özelliklerinin sonucu olarak; çeşitli doku hücrelerini oluşturabilmektedir (Avasthi vd. 2008). Bütün kök hücreler karakteristik olarak aynı hücre ailesinden gelen farklılaşmamış hücrelerdir.

Kök hücreleri tanımlarken iki özellikten mutlaka bahsedilmelidir. Bunlar; kendini yenileyebilme ve sınırsız potansiyeldir. Kendini yenileme; hücrenin farklılaşmamış halini korurken sınırsız bölünebilmesi anlamına gelir. Sınırsız potansiyel ise erişkin hücre tiplerine farklılaşma kapasitesi anlamına gelir. Bu özellikler kök hücreleri tam anlamıyla totipotent yapar. Ayrıca multipotent ve unipotent terimleri de kök hücre potansiyelini tanımlamak için kullanılmaktadır. Totipotent kök hücreler (zigotlar), insan vücudunda tüm canlı organizmayı oluşturabilirken, pluripotent kök hücreler (embriyonik kök hücreler) bazı hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. Multipotent kök hücreler ise özelleşmiş hücre grupları oluşturabilmektedir (Elçin 2003).

Kök hücreler, blastositlerden elde edilen embriyonik kök hücreler ve erişkin dokuda bulunan erişkin kök hücreler olmak üzere iki kategoride incelenebilir. Gelişmekte olan bir embriyoda, kök hücreler tüm özelleşmiş embriyonik dokulara farklılaşma eğilimine sahiptir. Yetişkinlerde ise kök hücreler hasar görmüş hücrelerin yerini alarak vücut için bir onarım sistemi gibi davranmaktadır (Avasthi vd. 2008).

Kök hücreler; biyopsi ile femur ya da leğen kemiğinden toplanan kemik iliğinden, liposakşın ile yağ dokudan alınan parçadan, kandan, doğumdan hemen sonra kordon kanından elde edilebilir ve işlem sonrası saflaştırılır (Baykan vd. 2014). Kök hücrelerin otolog ve allojenik olmak üzere iki kaynağı bulunmaktadır. Tedavisel klonlama yöntemiyle üretilen otolog embriyonik kök hücreler ve umbilikal kord kanından ya da kemik iliğinden elde edilen erişkin kök hücreler gelecek tedaviler için umut vadeden kök hücre kaynaklarıdır. Allojenik kök hücreler ise ilikten, periferik kandan, kord kanından ve akraba donörlerden elde edilebilmektedir.

Kök hücre çalışmalarıyla ilgili ilk girişimler 1878 yılında memeli yumurtasının vücut dışında döllenmesi ile ilgili olsa da, insan kök hücre alanındaki araştırmalar 1960'larda Kanadalı bilim adamları Ernest A. McCulloch ve James E. Till tarafından elde edilen bulgularla gelişmeye başlamıştır. Mevcut bağlamda kök hücre nakline yönelik ilk kemik iliği nakli 1937 yılında Schretzenmyr tarafından yapılmıştır. 1959'da in-vitro döllenme yoluyla elde edilen ilk hayvan kök hücre nakline yönelik atılmış büyük bir adım olarak kabul edilmiştir. 1960'ların sonuna doğru, teratokarsinomaların farelerde embriyonik germ hücrelerinden elde edildiği belirlenmiş ve embriyonel karsinoma hücrelerinin bir kök hücre türü olduğu tespit edilmiştir. İlk insan yumurtası 1968 yılında in-vitro olarak döllenmiştir. Kültüre edilen embriyonik kök hücreler 1970'lerde farelerde embriyonik gelişim modelleri olarak araştırılmıştır.

1981 yılında sıçan embriyonik kök hücrelerin blastositlerin iç hücre kütesinden elde edildiği belirlenmiştir (Avasthi vd. 2008). Sıçan embriyonik kök hücreleri in-vitro ortamda çoğaltılmış ve teratom oluşturan farelere enjekte edilmiştir ve embriyonel karsinoma hücreleri olarak adlandırılan pluripotent hücreler elde edilmiştir. Bu hücrelerin retinoik aside maruz bırakıldığında nöron-benzeri hücrelere ve diğer hücre tiplerine farklılaştığı gözlemlenmiştir. 1994 yılında insan blastositleri üretilmiş ve iç hücre kütesi kültürde devam ettirilmiştir. 1995-1996 yıllarında, maymunların iç hücre kütlelerinden elde edilen ES hücreleri in-vitro ortamda devam ettirilmiştir. Bu hücreler pluripotenttir ve normal olarak bütün üç birincil germ tabakasına farklılaşabilmektedir.

2000 yılında bilim adamları blastositlerin iç hücre kütesinden insan embriyonik kök hücreleri elde etmişlerdir. Hücreleri in-vitro ortamda uzun süre çoğaltmışlar ve bağışıklığı zayıf farelere enjekte edildiğinde üç germ tabakasının ve teratomların oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Yirmibirinci yüzyılın başlarında ABD finansman kuralları değiştiği için kök hücre çalışmaları zayıflamıştır. Ancak Kaliforniya Enstitüsü araştırmaları desteklemeye devam etmiştir. İnsan embriyonik kök hücre hatlarının paylaşımıyla ve yeni hatların oluşturulmasıyla kök hücre araştırmaları daha umut verici hale gelmiştir ve birçok araştırma grubu hücrelerin in-vitro ortamda farklılaştırılması üzerine çalışmalara yönelmiştir.

2.2 Kök Hücre Potansiyeli

Kök hücre potansiyeli, özel hücre tiplerine farklılaşma kapasitesidir. Farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli olarak da adlandırılmaktadır. Dölllenmiş yumurtadan fetusa kadar geçen sürede gerçekleşen olaylar, elde edilen hücre tipleri ve farklılaşma kapasiteleri şekil 2.1’de gösterilmiştir.

2.2.1 Totipotent kök hücreler

Yumurta ve sperm birleştiğinde yani döllenme meydana geldiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu tip hücrelere her şeyi yapabilen anlamına gelen totipotent hücre denir (Şekil 2.1). Dölllenmeden sonraki ilk dört gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücredir ve her bir hücre ayrı bir organizmayı oluşturabilecek güce sahiptir. Bu tip hücreler somatik kök/öncül hücreleri ve temel germ-hattı kök hücrelerini meydana getirir (Weissman vd. 2004). Totipotent kök hücreler ayrıca embriyonik ve embriyonik olmayan hücre tiplerine de farklılaşabilir.

2.2.2 Pluripotent kök hücreler

Hemen hemen bütün hücre tiplerine farklılaşabilir. Döllenmeden sonraki beşinci günden itibaren meydana gelen hücreler blastokist denilen küresel bir şekil alır. Bu kürenin içindeki hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen, artık tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildir. Bu tip hücrelere pluripotent hücre adı verilir (Şekil 2.1). Bu hücreler yetişkin organizmada kendini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli ile karakterize edilir. Embriyonik kök hücreler bu kategori altında incelenmektedir (Shamblott vd. 1998).

2.2.3 Multipotent kök hücreler

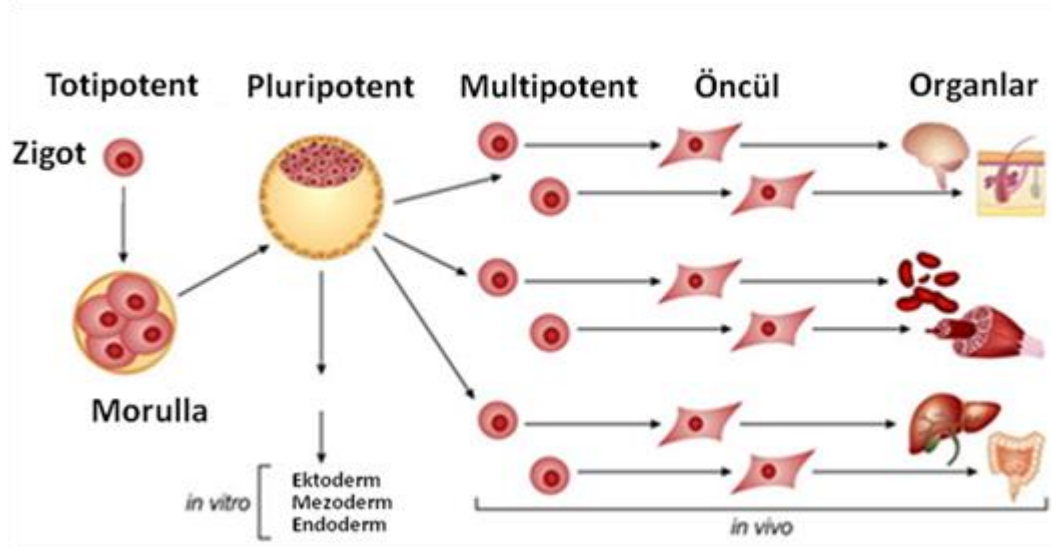
Multipotent kök hücreler, yalnızca yakından ilişkili olduğu hücre ailesindeki hücre tiplerine farklılaşabilir. Örneğin, hematopoetik kök hücreler kemik iliğinde bulunur ve kırmızı ve beyaz kan hücrelerine dönüşebilir (Şekil 2.1). Ayrıca adipoz doku da multipotent kök hücreler için kaynak olarak gösterilebilir.

2.2.4 Oligopotent kök hücreler

Lenfoid ya da myeloid kök hücrelerde olduğu gibi yalnızca birkaç hücre grubunu oluşturan kök hücrelerdir. Korneal epitelyum kendini yenileyen ve yassı yapıda bulunan bir oligopotent kök hücre tipidir (Majo vd. 2008).

2.2.5 Unipotent kök hücreler

Unipotent kök hücreler sadece tek bir hücre tipini oluşturabilir. Kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Bazı unipotent hücreler kas kök hücrelerini içerir (Blanpain vd. 2008).



Şekil 2.1 Dölllenmiş yumurtadan fetusa kadar geçen sürede elde edilen hücre tipleri (<http://www.tankonyvtar.hu>, 2011)

2.3 Kök Hücre Türleri

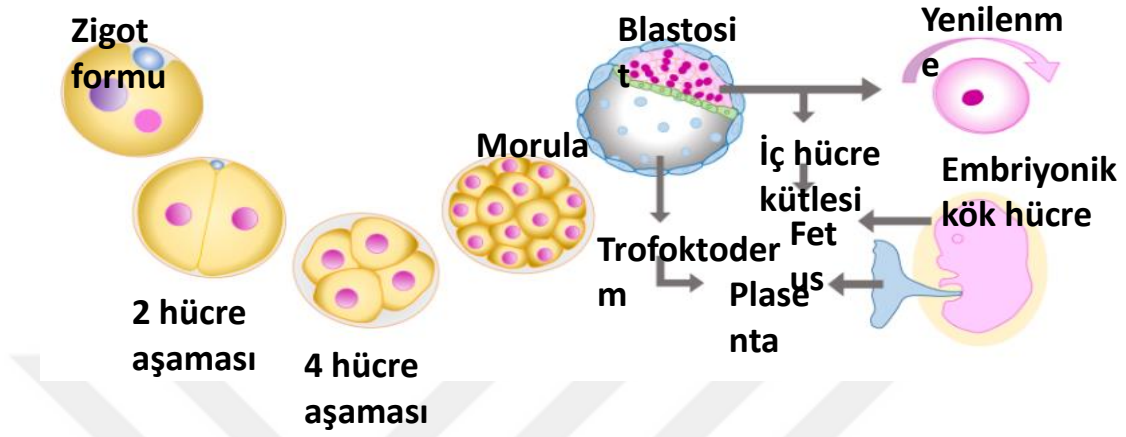
Kök hücreler; genel olarak embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Embriyonik kök hücreler totipotenttir ve üç embriyonik germ tabakasına farklılaşabilir. Erişkin kök hücreler olarak bilinen embriyonik olmayan kök hücreler ise multipotent özelliktedir ve farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyelleri daha sınırlıdır.

2.3.1 Embriyonik kök hücreler

İEKH'leri kendini yenileyebilme ve bütün hücre tiplerine farklılaşabilme özelliklerine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Sıçandan EKH eldesi ilk olarak 1981 tarihinde, insan embriyonik kök hücrelerin üretimi ise 1998 tarihinde gerçekleştirilmiştir.

Embriyonik kök hücreler, blastosit fazında embriyonun iç hücre kütesinden immuno-cerrahi yöntemi ile izole edilebilir ve genellikle embriyonik fibroblast hücrelerini içeren besleyici katmanlarda büyürler (Şekil 2.2). Yakın zamanda yapılan çalışmalar ile bu hücrelerin besleyici bir katman olmaksızın da büyüebildikleri gösterilmiştir. Bu

hücreler, kültürde farklılaşmamış halini 80 pasaja kadar sürdürerek kültürünün uzun ömürlü olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile insan EKH'lerinin keratinositlere, kondrositler ve osteositlere farklılaşabildiği gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Embriyonik kök hücre oluşumu (<http://www.ticeba.com>, 2017))

2.3.2 Erişkin kök hücreler

Erişkin kök hücreler ölü hücrelerin yerini almak ve hasarlı dokuları yenilemek üzere bölünen, vücutta bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Somatik kök hücre olarak da adlandırılırlar. Erişkin dokular normal hücre döngüsü sırasında ve yaralanmanın ardından doku yenilenmesi sırasında hücre yenilenmesini sağlayan özel kök hücre nişlerine sahiptir. Epidermis, saç, hematopoetik kök hücreler ve gastrointestinal sistem normal hücresel döngü sırasında kök hücelere katılan dokular için güzel örneklerdir. Bu kök hücre nişlerinin yerleri tam olarak anlaşılamamıştır; fakat kılcal damarlarda bulunan perisitlerle yakın ilişkisi olduğuna dair önemli kanıtlar vardır (Pittenger vd. 1999).

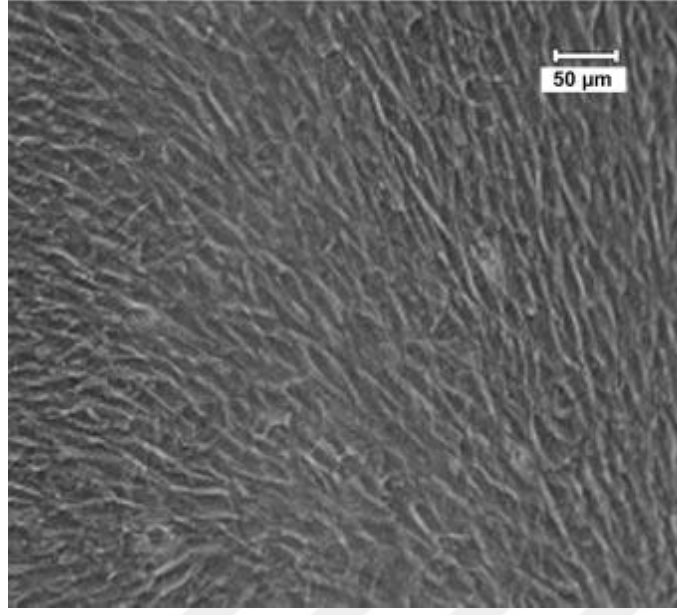
2.3.2.1 Kemik iliği kök hücreleri

2.3.2.1.1 Kemik iliği hematopoetik kök hücre

Hematopoetik kök hücreler kan akışında ve hedef dokularda etiketlenip izlenebilirler. Laboratuvarında izole edilip kültüre edilmelerini sağlayan özel morfolojik görünümlere ve hücre-yüzey işaretleyicilerine sahiptir. Hematopoetik kök hücreler, tüm kemik iliğinin % 0,05'ten daha azını temsil etmesine rağmen; tüm kan yapıcı hatları yeniden oluşturma potansiyeline sahiptir.

2.3.2.1.2 Kemik iliği stromal kök hücre

Bilim adamları, kemik iliği stromasını bağ doku hücrelerinin heterojen bir popülasyonu olarak tanımlamaktadır. Bu hücreler yapısal olarak kemik iliği hematopoezini desteklemektedir. Heterojen hücrelerin bu yapısı hematopoetik kök hücrelerin nişini oluşturur ve kemik iliği hücrelerini destekler. Bu hücreler arasında mezenşimi oluşturabilen farklılaşmamış multipotent hücrelerin alt popülasyonu bulunmaktadır. Bu hücreler tüm postnatal dokularda bulunur ve MKH olarak tanımlanır. Laboratuvarında kemiği, ligamenti, adipozu, kıkırdağı ve kası içeren birçok mezenkimal hücre hattına farklılaştırılabilir. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri çoğunlukla yoğunluk gradyanı santrifüjüyle ayırmadan sonra kemik iliğinin mononükleer tabakasından izole edilirler ve fibroblast benzeri yapı gösterirler (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Kemik iliği stromal kök hücrelerin kültürdeki görünümü (Olivares vd. 2004)

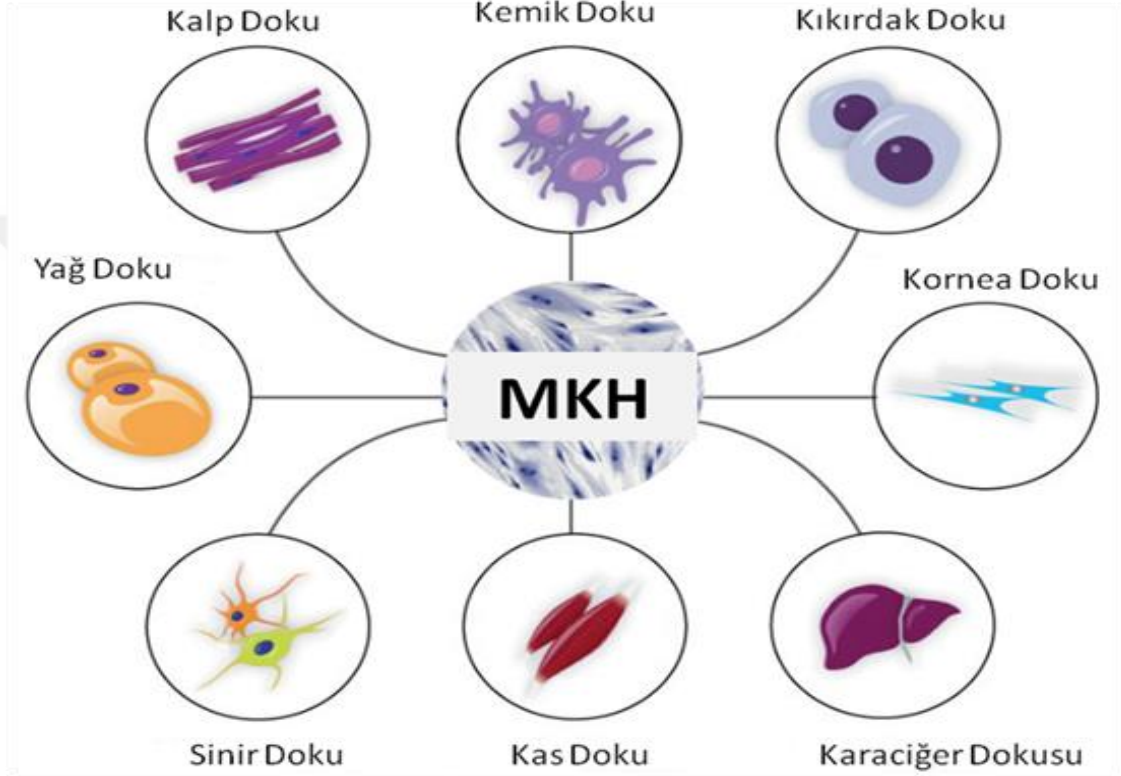
2.3.2.2 Multipotent erişkin öncül hücreler

Erişkin kemik iliği, multipotent erişkin progenitör hücreler olarak adlandırılan kök hücrelerden oluşan heterojen bir popülasyona sahiptir ve embriyonik kök hücrelerden izole edilen kök hücre popülasyonunu organize etmektedir (Jiang vd. 2002).

2.3.2.3 Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler kendini yenileyebilme ve birçok hücre tipine farklılaşabilme özelliklerine sahip fibroblast-benzeri hücrelerdir. Multipotent özelliktedir ve kolaylıkla yağ, deri ve kemik iliği içeren farklı dokulardan elde edilebilmektedir. Şu anda kemik iliği ve gingiva, mezenkimal kök hücrelerin birincil kaynakları olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler fibroblastik görünümündedir. Mezenkimal kök hücreler; kandan, sinovyum gibi hematopoetik olmayan dokulardan, adipoz doku, trabeküler kemik, dermis, dental siniri ve ciğerlerden elde edilebilmektedir.

Mezenkimal kök hücreler adipoz dokudan, tendondan, periodontal ligamentten, sinoviyal membrandan, trabeküler kemikten, kemik iliğinden, embriyonik dokudan, sinir sisteminden, deriden, periosteumdan ve kastan izole edilebilmektedir ve osteoblastlara, kondroblastlara, adipositlere ve miyoblastlara farklılaşabilmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Mezenkimal kök hücre farklılaşma potansiyeli (<http://www.stemcellclinic.com>, 2017)

Kaynak dokuların çeşitliliğine rağmen, mezenkimal kök hücreler ortak köken hipotezini destekleyen bazı ortak özellikler gösterirler. Uluslararası Hücre Tedavi Derneği (ISCT) MKH'ler için bu ortak özellikleri mezenkimal kök hücre olma kriterleri adı altında belirlemiştir (Dominici vd. 2006, Mammadov vd. 2011). Buna göre MKH'ler;

- Standart kültür koşullarında plastik kültür kabına yapışma özelliği göstermeli,
- Osteojenik, adipojenik ve kondrojenik soya farklılaşabilmeli

- CD73, CD90 ve CD105 yüzey antijenlerini ifade etmeli,
- Hematopoietik soya ait yüzey antijenleri olan CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 ve insan lökosit antijenlerini (HLA-DR) ifade etmemelidir.

Çizelge 2.1’de gösterildiği üzere mezenkimal kök hücrelerin izole edildiği kaynağa göre az da olsa farklılık gösteren temel yüzey antijenleri bulunmaktadır. Örneğin adipoz dokudan izole edilen mezenkimal kök hücreler CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD71⁺ iken; kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler CD44⁺, CD105⁺, CD166⁺, CD28⁺, CD33⁺ ve CD13⁺’tir.

Çizelge 2.1 Temel mezenkimal kök hücre tipleri için yüzey antijen profili

MKH	CD yüzey antijen ifadesi
Adipoz mezenkimal kök hücre	CD13 ⁺ ,CD29 ⁺ ,CD44 ⁺ ,CD71 ⁺ ,CD90 ⁺ , CD105/SH2,STRO-1 ⁺
Kemik iliği mezenkimal kök hücre	CD44 ⁺ , CD105 ⁺ , CD166 ⁺ , CD28 ⁺ , CD33 ⁺ , CD13 ⁺
Embriyonik kök hücre	SSEA 3&4 ⁺ , CD90 ⁺ , CD9 ⁺ , TRA-1-60 ⁺ , TRA-1-81 ⁺ , GCTM2 ⁺ , GCT343 ⁺
Hematopoetik kök hücre	CD34 ⁺ , CD90 ⁺
Periodontal ligament kaynaklı kök hücre	STRO-1 ⁺ , CD13 ⁺ , CD29 ⁺ ,CD44 ⁺ , CD59 ⁺ , CD90 ⁺ , CD105 ⁺
Sinoviyal kaynaklı mezenkimal kök hücre	CD44 ⁺ , CD73 ⁺ , CD90 ⁺ , CD105 ⁺

Günümüzde, insan mezenkimal kök hücrelerini kullanan yüzlerce klinik çalışma bulunmaktadır. Ancak, bu hücrelerin in-vitro multipotent kapasitesini inceleyen çok az

Çalışma mevcuttur. Mezenkimal kök hücrelerin "kök hücre" olarak adlandırılması hastaların bu hücrelerin anında hücre üreten dokulara farklılaştığını düşünmesine sebep olmaktadır. Arnold I. Caplan yayınladığı bir makalesinde mezenkimal kök hücre tanımının 'İyileştirici ve Tedavi Edici Sinyal reten Hücreler' olarak değiştirilmesi gerektiğine vurgu yapmıştır. Tıbbi sinyal hücresi tanımı hücrelerin yaranın ya da hastalığın bulunduğu yerde kalarak immunmodülatör ve tropik faktör olarak adlandırılan biyoaktif faktörlerin üretimini sağladıklarını anlatmak için kullanılmaktadır (Caplan 2017).

2.3.2.4 Adipoz kaynaklı kök hücreler

İnsan adipoz dokusu multipotent kök hücre kaynağıdır. Adipoz kaynaklı kök hücreler (AMKH) kondrojenik, adipojenik, osteojenik, hepatik ve nörojenik soyları içermektedir ve in-vitro ortamda diğer hücre hatlarına farklılaşma için uyarılabilirler. alışmalar göstermiştir ki bu hücrelerin transkripsiyonel seviyedeki fenotip ve genotipleri kemik iliği mezenkimal kök hcrelerinkine çok benzemektedir (Gimble vd 2003).

AMKH'ler yenileyici tıp için uygun bir kaynaktır ve popülasyon katlanması ve düşük senesans ile uzun periyotlar sürdürülebilmektedir. Kemik iliği kök hücreler için iyi bir kaynak olmasına rağmen eldesi zordur ve elde edilen hücre sayısı düşük olabilmektedir. Ayrıca, mononükleer hücrelerin yalnızca % 0,01-0,001'lik kısmı koloni oluşturan kemik iliğinden elde edilebilmektedir, fakat adipoz doku kök hücrelerin büyük bir kısmını sağlamaktadır ve bol bir şekilde elde edilir (Radtke vd. 2009, Reid vd. 2011). Adipoz kaynaklı kök hücreler in-vivo ve in-vitro ortamda osteojenik farklılaşma kapasitesine sahiptir (Halvorsen vd. 2001, Razavi vd. 2013). Zuk vd. (2002) adipoz yağ dokusunun multipotent kök hücreler için iyi bir alternatif kaynak olabileceğini göstermiştir.

2.3.2.5 Deri kök hücreleri

Deri vücuttaki en büyük organdır. Embriyonik ektoderm germ tabakasından elde edilir. 2001 yılında dermis tabakasından multipotent hücreler izole edilmiştir. Bu hücreler kültürde nöronları, glia, ince kas ve adipositleri içeren nöral ve mezodermal hücrelerin üretimi için çoğaltılmış ve farklılaştırılmıştır. Nestin-pozitif ve deri-kaynaklı öncül hücreler kök hücrelerin farklı bir tipidir. Deri kaynaklı öncül kök hücreler (SKP) periferik nöronların ve Schwann hücrelerinin benzeridir. SKP kaynaklı çoğu sinir hücresi 1-2 cm olacak şekilde sünnet derisini ve küçük parçalar şeklinde kafa derisini içeren insan dokusundan elde edilebilir. Deri-kaynaklı öncül kök hücreler sinir sisteminde yenileyici tıp için kullanılan nöral öncüller için uygun kaynaklardır.

2.3.2.6 Kardiyak kök hücreleri

Kardiyak kök hücreleri farklılaşmamıştır ve yetişkin memeli kalbinde bulunur. Bu hücreler erişkin kalpteki devam eden hücrelerin onarımı ve yerine konması için endojen mekanizmalara aracılık eder. Kardiyak öncül hücreleri multipotenttir ve kök hücrelerin önemli özelliklerine sahip olduğundan dolayı in-vivo ortamda kardiyomiyosit ve koroner damar oluşumuna neden olurlar. Kardiyak kök hücreleri hastalardan izole edilebilir ve önemli sayıda hücre elde etmek amacıyla ex-vivo ortamda kültüre edilebilirler (Beltrami vd. 2003).

2.3.2.7 Pankreatik kök hücreler

Memeli erişkin pankreası duktal ağaç, eksokrin asini ve endokrin langerhans lezyonları olmak üzere üç tip dokuya sahiptir. Multipotent hücre öncülleri erişkin kemirgenlerde ve insan pankreasında adacıklar ve kanallar içinde bulunmaktadır. Pankreatik kök hücreler insan fetal pankreasından elde edilir.

2.3.2.8 Nöral kök hücreler

Nöral kök hücreler (NKH) merkezi sinir sisteminin temel hücrelerdir ve sinir sisteminde nöron, astrosit ve oligodentrositleri oluşturan ve kendini yenileyebilen, multipotent hücrelerdir. Kök hücrelerin, merkezi sinir sistemini oluşturan 100 milyondan fazla nörona farklılaşması, omurgalıların gelişimi sırasında en dikkat çeken dönüşümlerden biridir (Bergsland 2010). Fetusta ise nöral kök hücreler sinir sisteminin gelişimine katılmaktadır. Kök hücreler hücrel homeostaza ve hasar sonrası yenilenmeye katıldıkları erişkin memelilerde çeşitli dokularda bulunmaktadır (Vishwakarma vd. 2011). Merkezi sinir sistemi, diğer erişkin dokulardan farklı olarak, hasarın iyileşmesinde sınırlı kapasiteye sahiptir. Diğer yetişkin dokuların aksine, merkezi sinir sisteminin kök hücrelerden yoksun olduğuna dolayısıyla da yeni sinir hücresi üretme kapasitesinin olmadığına inanılıyordu. 1960'lı yıllarda Altman ve Das tarafından yapılan çalışmalar ile erişkin beyinde yeni nöronal hücrelerin üretiminin olduğuna dair ipuçları elde edilmiştir.

Sonraki yıllarda, nöral progenitör ve kök hücrelerin in-vitro ve in-vivo olarak tanımlanması için yeni teknolojilerin ortaya çıkmasıyla desteklenen çalışmalar ile nöroenezin yetişkin beyinde meydana geldiği ve nöral kök hücrelerin merkezi sinir sisteminde bulunduğu düşüncesine katkıda bulunulmuştur. Böylelikle, uzun süredir devam etmekte olan belirli sayıda sinir hücresi ile doğduğumuz ve beynin yeni nöronlar üretip kendini yenileyemediği düşüncesi altüst olmuştur.

Nöral kök hücreler kendini yenileme kapasitesi ve bütün nöral soyları oluşturabilme özelliği ile klonojenik hücreler olarak da tanımlanabilmektedir. Bu özelliklere sahip hücreler embriyonik ve yetişkin merkezi sinir sisteminden izole edilirler.

Reynolds, Weiss ve arkadaşları nöral kök hücreleri ilk kez tam anlamıyla izole etmiş olsa da daha önce yapılan çalışmalar bu sonuçlara zemin hazırlamıştır. Örneğin, Raff ve arkadaşlarının in-vitro çalışmalarında, oligodendrositler ve astrositler için ortak bir öncülün varlığı gösterilmiştir. 1992 yılında Reynolds, Weiss ve arkadaşları, hücrelerin erişkin ve embriyonik fare merkezi sinir sisteminden izole edilebileceğini ve izole

edilen bu hücrelerin nöroküre adı verilen hücre kümelerinin oluşumunu sağlayan epidermal büyüme faktörü varlığında çoğaltılabileceğini ortaya koymuştur. Nöronları ve glia hücrelerini içeren bu nöroküreler tek bir hücreden üretilebilir ve daha sonra ayrışarak nöronları ve gliaları içeren yeni bir nöroküre oluşturabilir. Nöroküre oluşumunu sağlayan bu tip hücreler kendini yenileme ve multipotent olma gibi kök hücre özelliklerine sahiptir. Bu hücreler özel koşullar altında; nöronlara, glia ve nöral olmayan hücrelere farklılaşabilirler ya da uzun süreli kültürlerde nöroküre adı verilen hücre kümeleri gibi çoğalabilirler. Bu hücreler nörogelişimsel çalışmalar için yararlı bir model oluşturmaktadır ve hücre yenileme tedavileri için potansiyel hücre kaynağı olarak kullanılabilmektedir (Neuhuber vd. 2011).

2.3.2.8.1 İzolasyon, kültür ve nörojenik farklılaşma

Nöral kök hücreler embriyonik ve yetişkin merkezi sinir sisteminden (Reynolds vd. 1992) izole edilirler. Nöral kök hücrelerin diğer bir kaynağı ise tüm embriyonik soyların öncüllerini oluşturan embriyonik kök hücrelerdir (Trophepe vd. 2001). Sıvı kültürde, nöral kök hücreler nöroküre olarak adlandırılan küresel hücre kümeleri şeklinde çoğalırlar. Bu hücreler genellikle EGF ve/veya bFGF ilave edilmiş serum içermeyen besiyerinde çoğaltılırlar (Reynolds vd. 1992). Sinir kök hücrelerini kesin olarak tanımlamak için belirli belirteçler bulunmadığından, bu hücreler yalnızca kendini yenileme kapasiteleri ve nöron, astrosit ve oligodentrositleri oluşturmalarını sağlayan multipotent özellikleri ile tanımlanırlar (Loeffler ve Potten 1997). Yapılan çalışmalar bir nöroküredeki hücrelerin yalnızca % 0,3-16 oranında küçük bir kısmının multipotent kök hücre olduğunu göstermiştir. Bu küreler genel olarak mitotik bölünmenin farklı evrelerindeki ve interfaz evresindeki sağlıklı hücrelerden ve apoptotik ve nekrotik süreçlerin farklı evrelerindeki hücrelerden oluşmaktadır (Bez vd. 2003). Askıda bulunan nöroküreler yapışkan alt tabakaya bağlandığında ve mitojenler uzaklaştırıldığında, kök/progenitör hücreler kürelerden ayrılır ve nöron ve glia hücrelerine farklılaşır (Gage vd. 1995). Buna rağmen; merkezi sinir siteminden elde edilen bazı kök hücreler farklılaşma için mitojenlerin uzaklaştırılmasına gerek duymaz (Reynolds ve Weiss 1992, Arsenijevic vd. 2001).

Yapılan çalışmalarda standart prosedürlere göre izole edilen mezenkimal kök hücrelerin bir dizi indükleyici faktöre maruz bırakıldığında nöral farklılaşma gösterdiği rapor edilmiştir (Sanchez-Ramos vd. 2000, Deng vd. 2001, Woodbury vd. 2002, Levy vd. 2003, Munoz-Elias vd. 2003, Rismanchi vd. 2003, Dezawa vd. 2004). Ayrıca birçok çalışma kemik iliği hücrelerinin potansiyel nöral öncül hücre kaynağı olabileceğini ve nöronal doku onarımında klinik olarak önemini göstermiştir (Yamaguchi vd. 2006). MKH'ler, kemik iliğinde bulunan hematopoietik olmayan öncül hücrelerdir. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler kemik iliği stromal hücreleri olarakta bilinmektedir ve adipositlere, kondrositlere, miyositlere ve nöronlara farklılaşma kapasitesine sahiptir (Jung vd. 2009). Mezenkimal kök hücrelerin nöronal farklılaşması aşamalı olarak gerçekleşir ve sınırlı bir süre içerisinde belirli genetik olaylarla düzenlenir (Cai vd. 2002, Kintner 2002). Bu kademeli nöronal indüksiyon ve farklılaşma in-vitro embriyonik kök (ES) hücreler (Lee vd. 2000) ve embriyonik (Mayer-Proschel vd. 1997) veya yetişkin (Takahashi vd. 1999) sinir kök hücreler ile gösterilmiştir.

MKH'ler sinir köprüleri boyunca akson yenilenmesini desteklemektedir. Ancak bunların farklılaşma kapasitesi ve sinir yenilenmesini destekleme özelliğiyle ilgili hala çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ladak ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada; Sprague-Dawley sıçanlarının kemik iliğinden izole edilen MKH'ler plastiğe tutunma ve pluripotent özellikleri ile karakterize edilmiştir. İzole edilmiş ve farklılaştırılmamış MKH'ler, spesifik büyüme faktörleri kullanılarak schwann hücre (SH) fenotipine doğru uyarılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile; kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sınırlı nörit büyümesini destekleyen Schwann hücre fenotipine farklılaştığı gösterilmiştir (Lu vd. 2004).

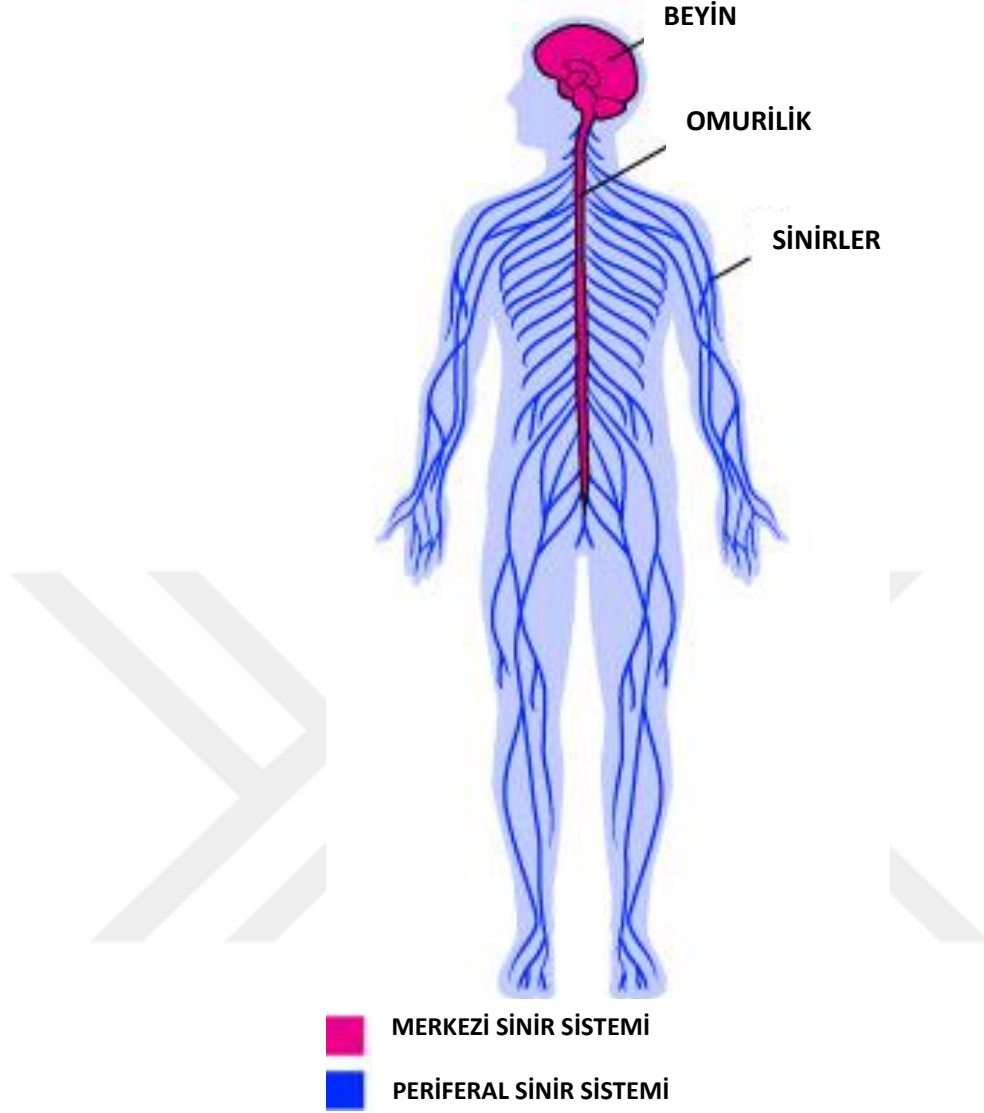
Kamishina ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada köpek kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin nöroküre benzeri kümeler oluşturabildiği ve nöronal işaretleyicileri ifade eden nöron-benzeri hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir.

Bu çalışmalardan bazıları insan ve kemirgen mezenkimal kök hücrelerden nöral hücrelerin kolay kimyasal yöntemlerle, yüksek oranda ve hızlı bir şekilde elde edilebileceğini göstermiştir (Woodbury vd. 2000, Woodbury vd. 2002). Bu tür çalışmalarla in vitro nörojenik farklılaşma hücre morfolojisindeki değişiklikler ve NSE (Nöron Spesifi Kenolaz), NeuN (Nöral Nükleer Antijen) ve Tau gibi temel antijenlerin ifadesi ile gösterilmiştir.

Sıçan beynine nakledilen insan mezenkimal kök hücrelerinin hayatta kalması ve g etmesi, bu tür hücrelerin merkezi sinir sistemi tedavisinde uygun araçlar olabileceğini göstermiştir. Bu düşünce fare mezenkimal kök hücrelerinin neonatal fare beynine implantasyonundan sonra olgun astrositlere dönüşebileceği gösterilerek daha da güçlenmiştir. Donör mezenkimal kök hücrelerin yetişkin fare beynine nakledildikten sonra nöronal fenotiplere neden olduğu da ayrıca rapor edilmiştir (Lee vd. 2010). Son yıllarda, farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin in vitro nöronal transdiferansiyonuyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu araştırmalar için kullanılan protokollerin hepsi kimyasal bileşenleri, büyüme faktörlerini ya da nöroküre benzeri ekimi içermektedir. Ayrıca, bu farklı protokollerin kombinasyonunda nöral farklılaşmaya neden olduğu gösterilmiştir (Chen vd. 2014).

2.4 Sinir Doku

Sinir dokusu, değişik birimlerden oluşan bir iletişim ağı halinde vcoda dağılmış durumdadır. Anatomik olarak sinir dokusu, beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemi ile sinir lifleri ve sinir hücrelerinin küçük kümeleri olan sinir gangliyonlarından oluşan çevresel sinir sistemi olarak sınıflandırılmaktadır (şekil 2.5).



Şekil 2.5 Sinir Dokusu (<https://askabiologist.asu.edu> 2011)

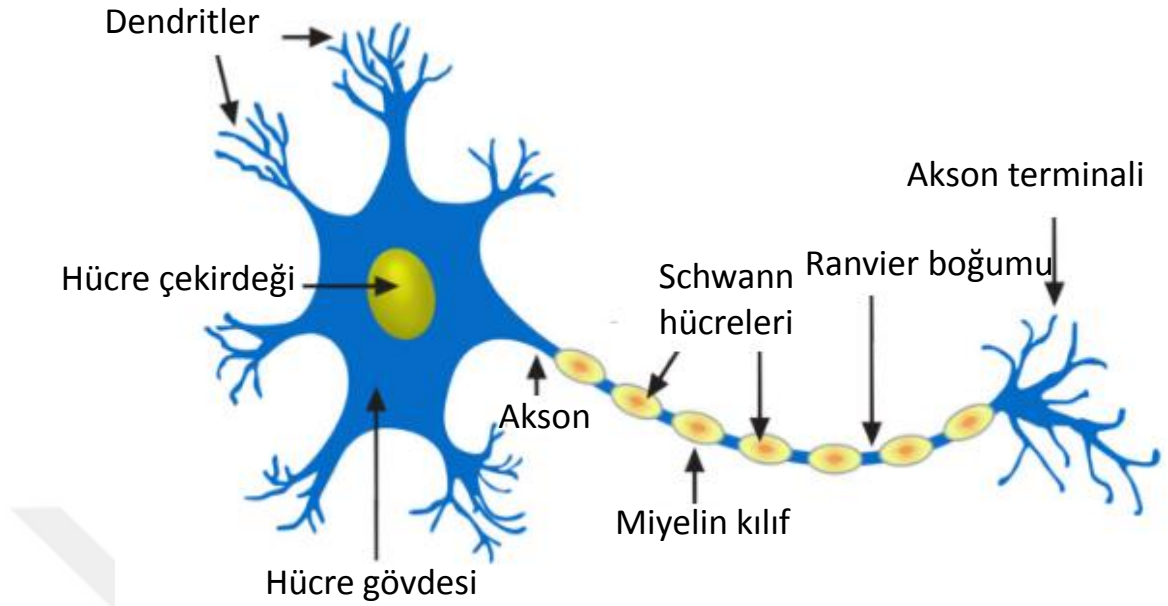
2.4.1 Sinir dokuyu oluşturan hücre tipleri

Sinir dokusu nöronları, nöroglia hücrelerini ve az miktarda gevşek bağ dokusunu içeren bir doku tipidir. Nöronlar, sinir dokusunu oluşturan ana hücrelerdir ve sinir uyarılarını oluşturarak ve ileterek vücutta bilgi aktarımını sağlarlar. Nöroglia hücreleri ise sinir dokusunda destek görevi yapmaktadır.

2.4.1.1 Nöronların yapısı ve fonksiyonu

Galvani 1791 yılında sinir enerjisinin elektriksel olduğunu gösterdikten sonra sinirlerin nasıl çalıştığıyla ilgili daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmuştur. Örneğin, 19. yüzyılın başlarına kadar bir sinirin nasıl çalıştığıyla ilgili gerçek bir bilgiye ulaşılamamıştır. Robert Hooke tarafından 1665 yılında mikroskop bulunmuştur ve Anton Von Leeuwenhoek tarafından biyolojik dokularla ilgili çalışmalarda kullanılmıştır. Maalesef, 1830'larda mikroskop lensleri geliştirilene kadar mikroskoplar nöral yapıyı detayları ile gösterememiştir. 1800'lü yıllarda histologlar sinir dokusunu güçlendirmek için yeni yollar bulmuş olmalarına rağmen; yapılan çalışmalarda ayırım gözetmeksizin bütün nöronlar boyanmıştır. Bu sonuçla birlikte bir nöronun görselleştirilmesinin tek yolunun gömülü bulunduğu karışık hücrelerin kütesinden uzaklaştırmak olduğu anlaşılmıştır. Nöronlar gözle görülemeyecek kadar küçük oldukları için bu durum yapılan çalışmaların son derece zor olduğunu ve histologların nadiren başarılı olduklarını göstermiştir.

Bununla birlikte, 1875 yılında, İtalyan anatomist Camillo Golgi'nin tek bir sinir hücresinin gözlenmesini sağlayan bir boyayı bulmasıyla bilim dünyasında büyük bir gelişme sağlanmıştır. Güzel bir tesadüf sonucu, Camillo tarafından sinir dokusunun gümüş nitrata maruz bırakılmasıyla, sinir hücrelerinin siyaha döndüğü bulunmuştur. Bu gelişme, sinir hücrelerinin mikroskop altında açıkça görülebilmesini sağlamıştır. Ancak daha da önemlisi, Golgi'nin tekniği ile ilgili herhangi bir dilimdeki sinir dokusundaki hücrelerin sadece % 2'si boyanmıştır. Tek bir nöronun ve bu nörondaki dendrit ve aksonların daha net bir şekilde gözlemlenebilir olması büyük bir gelişme olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.6). Bu yöntem beyindeki hücrelerin incelenmesinin yakın zamanda mümkün olabileceğinin kanıtı olarak gösterilmiştir. Nitekim şu anda sinir hücrelerini tanımlamak için kullanılan birçok terim anatomistler tarafından o zamanlarda ortaya atılmıştır.



Şekil 2.6 Nöronun yapısı (<https://training.seer.cancer.gov>,)

Golgi boyasını en çok kullanan kişi bu tekniği kullanarak beynin nöral anatomisini tanımlayan Spaniard Santiago Ramón y Cajal (1852–1934)'dır. Cajal, beynin farklı özelliklere sahip birçok hücre çeşidini içerdiğini göstermiştir. Bazı hücreler aynı yapıdaki hücrelere uzanan kısa aksonlara sahip olsalar da, diğerleri beynin uzak bölgelerine uzanan yollar oluşturan uzun aksonlara sahiptir. Ramón y Cajal nöronların nasıl çalıştığını açıklamaya da yardımcı olmuştur ve bilgilerin sinir hücreleri ve beyin yolağı arasında nasıl iletildiğini gösteren ilk kişilerdendir. Ayrıca Ramon' un nöroanatomiye en büyük katkısı sinir hücrelerinin ayrı ve özgün birimler oluşunu göstermesidir. Daha önceleri, sinir hücrelerinin, hücreden hücreye doğrudan bilgi geçişine izin veren bir tüp ağında bir araya getirildiği düşünülmüştü. Aslında, Golgi, 'retiküler' teorisinin şiddetli destekçisiydi. Buna rağmen; Ramón y Cajal sinir hücrelerinin bu yola katılmadığını göstermiştir. Daha doğrusu, akson terminalleri bağlantı halinde bulundukları nöronlara (veya dendritlere) çok yakın bulunurlar fakat temas etmezler. Başka bir deyişle; her nöron küçük bir boşlukla komşusundan ayrılan özgün birimlerdir. Bu boşluklar 1897 yılında İngiliz nörofizyolog Charles Sherrington tarafından sinaps olarak adlandırılmıştır. Bu buluş sinir hücrelerinin bilgiyi sinapslarda

nasıl ilettiği ve sinaptik iletimin postsinaptik nöronda yeni bir elektriksel sinyali nasıl oluşturduğuyla ilgili birçok yeni soruyu gündeme getirmiştir.

Golgi'nin buluşunu takiben, sinir hücrelerinin detaylı incelenmesi amacıyla birçok boyama tekniği geliştirilmiştir. Örneğin, bazı teknikler özellikle hücre gövdesini boyamaktadır. Diğer durumlarda, daha faydalı bilgiler elde etmek amacıyla boyama teknikleri lezyon metotlarıyla birleştirilmiştir. 20. yüzyılın başlarında, nöroanatomi çalışmaları oturmuş bir disiplin haline gelmiştir.

Nöronlar hücresel sinyallerin işlenmesi ve aktarımı için özelleşmişlerdir. Sinir sisteminin farklı bölümlerinde nöronlar tarafından gerçekleştirilen fonksiyonların çeşitliliği, şekil, büyüklük ve elektrokimyasal özelliklerin farklılığı ile sağlanmaktadır. Örneğin, bir nöronun çekirdeğinin büyüklüğü 4 ile 100 μm arasında değişebilmektedir. Hücre gövdesi nöronun merkezi kısmıdır, hücre çekirdeğini içerir ve protein sentezinin gerçekleştiği yerdir.

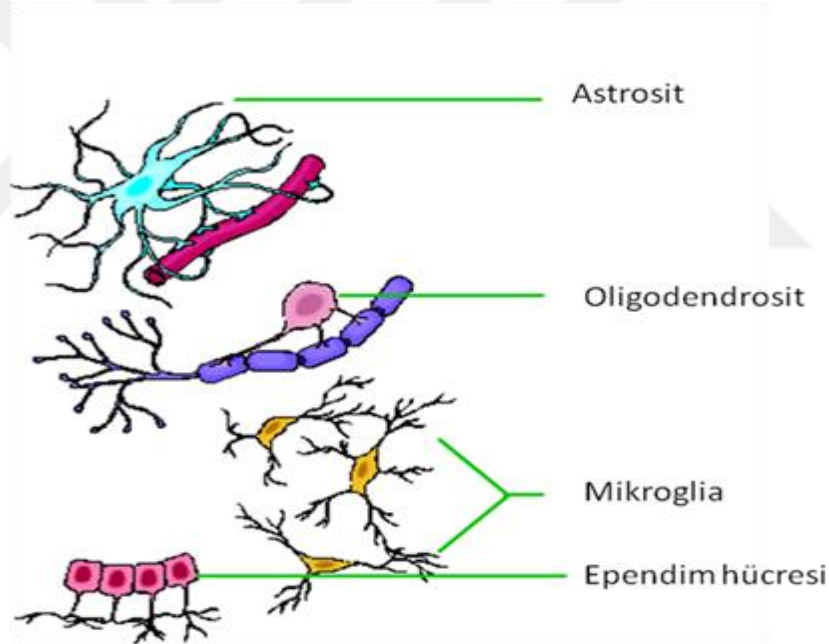
Çekirdeğin boyutu 3 ile 18 μm arasında değişmektedir. Dendritler nöronların hücresel uzantılarıdır ve dendritik ağaç şeklinde bir yapı göstermektedir. Bu yapı nörona bilgi girişinin yapıldığı yerdir ve bu tek yönlü sinir uyarısının iletimine bir örnektir. Aksonlar somanın uzunluğunu 10, 100 ve bazen de 1000 kez artıran ince, kablo şeklinde çıkıntılardır. Akson, sinir sinyallerini hücre gövdesinden alır ve taşır. Çoğu nöron yalnızca bir aksona sahiptir ve bu akson yüksek miktarda dallanma göstermektedir. Böylece hedef hücrelerle iletişimi kolaylaştırmaktadır. Hücre gövdesinde ortaya çıkan akson parçasına akson tepeciği adı verilmektedir. Akson tepeciği anatomik yapı olmasının yanı sıra, nöronun voltaj-bağılı sodyum kanallarındaki en yüksek yoğunluğa sahip kısmıdır.

2.4.1.2 Nöroglia

Nöroglia hücreleri (genellikle glia hücreleri veya glia olarak adlandırılırlar) sinir hücrelerinden oldukça farklıdır. Bu hücrelerin işlevleri; sinaptik temasların tanımlanmasına ve nöronların sinyal kabiliyetlerinin korunmasına yardımcı olmaktır.

Glia hücrelerinin sinir hücrelerinden en temel farkı ise doğrudan sinaptik etkileşimlere ve elektriksel sinyalizasyona katılmamasıdır.

Beyindeki glia hücrelerinin sayısı sinir hücrelerinden çok daha fazladır. Nöroglia hücreleri; merkezi sinir sisteminde bağ dokusu işlevini yerine getirmektedir. Glia hücrelerinin hücre gövdelerinden yayılan karmaşık yapıları olmasına rağmen genellikle nöronlardan daha küçük hücrelerdir. Aksonları ve dendritleri yoktur (Şekil 2.7). Glia terimi; (Yunanca "tutkal" kelimesinden gelen), bu hücrelerin sinir sistemini bir şekilde bir araya getirdiği 19. yüzyıl varsayımını yansıtmaktadır. Bu hücreler; sinir hücrelerine mekanik destek sağlarlar (Purves 2001). Glia hücreleri; sinir hücrelerinin iyonik ortamının muhafaza edilmesinde, sinir sinyali yayılım oranının ayarlanmasında ve nörotransmitterlerin salınımını kontrol edilmesi gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır.

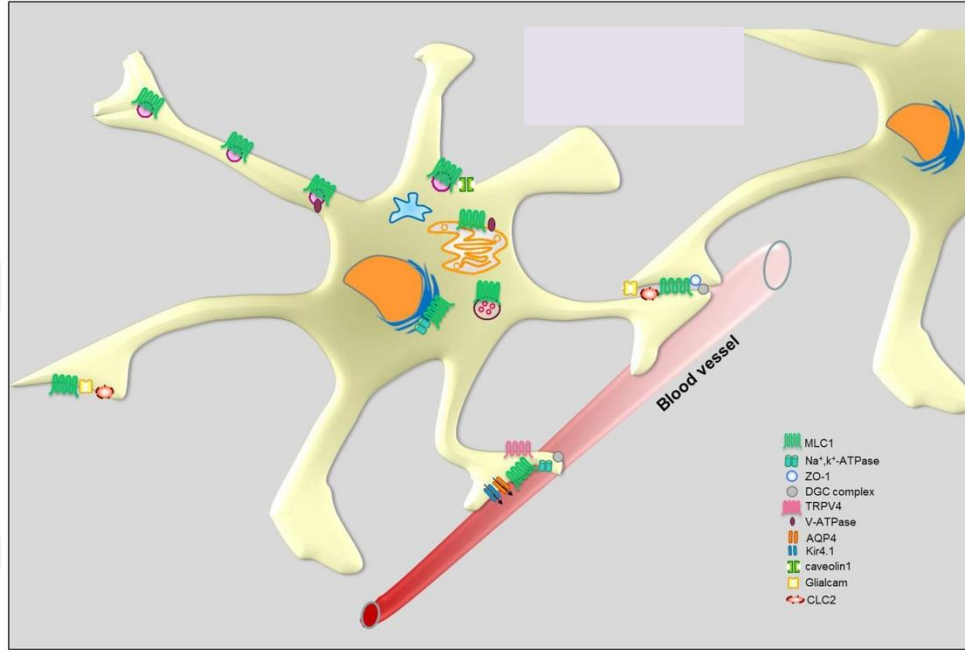


Şekil 2.7 Nöroglia hücrelerinin yapısı (<https://www.shutterstock.com>, 2017)

2.4.2.2 Astrositler

Astrositler, sayıca nöronlardan yaklaşık beş kat fazla olan özel glia hücreleridir (Şekil 2.8). MSS'nde birbirlerine bitişik halde bulunurlar ve sağlıklı MSS'de birçok karmaşık fonksiyonu yerine getirirler. Sinir doku hasarlarında kaybedilen sinir ve glia

hücrelerinin yerini astrositler almaktadır. Astrositler astrogliazis olarak adlandırılan ve MSS yapısal lezyonlarının patolojik bir işareti haline gelen süreçle MSS travmalarının her şekline yanıt vermektedir. Yakın zamanda, reaktif astrogliazisin fonksiyon ve mekanizmalarının belirlenmesinde ve MSS bozukluklarında astrositlerin rolünün anlaşılmasında önemli ilerleme kaydedilmiştir (Sofroniew vd. 2010).

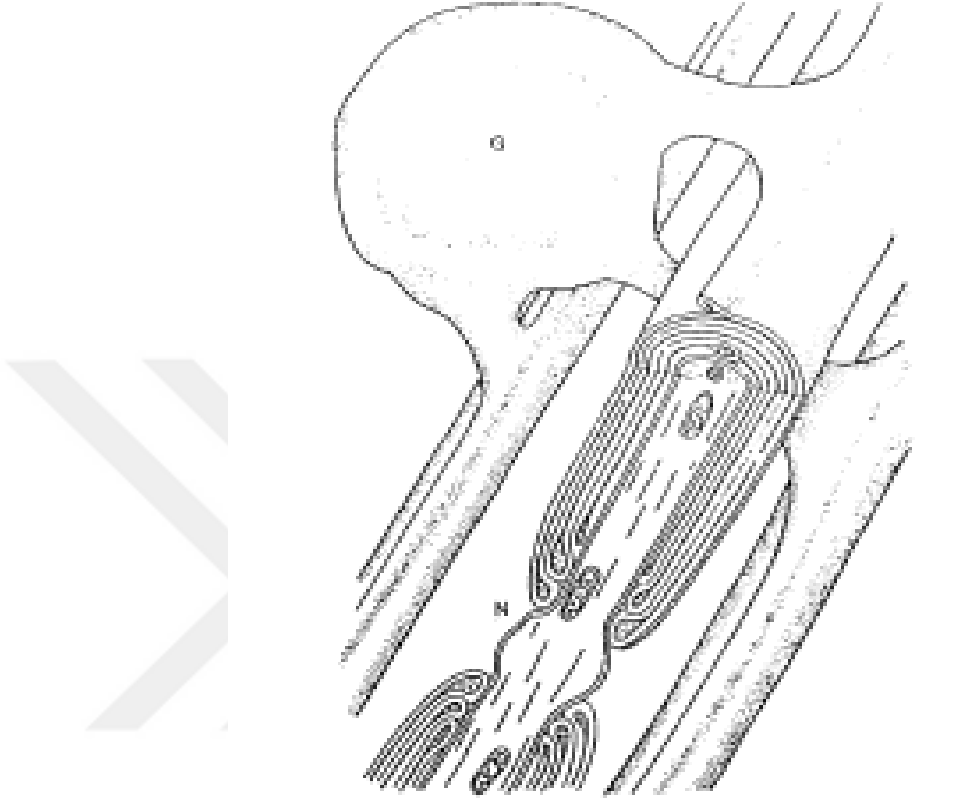


Şekil 2.8 Astrositin yapısı (Brignone vd. 2015)

2.4.2.3 Oligodentrositler

Oligodentrosit terimi, ilk olarak Rio Hoterga (Hoterga 1921) tarafından, metalik emdirme tekniği ile boyanmış maddedeki nöroglia hücrelerini tarif etmek üzere kullanılmıştır. Oligodentrositler esas olarak miyelin oluşturan hücrelerdir ancak miyelin kılıfı ile doğrudan bağlantılı olmayan satelit oligodentrositleri de bulunmaktadır (Penfield 1932). Satelit oligodentrositler perinöronaldır ve nöronların etrafındaki mikro ortamı düzenlemek için görev yapmaktadır (Ludwin 1997). Oligodentrositler astrositlerden aldıkları oksijeni, glukozu ve aminoasitleri nöronlara aktarmakla görevlidir. Özellikle küçük boyutları, hem sitoplazma hem de çekirdekteki yüksek yoğunluğu (yoğun

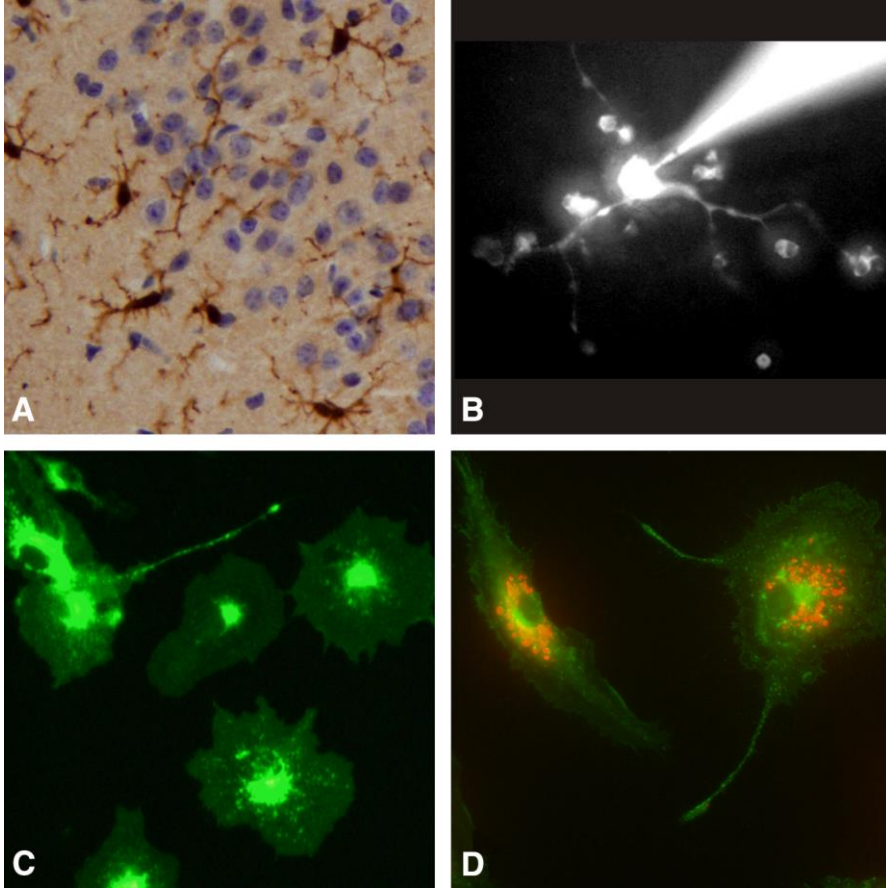
kromatin ile) ve ara filamentlerin (fibriller) ve glikojenin bulunmaması gibi birçok özellik, astrositlerden ayırdedilmesini sağlamaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Oligodentrosit ve miyelin kılıf (Bauman vd. 2001)

2.4.2.4 Mikroglialar

Merkezi sinir sisteminin bağışıklık hücreleri olan mikroglia hücreleri; gelişim döneminde, yetişkinlikte ve yaşlanma sırasında MSS homeostazında önemli rol oynamaktadır. Özel gelişimsel nişlerden gelişen mikroglialar uzun ömürlü, bölgesel olarak değiştirilmiş ve periferal immun sistem ve merkezi sinir sistemi arasındaki iletişim yolunun önemli bir kısmını oluşturan hücrelerdir (Şekil 2.10). Mikroglia fonksiyonları MSS mikro çevresi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir ve nörodejenerasyon ve yaşlanma gibi durumlarda sayısının arttığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Perry vd. 2013).



Şekil 2.10 Beyin dokusu ve kültürlerinde fare mikrogliası (Kettenmann vd. 2011)

a. Fare korteksinde Iba1'in boyanması ile açığa çıkan mikrogliya b. Beyin dokusundaki mikrogliya c. Hücreler, FITC ile konjüge edilmiş ILB4 ile boyanmıştır d. Mikrogliya hücreleri FITC-ILB4 ile boyanmıştır

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

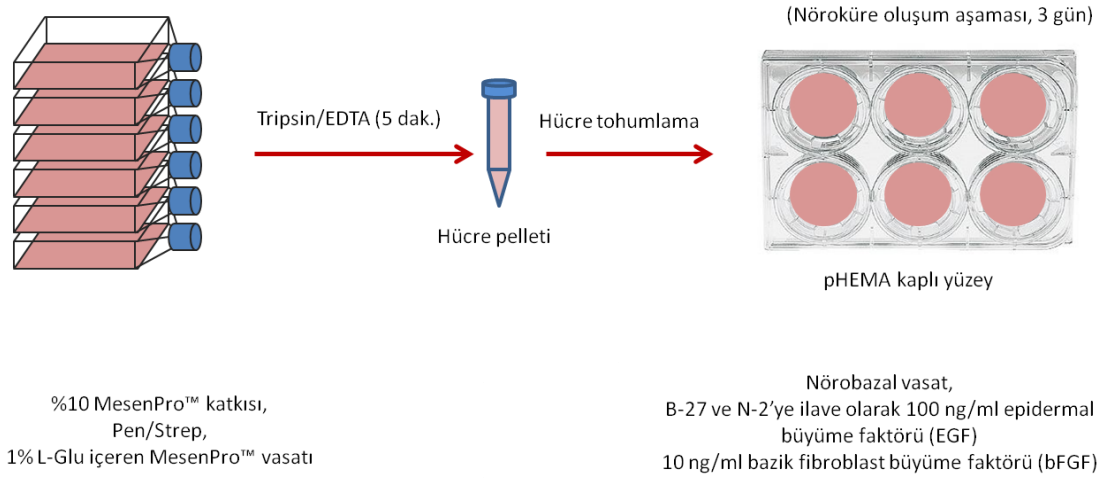
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (HADYEK)'na yapılan başvuruda, yapılan deneysel çalışmalarda herhangi bir etik kurul kararına ihtiyaç olmadığı şeklinde bir karar verilmiştir. Bunun sebebi, çalışmalarda trafik kazası ya da benzer sebeplerle ağır yaralanmış ve ölmek üzere olan köpeklerin tercih edilmiş olmasıdır. Böylece hem sağlıklı köpeklere zarar verilmemiş olup, hem de köpek mezenkimal kök hücreleriyle çalışma yapma şansı elde edilmiştir.

Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'ne getirilen üç farklı köpeğin iliak krestinden izole edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin kültüre edilmesiyle deneysel çalışmalar başlatıldı. Hücreler 10,000 U/mL Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Grand Island, NY, A.B.D.) ve % 1 L-Glutamin (L-Glu) (Invitrogen) içeren α -MEM (Minimum Essential Medium Alpha Modification) vasatında (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, İsveç), yaklaşık 1 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. İlik aspiratı, tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile üç defa süspanse edilip 5 dakika süre ile santrifüj edildi (25 °C ve 1100 devir/dakika). Elde edilen hücre pelleti, % 10 fetal sığır serumu (FBS) (Lonza, Basel, İsviçre), Pen/Strep ve % 1 L-Glu içeren α -MEM vasatı içinde süspanse edildi. Kültür işlemi, % 5 CO₂- % 95 hava ve % 90 nem içeren 37 °C sıcaklığa ayarlı karbondioksitli inkübatörde gerçekleştirildi. Sıfırıncı pasaj, hücreler yaklaşık olarak % 80 bolluğa ulaşınca kadar sürdürüldü. Pasajlama işlemi, % 0,05 Trypsin/0,53 mM etilen diammin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirildi. Kemik iliği MKH'leri, P-2 aşamasına kadar çoğaltıldılar.

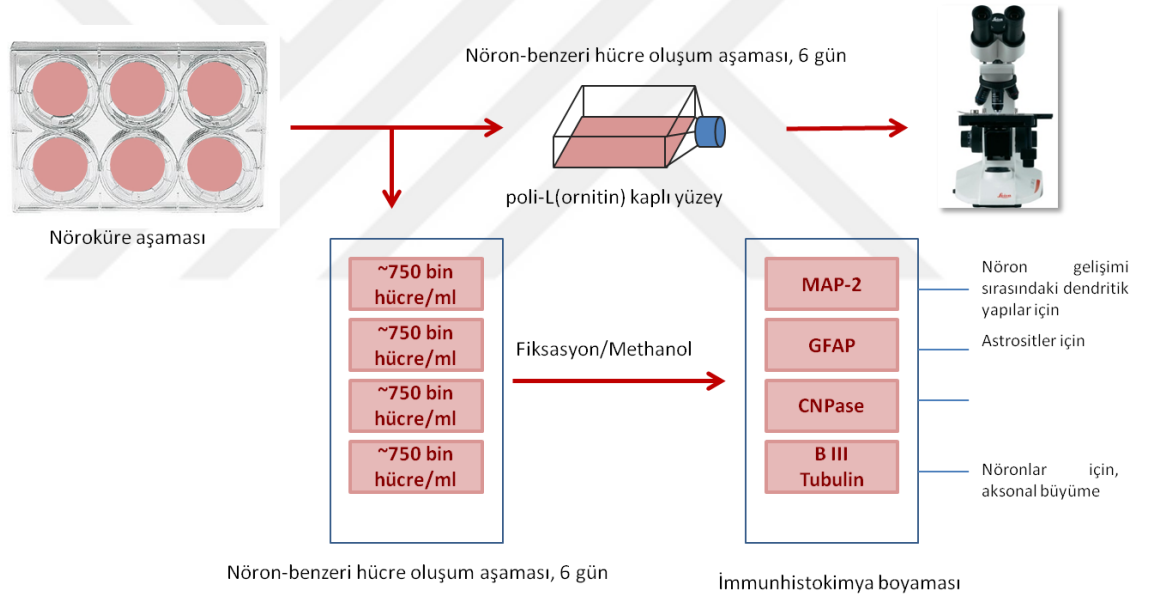
Nörojenik indüksiyonun ilk basamağında köpek kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, laboratuvarında daha önceden yüzeyleri poli(hidroksietil metakrilat) (pHEMA) (Sigma) ile kaplanıp sterilize edilen kültür kaplarına aktarıldı. MKH'ler, Pen/Strep, ve % 1 L-Glu içeren nörobazal nörobazal vasatta (Neurobasal™ medium; Invitrogen) kültür

işlemine alındı. Üç gün süre ile kültür işleminde kullanılan nörobazal vasat, B-27 ve N-2'ye ilave olarak 100 ng/mL epidermal büyüme faktörü (EGF) (Millipore, A.B.D.) ve 10 ng/mL bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) (Millipore, , A.B.D.) içermektedir (Şekil 2.11).

Bu aşamadan sonra nörojenik farklılaşmanın ikinci basamağı olan nöron-benzeri hücre oluşum aşamasına geçildi. Nöroküreler Tripsin/EDTA kullanılarak dağıtıldı ve üç defa PBS ile yıkandı. Bu şekilde nöroküreleri oluşturan hücrelerin süspansiyonu elde edilmiş oldu. Elde edilen hücre süspansiyonu, yüzeyleri laboratuvarı poli-L-(ornitin) (Sigma) ile kaplanıp sterilize edilen T75 ve 4 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı. Hücreler, 100 ng/mL sinir büyüme faktörü (NGF) (Millipore), 10 ng/mL beyin-kaynaklı nörotofik faktörü (BDNF) (Millipore), B-27 ve N-2 içeren nörobazal vasatta (Neurobasal™ medium; Invitrogen) altı gün süre ile kültüre alındılar (Şekil 2.12). İkinci indüksiyon aşaması sonunda nörojenik nesile farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin immunhistokimyasal boyamalar yapıldı. Nörojenik nesile farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin antijenik işaretçilerle tanımlanması için astrositlerde bulunan hücre yüzey antijenine özgü anti-Gliyal Fibriler Asidik Protein (anti-GFAP) (1:500) (Abcam), oligodendrosit ve schwann hücrelerine özgü anti-2',3'-Siklik Nükleotid--3'-Fosfodiesteraz (anti-CNPaz)(1:250) (Abcam), nöronlara özgü ise anti-nöron spesifik beta III tübülün (1:10) (Abcam) ve mikrotübül-bağlantılı protein 2 kinazlar (MAP2)'dan olan anti-ERK1 (pT202/pY204) + anti-ERK2 (pT185/pY187) (1:200) (Abcam) birincil antikorları kullanıldı.



Şekil 3.1 Nörojenik farklılaşmanın birinci basamağının şematik gösterimi



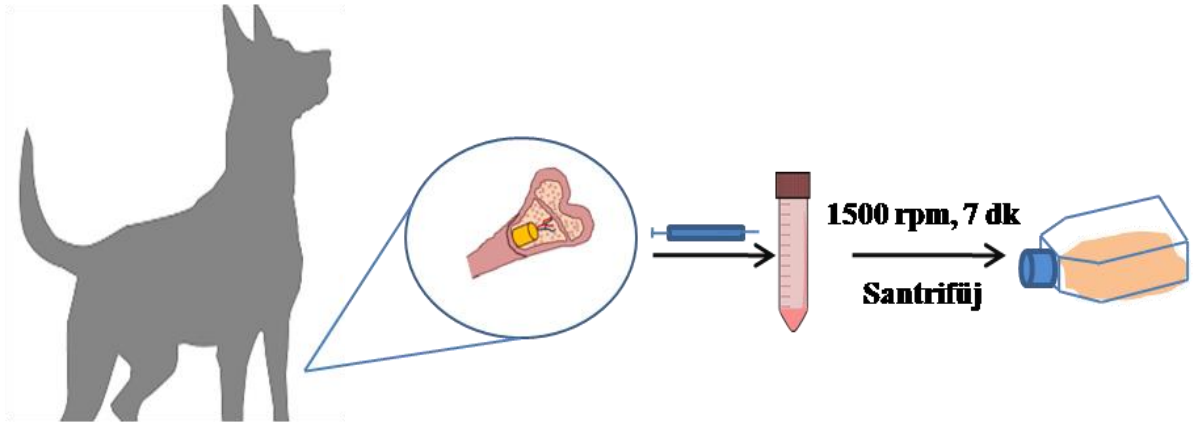
Şekil 3.2 Nörojenik farklılaşmanın ikinci basamağının şematik gösterimi

3.2 Yöntem

3.2.1 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH'lerin) izolasyonu ve kültürü

3.2.1.1 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu

İzolasyon işlemlerinin tamamı Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Doku Mühendisliği ve Biyomalzemeler Laboratuvarı'nda steril şartlar altında gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işleminin aşamaları şekil 3.1'de özetlenmektedir. Yaklaşık 5-10 mL hacminde toplanan kemik iliği aspiratı, iliak krestten toplanıp 10,000 U/mL Pen/Strep ve % 1 L-Glu içeren α -MEM vasatında, yaklaşık 1 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. İlik aspiratı, PBS ile üç defa süspanse edilip 5 dakika süre ile santrifüj edildi (25 °C ve 1100 devir/dakika). Elde edilen hücre pelleti, % 10 fetal sığır serumu, Pen/Strep ve % 1 L-Glu içeren α -MEM vasatı içinde süspanse edildi. Kültür işlemi, % 5 CO₂- % 95 hava ve % 90 nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı karbondioksitli inkübatörde gerçekleştirildi.



Şekil 3.3 Köpekten izole edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kültürünün yapılması

3.2.1.2 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin kültürü

İzolasyon işleminden 24 saat sonra, yüzeye yapışmayan hücreler steril PBS yıkamaları ile alındı. Kültür vasatı, iki günde bir taze vasatla değiştirildi. Sıfırıncı pasaj, hücreler yaklaşık olarak % 80 bolluğa ulaşınca kadar sürdürüldü. Hücre morfolojisi, inversiyon (faz kontrast) mikroskopisi ile incelendi. Pasajlama işlemi, % 0,05 Trypsin/0,53 mM EDTA çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Serumlu vasatla yapılan yıkamalar sonunda tripsinin etkisi ortamdan kaldırıldı; hücre süspansiyonu 15 mL'lik santrifüj tüplerine (Corning, NY, A.B.D.) aktarıldı ve 1500 devir/dakikada 25 °C sıcaklıkta 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Dibe pellet halinde çöken hücreler serumlu vasatta yeniden dağıtıldı, ardından tripan mavisi yöntemiyle hücre canlılık düzeyi belirlendi ve hücre sayımı yapıldı. Hücreler, yaklaşık 5×10^6 hücre yoğunluğunda, 1:4 seyreltme oranında yeni T-75 kültür kaplarına aktarıldı ve % 5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığa ayarlı karbondioksitli inkübatöre kaldırıldı.

3.2.1.3 Hücre sayımı

Hücre sayımı için Neubauer hemositometresi kullanıldı (Şekil 3.2). Sıfırıncı pasajdaki hücrelerden elde edilen pellet, 3 mL vasat ile yeniden süspanse edildikten sonra içinden 100 µL hücre süspansiyonu mikropipetle çekilip 10 µL % 0,1 Tripan mavisi ile karıştırıldı ve lamel yerleştirildikten sonra birer damla hemositometrenin çizgilerle belirlenmiş okuma bölgelerine damlatıldı. Daha sonra ml başına düşen hücre sayısı hesaplanıp toplam canlı hücre sayısına geçildi.



Şekil 3.4 Hemasitometre ile hücre sayımı

3.2.2 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH'lerin) karakterizasyonu

3.2.2.1 CFU-F (Koloni oluşturma potansiyeli) protokolü

% 80-90 bolluğa ulaşan kemik iliği mezenkimal kök hücreler tripsinizasyon işlemiyle kültür kabının yüzeyinden kaldırıldıktan sonra 100 ve 1000 hücre/cm² yoğunluklarında 6 kuyucuklu plastik kültür kaplarına alınmıştır. Kültüre edilen hücreler yaklaşık % 90 bolluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapılmamış ve 2 hafta sonunda (14.gün) koloni oluşturma eğilimlerini gözlemlemek üzere CFU-F potansiyelinin belirlenmesi amacıyla standart histokimyasal protokollere uygun olarak vasat ortamdan uzaklaştırılan hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra kuyucukların her birine ikişer mL % 4'lük paraformaldehit eklenerek 10 dakika süreyle inkübe edildi. Paraformaldehiti uzaklaştırmak üzere tekrar PBS ile 2 kez yıkama yapıldı. Daha sonra Hematoksilen&Eosin ile boyama yapıldı. Boyama işlemi sonrası hücrelerin CFU-F kapasiteleri dijital ışık mikroskopunda (Leica DM 4000B, Wetzlar, Almanya) incelenmiş ve koloni sayımları yapılarak fotoğraflandı.

3.2.2.2 Empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi

Eş-zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigenceReal-Time Cell Analyzer; RTCA), herhangi bir işaretleme işlemi yapmadan hücre çoğalması, adhezyonu, farklılaşması, göçü, canlılığı ve ölümü gibi hücresel davranışları eş zamanlı olarak belirleyebilen, empedansa dayalı bir analiz sistemidir. Hücre çoğalmasının zamana bağlı değişimleri RTCA (Eş Zamanlı Hücre Analizi) SP sistemi ile belirlenmiştir. Eş zamanlı hücre analizi sistemi 4 ana birimden oluşmaktadır: (1) RTCA analizörü, (2) RTCA SP istasyonu, (3) Anlık verilerin alındığı RTCA yazılımı içeren bir bilgisayar ve (4) 96 kuyucuklu e-plakaları (Şekil 3.3). E-plakasının yerleştirildiği RTCA SP istasyonu, standart hücre kültürü inkübatörü içinde yer almaktadır. RTCA analizörü ve bilgisayar ise inkübatör dışında bulunmaktadır.

Farklı yoğunluğa sahip hücrelerin çoğalmalarının eş zamanlı olarak görüntülenebilmesi amacıyla, öncelikle 96 kuyucuklu e-plakasına 100'er μ L kültür besiyeri ilave edilerek 30 dk laminar kabin içinde oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 15-20 dk inkübatör içerisinde bekletildi. 15-20 dk sonra hücresiz kültür besiyeri ile empedans ölçümü alınarak (Background ölçümü) tüm kuyucuklardaki elektrik teması kontrol edildi. Hücresiz kültür besiyeri ile ölçüm tamamlandıktan sonra, standart kültür kaplarında doygunluk noktasına ulaşan köpek kemik iliği mezenkimal kök hücreleri tripsin yöntemi ile kap tabanından ayrıldı. Elde edilen hücreler e-plakasının belirli bölgelerine seri dilüsyon yapılarak farklı yoğunluklarda (100000, 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1563) ekildi. Hücre ilavesi yapıldıktan sonra e-plaka 30 dk oda sıcaklığında laminar kabinde bekletildi. Ardından e-plaka RTCA SP istasyonuna yerleştirildi. Yarım saat bekletildikten sonra ölçüm başlatıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.5 Eş zamanlı hücre analizi sistemi

a. RTCA analizörü ve bilgisayar, b. RTCA SP istasyonu, c. 96 kuyucuklu e-plakası. E-plakasının yerleştirildiği RTCA SP istasyonu, d. Standart hücre kültürü inkübatörü içinde yer almaktadır

3.2.2.3 İmmünofenotip karakterizasyon metodolojisi (Akım Sitometri)

Kültürde % 80 bolluğa ulaşan hücre popülasyonunu karakterize etmek amacıyla, ilgili Beckman Coulter cihazı ile akım sitometri analizleri gerçekleştirildi. Köpek mezenkimal kök hücreleri 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatörde % 5 CO₂, % 95 hava ve % 90 nem içeren ortamda % 75-80 bolluğa ulaşılncaya kadar standart besiyerinde (% 10 FBS ile penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12), Hyclone, Logan, UT, A.B.D.) kültüre edildi. Yeterli bolluğa ulaşan hücreler (2. ile 4. pasajlar arasındaki hücreler; P2-P4), tripsinizasyon (% 0,05 Trypsin/0,53 mM EDTA) işleminin ardından uygun miktarda PBS ile süspansiyon edilerek seyreltildi.

Boyalı antikorlar ve hücrelerin inkübe edileceği tüpler hazırlandı. Tüplerin her birine seyreltilen hücre süspansiyonundan 100'er µL eklendi. Böylece yaklaşık 100.000-200.000 hücre, 10-20 µL kadar boyalı antikor ile oda sıcaklığında 20 dakika süreyle inkübe edilerek boyandı. Her bir antikor için aynı işlem tekrarlandı. Çalışmada allofikosiyanın konjuge edilmiş CD34, floresan izotiyosiyanat konjuge edilmiş CD29, HLA-DR monoklonal antikorları ile fikoeritrin konjuge edilmiş CD90, CD73, CD133, fikoeritrinsiyanın 7 konjuge edilmiş CD105 ve LIN A750 monoklonal antikorları kullanıldı. Negatif kontrol olarak boyanmamış hücre süspansiyonu kullanıldı.

Boyamadan sonra hücreler sığır serum albümini (BSA) veya fetal sığır serumu içeren yıkama çözeltisi ile 2 defa yıkanıp, 1500 devir/dakıkada oda sıcaklığında 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Floresanlı antikorlarla işaretlenen hücreler her bir tüpe 200 µL olacak şekilde % 1 formaldehit, % 0,1 sodyum azid ve % 0,5 BSA içeren çözeltide süspansiyon edilerek sabitlendi. Süspansiyon edilen hücreler akım sitometri cihazında partikül/hücre verisi toplanacak şekilde tarandı.

Uluslararası Hücre Tedavi Derneği'ne göre insan mezenkimal kök hücrelerini tanımlamak için gerekli kriterlerinden biri de hücre yüzeyi işaretleyicileri olan CD73, CD90 ve CD105 için pozitif olmak ve CD 11b, CD14, CD19,CD29a, CD34, CD45 ve HLA-DE için ise negatif olmaktır. Diğer türlerden elde edilen mezenkimal kök hücreler

de benzer kriterler ile tanımlanmaktadır. Ancak; literatür incelendiğinde tercih edilen spesifik hücre yüzey işaretleyicilerinin türe göre farklılık gösterdiği görülmektedir (Ksiel vd. 2012). Yapılan çalışmada; köpek kemik iliği mezenkimal kök hücreleri için seçilen CD antijen paneli, CD29, CD73, CD34, CD105, CD133 ve CD90'dan oluşmaktadır.

3.2.2.4 Çoklu soy farklılaşması

İzole edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soya farklılaşma kapasitesini belirlemek amacıyla çeşitli histokimyasal boyamalar yapıldı.

3.2.2.4.1 Adipojenik soya farklılaşma

Adipojenik farklılaşma için; 4 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiş olan hücreler % 10 FBS, 1µm deksametazon, 0.5 mM indometazin, 0.5 mM 3- izobutil-1-metilksantin (IBMX) ve 10 µg/mL insülin ile hazırlanan DMEM-LG içerisinde kültüre edildi. Besiyerine eklenen deksametazon PPAR γ gen ifadesini sağlamaktadır; indometazin ise adipogenezi desteklemektedir. Histokimyasal analizler Oil Red O boyasıyla yapıldı.

3.2.2.4.1.1 Oil Red O (ORO) boyaması

Oil Red O (ORO), histolojik boyama tekniklerinde kullanılan ve yapısal olarak sudan grubuna bağlı lipofilik bir boyadır. İlk kez kereste boyamada kullanılan endüstriyel bir boya olarak üretilmiştir (Proescher, 1927). ORO histolojik bir boya olarak ilk kez 1920'lerin sonunda Frencch ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. ORO, adipoz doku gibi doku kesitlerindeki lipid içeriğini göstermek için tercih edilmektedir.

Bu çalışmada Oil Red O boyaması aşağıdaki işlemlerin yapılmasıyla gerçekleştirildi.

- Daha önce metanol ile fiske edilen örnekler önce % 60'lık izopropanol ile ıslatıldı.
- 15 dakika yeni hazırlanmış Oil Red O çalışma çözeltisi ile muamele edildi.
- Tekrar % 60'lık izopropanol ile yıkama yapıldı.
- Hücre çekirdeği hematoksilin ile boyandı.
- Saf su ile yıkama yapıldı.
- Yıkamanın ardından örnekler kurumaya bırakıldı.
- Daha sonra ise ışık mikroskobu altında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

3.2.2.4.2 Kondrojenik soya farklılaşma

Kondrojenik farklılaşma için; 4 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiş olan hücreler 10^{-7} M deksametazon, % 1 insulin–transferrin–selenöz asit (ITS), askorbik asit (50µg/mL), elzem olmayan aminoasit, L-glutamin, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, % 10 fetal sıgır serumu ve 10 ng/mL TGF-β1 içeren DMEM'de kültüre edildi. İndüksiyonun 28. gününde hücreler metanol ile fikse edildi ve kondrojenik farklılaşma Hematoksilin-eosin, Alsiyan Mavisi boyamaları ile incelendi. TGF-β1 çoğalma, farklılaşma ve ekstraselüler matriks sentezini sağlamaktadır. Deksametazon agregat oluşumunda etkilidir. Askorbik asit ise kıkırdak yapısında ekstraselüler matriks oluşumunda görev almaktadır.

3.2.2.4.2.1 Alsiyan mavisi boyaması

Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması 3 boyutlu kültür ortamında tipik ekstraselüler matriks-agrekan oluşumuyla sonuçlanır. Agrekan, kıkırdak oluşumunun bir göstergesi olarak kullanılabilir ve Alsiyan Mavisi boyası kullanılarak koyu maviye boyanır.

Alsiyan Mavisi boyaması aşağıdaki işlemlerin yapılmasıyla gerçekleştirildi.

- Örnekler önce alkolle ıslatıldı.

- Ardından % 1 Alsiyan Mavisi çözeltisi ile 30 saniye muamele edildi.
- 0,1 N HCl (Hidroklorik asit) ile yıkama yapıldı.
- Örnekler alkol serilerinden geçirelerek dehidrate edildi.

3.2.2.4.3 Osteojenik soya farklılaşma

Kültürde belli bir bolluğa ulaşan hücreler 4 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve osteojenik indüksiyon için bileşimi α - MEM; % 10 FBS; % 1 penisilin/streptomisin; % 1 L-glutamin; β -gliserofosfat 10 mM; askorbat-2-fosfat 0.2 mM (50 μ g/mL); deksametazon 10 nM; olan besiyeri kullanılarak osteojenik indüksiyon gerçekleştirildi. İndüksiyonun 28. gününde hücreler metanol ile fikse edildi. Osteojenik farklılaşma, Alizarin kırmızısı ve Von Kossa boyamalarıyla incelendi. Deksametazon RUNX2 gen ifadesini sağlamaktadır. β -gliserofosfat kalsiyum fosfat birikiminde rol oynamaktadır. Askorbik asit ise kollajen-1 sentezinde görevlidir.

3.2.2.4.3.1 Alizarin kırmızısı (AR-S) boyaması

Bir antrakinon boya olan Alizarin Kırmızısı (AR-S), hücre içerisindeki kalsiyumdan zengin tortuları belirlemek için kullanılan bir boyadır.

AR-S boyaması aşağıdaki işlemlerin yapılmasıyla gerçekleştirildi.

- 40 mM'lık Alizarin Kırmızısı çözeltisi içinde (pH 4.2) 10 dk. süre ile (aksiyel karıştırıcı üzerinde) tutuldu.
- Boyanın fazlasını uzaklaştırmak amacıyla 5 defa ultrasaf su ile yıkama yapıldı.
- Spesifik olmayan AR-S boyasını uzaklaştırmak için 15 dk. PBS ile yıkama yapıldı.
- Boyanan nanolif membranların dijital fotoğraf makinasıyla fotoğrafları çekildi.

3.2.2.4.3.2 Von Kossa boyaması

Von Kossa boyaması, doku içindeki kalsiyum birikimini göstermek için kullanılan bir metottur (Pearse, 1972). Yöntem, fosfatlara bağlı doku kalsiyumunun gümüş iyonları ile yer değiştirmesini ve daha sonra gümüş iyonlarının ise metalik gümüşe indirgenmesini temel alır. Gümüş iyonları, elektrokimyasal serilerdeki ilgili konumlarından ötürü karbonat veya fosfat iyonlarıyla yer değiştirerek çözeltiden ayrılır. Doku karbonat veya fosfat iyonlarının kanıtlanabilir biçimleri her zaman kalsiyum iyonlarıyla ilişkili olduğundan, yöntem doku kalsiyum birikimi yerleri olarak gösterilebilir.

Von Kossa boyaması aşağıdaki işlemlerin yapılmasıyla gerçekleştirildi.

- 20 dk % 5 lik AgNO_3 (Gümüş nitrat) ile karanlıkta muamele edildi.
- Ultrasaf su ile dikkatlice yıkandı.
- 2 dk % 5 Na_2CO_3 (Sodyum karbonat) içeren % 25'lik formalin çözeltisi ile muamele edildi.
- Saf su ile dikkatlice yıkandı.
- 2-5 dk sodyumtiyosülfat ile tesbit edildi.
- Saf su ile dikkatlice yıkandı.
- 2-3 dk hematoksin ile muamele edildi.
- Saf su ile dikkatlice yıkandı.
- Işık mikroskobu altında görüntülenip fotoğraflandı.

3.2.3 Kİ-MKH'lerden nörokürelerin oluşturulması (in-vitro Nörojenik Farklılaştırmanın 1. Basamağı)

Köpek mezenkimal kök hücreleri belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra iki-aşamalı nörojenik farklılaştırma protokolüne (Lim vd. 2008) geçilmiştir. Bu protokol, öncelikle Nestin-pozitif nörokürelerin elde edilmesini ve daha sonra nörokürelerin dağıtılarak daha ileri düzeyde nörojenik farklılaştırma sürecine geçilmesini kapsamaktadır. Bu aşamada hücreler, laboratuvarı daha önceden yüzeyleri poli (hidroksietil metakrilat)

(pHEMA) (Sigma) ile kaplanıp sterilize edilen kültür kaplarına aktarıldı. MKH'ler, hazırlanan substrat üzerinde % 10 MesenPro™ katkısı, Pen/Strep, ve % 1 L-Glu içeren MesenPro™ vasatında (Invitrogen) kültür işlemine alındı. Üç gün süre ile kültür işleminde kullanılan nörobazal vasat, B-27 ve N-2'ye ilave olarak 100 ng/mL epidermal büyüme faktörü (EGF) (Millipore, Merck, Billerica, MA, A.B.D.) ve 10 ng/mL bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) (Millipore) içermektedir. Elde edilen nörokürelerden örnekler Nestin (Santa Cruz) ile histokimyasal boyama işlemine alındılar.

3.2.4 Dağıtılan nörokürelerin nörojenik farklılaştırması (in-vitro Nörojenik Farklılaştırmanın 2. Basamağı)

Bu aşamada nöroküreler tripsin enzimi kullanılarak dağıtıldı ve üç defa PBS ile yıkandı. Bu şekilde nöroküreleri oluşturan hücrelerin süspansiyonu elde edilmiş oldu. Elde edilen hücre süspansiyonu, yüzeyleri laboratuvarında poli-L (ornitin) (Sigma) ile kaplanıp sterilize edilen kültür kaplarına aktarıldı. Hücreler, 100 ng/mL sinir büyüme faktörü (NGF) (Millipore), 10 ng/mL beyin-kaynaklı nörotrofik faktörü (BDNF) (Millipore), B-27 ve N-2 içeren nörobazal vasatta (Neurobasal™ medium; Invitrogen) altı gün süre ile kültüre alındılar. Yaklaşık olarak % 80 bolluğa ulaşan hücreler, immünohistokimyasal analizler için ayrıldı.

3.2.5 İmmünohistokimyasal Tanımlama

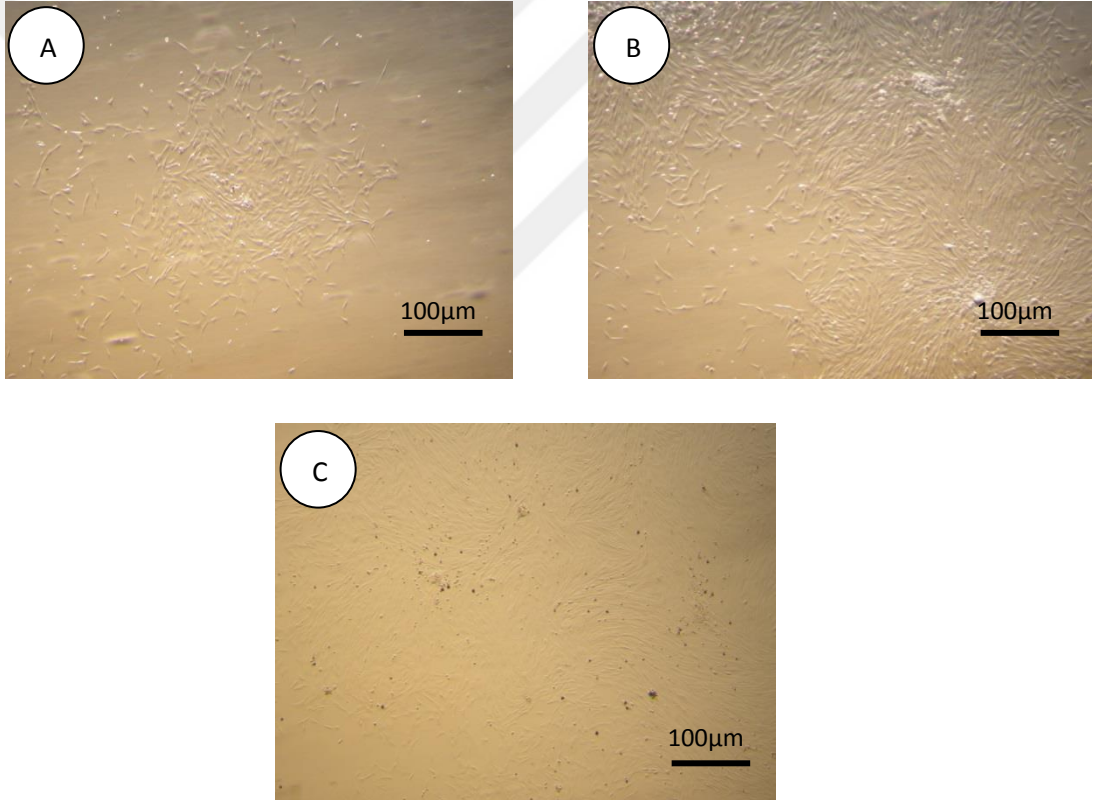
Nörojenik nesile farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin antijenik işaretçilerle tanımlanması için astrositlerde bulunan hücre yüzey antijenine özgü anti-Gliyal Fibriler Asidik Protein (anti-GFAP) (1:500) (Abcam), oligodendrosit ve Schwann hücrelerine özgü anti-2',3'-Siklik Nükleotid--3'-Fosfodiesteraz (anti-CNPaz)(1:250) (Abcam), nöronlara özgü ise anti-nöron spesifik beta III tübülün (1:10) (Abcam) ve mikrotübül-bağılantılı protein 2 kinazlar (MAP2)'dan olan anti-ERK1 (pT202/pY204) + anti-ERK2 (pT185/pY187)(1:200) (Abcam) birincil antikörleri kullanıldı.

Birincil antikorlar saf suda seyreltildi. İmmünohistokimyasal tanımlamalar için bir yüzeyi hücre kültürüne uygun işlemlenmiş lameller üzerinde 4 kuyucuklu kültür kaplarında hücreler bolluk noktasına ulaşana kadar çoğaltıldıktan sonra -10 °C'daki soğuk metanolde tesbit edildiler. 5-10 dk boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra hidrojen peroksit blok çözeltisiyle (LabVision, Fremont, CA, A.B.D.) 5 dakika inkübe edilerek hücrelerin endojen peroksidaz aktiviteleri baskılandı. Üç kez 5'er dakika PBS ile yıkanan hücreler 5 dakika Ultra V blok çözeltisiyle (LabVision) inkübe edildi. Tekrar 3 defa 5'er dakika boyunca PBS ile yıkama yapıldıktan sonra hücreler oda sıcaklığında 1 saat boyunca ya da bir gece +4 °C'de birincil antikorlar ile inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 3 kez 5'er dakika boyunca PBS ile yıkanan örnekler türe ve izotipe özgü ikincil antikorlar ile inkübe edildi. Nörojenik nesile farklılaştırılmış köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde astrositler için kullanılan anti-GFAP birincil antikorlu IgG fraksiyonundan olduğundan, kendisine bağlanmak için ikincil tavşan anti-polivalent antikorlu kullanıldı. Nöron hücre belirteci olarak kullanılan anti-nöron spesifik beta III tübülün birincil antikorlu IgG2a sınıfından olduğundan kendisine bağlanmak için ikincil keçi anti-fare monoklonal antikorlu ve anti-ERK1+ERK2 birincil antikorlu IgG sınıfından olduğundan kendisine bağlanmak için ikincil keçi anti-polivalent antikorlu kullanıldı. Oligodendrosit ve schwann hücrelerine özgü anti-CNPaz birincil antikorlu ise immünooglobülin G1 fraksiyonunda olduğundan kendisine bağlanmak için ikincil keçi anti-fare monoklonal antikorlu kullanıldı. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında ikincil antikorlar 3 kez 5'er dakika boyunca PBS ile yıkandı ve örnekler 10-15 dakika boyunca horseradish peroksidaz enzimi ile inkübe edildi. Yine üç kez beşer dakika PBS ile yıkama sonrası AEC (3-amino-9-etilkarbazol) substratı (1000 µL) ile AEC kromojen (20 µL) karıştırılarak AEC kromojen-substrat bileşiği ile 5-10 dakika süresince inkübasyon yapıldı ve kırmızı renk ortaya çıkıp boyanmanın gerçekleştiği görülünce aynı yıkama metodu ile örnekler üzerindeki kromojen-substrat yıkandı. Negatif kontroller için birincil antikorlar kullanılmadan aynı işlemler uygulandı.

4. BULGULAR

4.1 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin hücre kültürü bulguları

Kültüre alınan hücreler yaklaşık 48 saatten itibaren yayılmaya başladı. Yaklaşık % 80 bolluk noktasına ulaşan hücreler pasajlanarak alt kültürlerle geçildi. Hücre kültürlerinin her aşaması inversiyon mikroskobu altında düzenli olarak takip edildi (Şekil 4.1). Kemik iliği mezenkimal kök hücreler fibroblastik benzeri morfolojisi ile karakterize edildi.



Şekil 4.1 Pasaj-0 (P-0)'ın 14. gününde kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin inversiyon mikroskobu görüntüsü (Hoffman modülasyonu)

A. 11 yaşındaki köpek, B. 8 yaşındaki köpek, C. 4 yaşındaki köpek. Boyut çubukları: 100 µm.

4.2 Hücre Sayımı

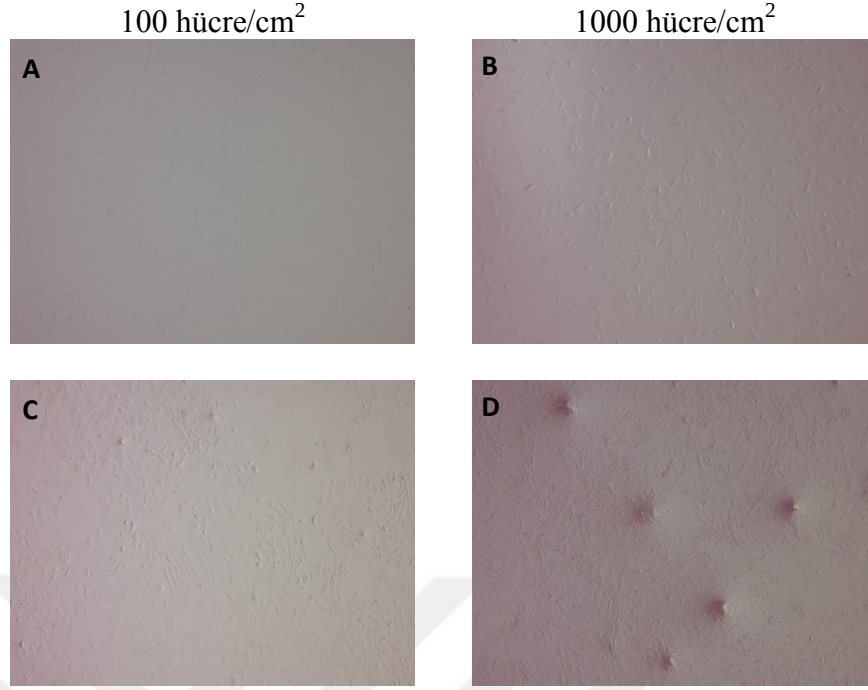
Neubauer hemositometresi kullanılarak yapılan hücre sayımı sonuçları hesaplandı (Çizelge 4.1). Farklı yaşlardaki köpeklerden elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin sayısı incelendiğinde köpek yaşına bağlı olarak elde edilen hücre sayısının değiştiği belirlendi.

Çizelge 4.1 Kemik iliği biyopsileri alınan köpeklerin özellikleri

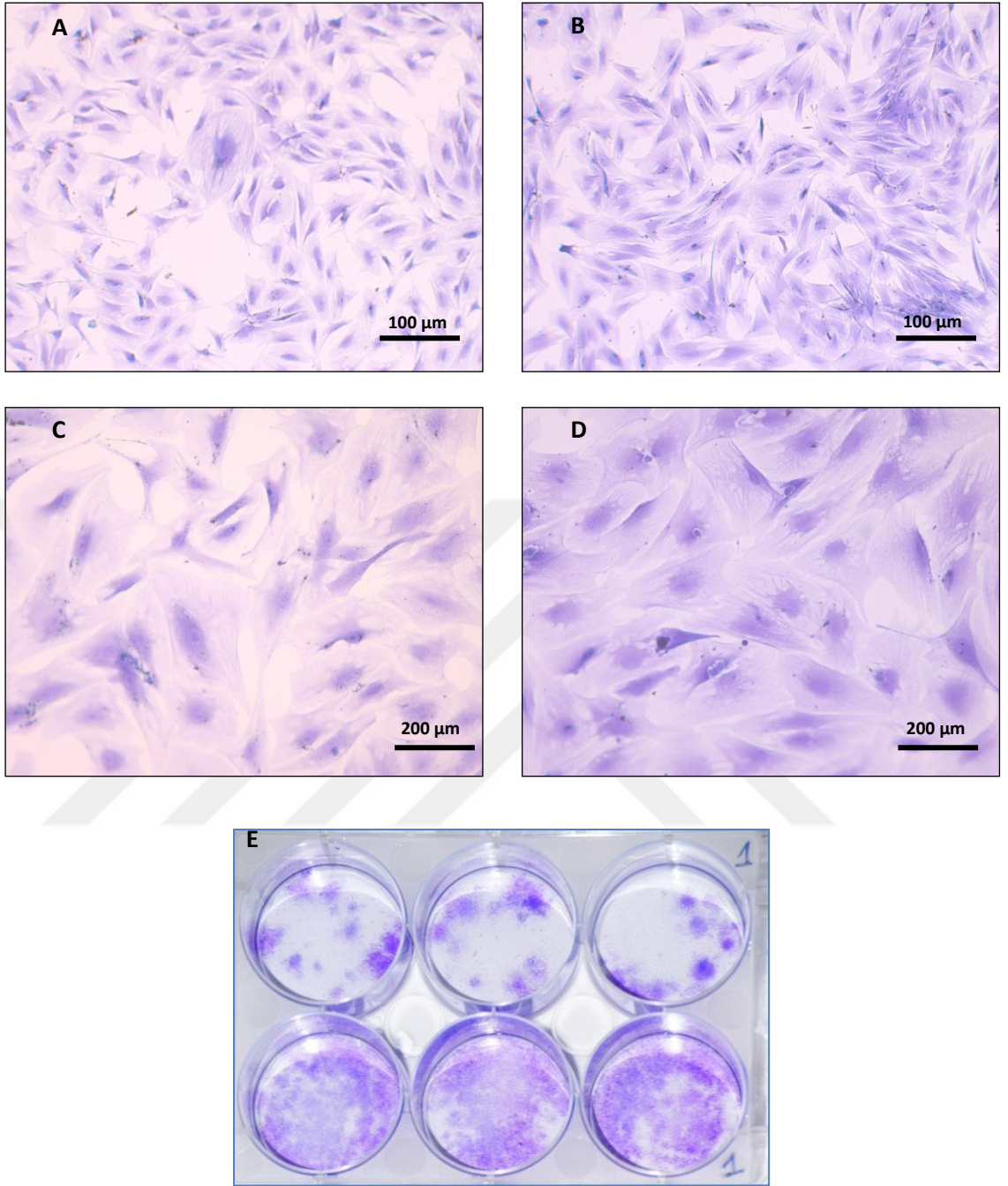
	Verici yaşı	Alınan İlik Hacmi	Ulaşılan Hücre Sayısı
1	4	10 ml	$9,6 \times 10^6$
2	8	10 ml	$6,2 \times 10^6$
3	11	10 ml	$5,3 \times 10^6$

4.3 CFU-F deney bulguları

100 ve 1000 hücre/cm² yoğunluklarında tohumlanan köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin bolluk noktasına ulaşp pasajlanmadığında koloni oluşturma eğiliminde oldukları gözlemlendi (Şekil 4.2). Hematoksilin&Eozin ile yapılan histokimya boyaması ile hücrelerin 14. Gün sonunda oluşturdukları koloniler gösterildi (Şekil 4.3).



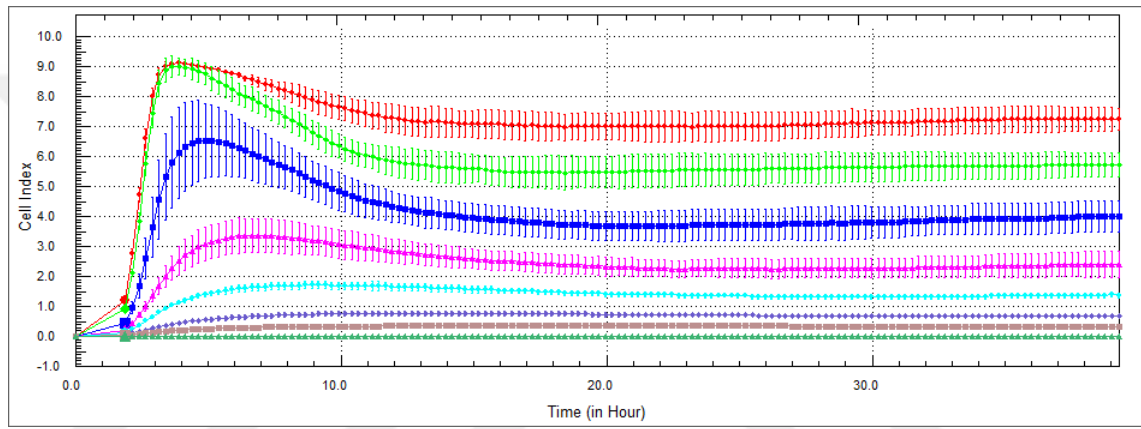
Şekil 4.2 CFU-F deneyi için 100 hücre/cm² (A-C) ve 1000 hücre/cm² (B-D) yoğunluğunda ekilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 14. günde elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri



Şekil 4.3.a.c. CFU-F deneyi için 100 hücre/cm², b.d. 1000 hücre/cm² yoğunluğunda ekilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 14. günde H&E boyaması ile elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri

4.4 Empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile hücre büyüme eğrisi

Farklı yoğunluğa sahip köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin çoğalmaları eş-zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenmiş ve elde edilen bulgular şekil 4.4'te gösterilmiştir. Elde edilen hücre büyüme eğrisi sonuçları, ekimden hemen sonra hücrelerin e-plakanın tabanına yapışmaya başladığını göstermiştir. Hücrelerin, hücre yoğunluğuyla orantılı paralel bir büyüme eğrisi gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.4 Empedansa dayalı hücre analiz sistemi ile elde edilen hücre büyüme eğrisi

Renkler sırasıyla: 100000, 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1563 hücre ve hücresiz besiyeri.



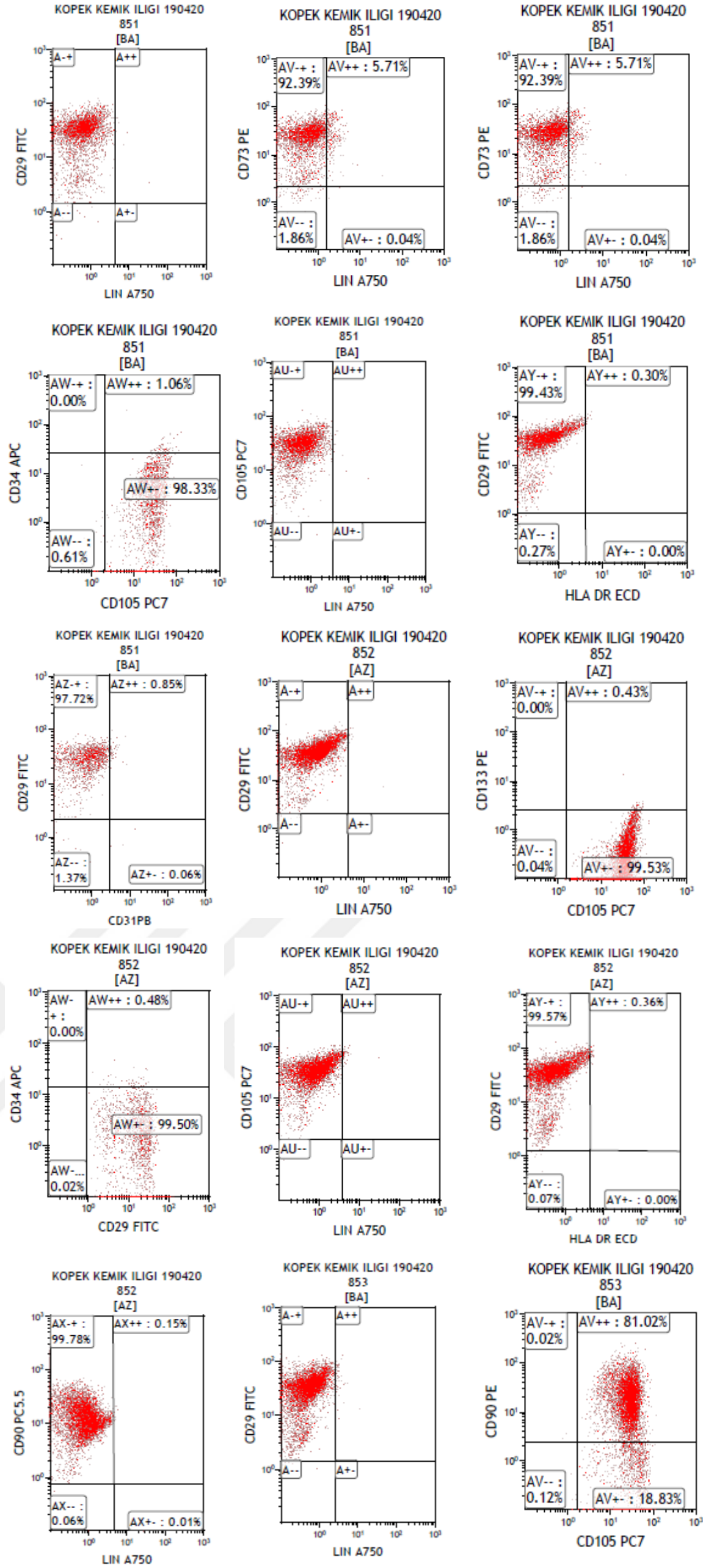
4.5 Akım Sitometri Bulguları

Köpeklerden izole edilerek çoğaltılan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri sonuçlarına göre; karakterizasyon için anti-CD29 monoklonal, anti-CD 105 monoklonal, anti-human İntegrin beta 1/CD29, anti-CD73 poliklonal, anti-CD34 monoklonal, anti-CD90 monoklonal, anti-CD133 monoklonal yüzey antijenleri kullanıldı.

Analiz sonuçları incelendiğinde bu hücreler CD73 (% 92.4), CD90 (% 99.8), CD105 (% 99.5)'in yanı sıra, CD29 (% 99.5)'u yüksek düzeyde ifade etmektedir. Diğer yandan, CD34 ve CD133 ise bu hücreler tarafından ihmal edilebilecek düzeyde ifade edilmektedir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.2 Kİ-MKH'lerin yüzey antijen paneli

Antijen	Sonuç	Oran (%)
CD29 FITC/LIN A ₇₅₀	A-+	99.49
CD73 PE/LIN A ₇₅₀	A-+	92.39
CD34 APC/CD105 PC7	A+/-	98.33
CD105 PL 7/LIN A ₇₅₀	A-+	99.54
CD29 FITC/HLA-DRFITC	A-+	99.43
CD29 FITC/CD31 PB	A-+	97.72
CD29 FITC/LIN A ₇₅₀	A-+	99.18
CD133 PE/CD105 PC7	A+/-	99.53
CD34 APC/CD29 FITC	A+/-	99.50
CD105 PL7/LIN	A-+	99.17
CD29 FITC/HLA	A-+	99.57
CD90/LIN	A-+	99.78



Şekil 4.5 Köpek KİMKH'lerin akım sitometri sonuçları

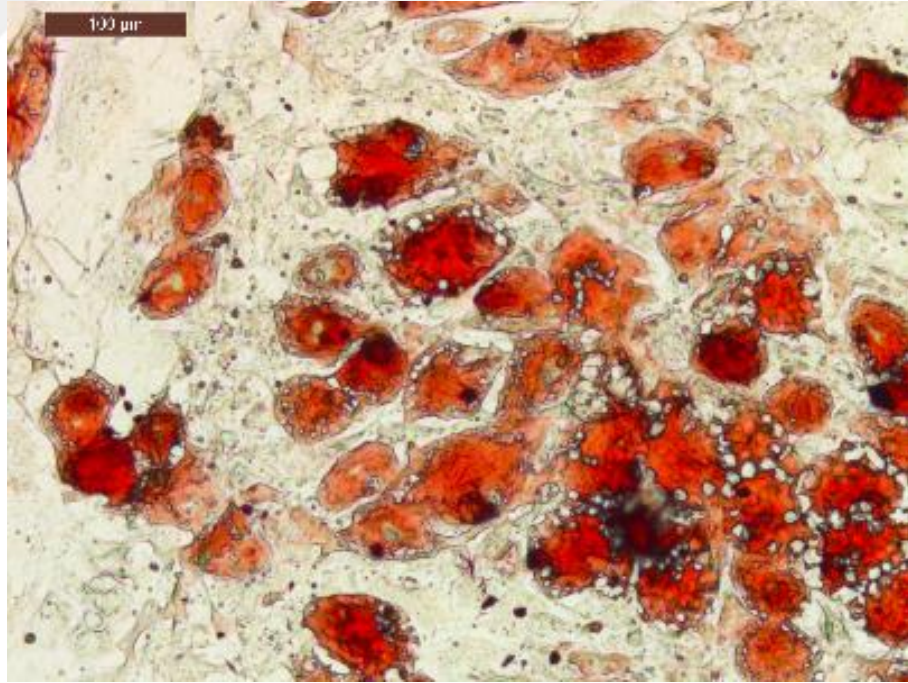
4.6 Çoklu soy farklılaşması

4.6.1 Adipojenik soya farklılaşma

Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin adipojenik soya farklılaşma kapasitesini belirlemek amacıyla Oil Red O ile boyama yapıldı.

4.6.1.1 Oil Red O boyaması

Oil Red O; indüklenmiş adipojenik kültürdeki adipositleri saptamak amacıyla yapılan bir boyamadır. Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin adipojenik soya farklılaşması; hücre kümelerini içeren güçlü morfolojik değişimlerin gözlenmesiyle ve lipid kofullarının birikimiyle karakterize edildi. Adipojenez kültürün 14. gününde lipid kofullarının Oil Red O boyası kullanılarak tespit edilmesiyle belirlendi (Şekil 4.6).



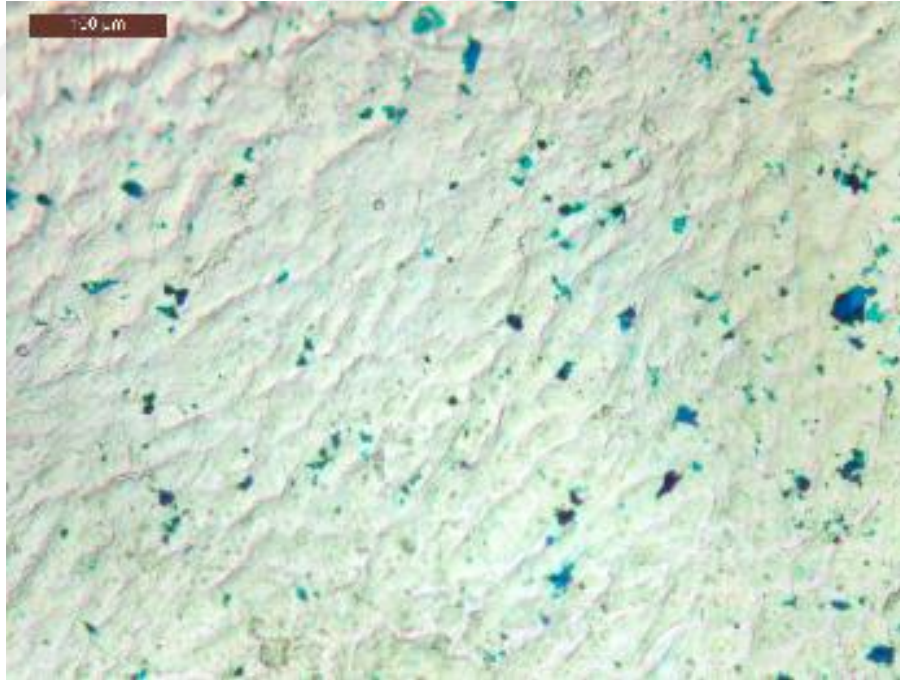
Şekil 4.6 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 14. gündeki Oil Red O boyaması

4.6.2 Kondrojenik soya farklılaşma

Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik soya farklılaşma kapasitesini belirlemek amacıyla Alsiyan Mavisi ile boyama yapıldı.

4.6.2.1 Alsiyan Mavisi boyaması

Kondrojenik indüksiyon ortamında 21 gün boyunca kültüre edilen köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin histolojik olarak analizi için Alsiyan Mavisi boyaması gerçekleştirildi. Pozitif Alsiyan boyaması hücre yapısındaki proteoglikan yapılarını göstermektedir. Kıkırdak pelletindeki glukozaminoglikanların histolojik kesitlerde Alsiyan Mavisi ile boyanması hücrelerin hücre dışı matriks yapısı ile çevrili olduğunu gösterdi (Şekil 4.7).



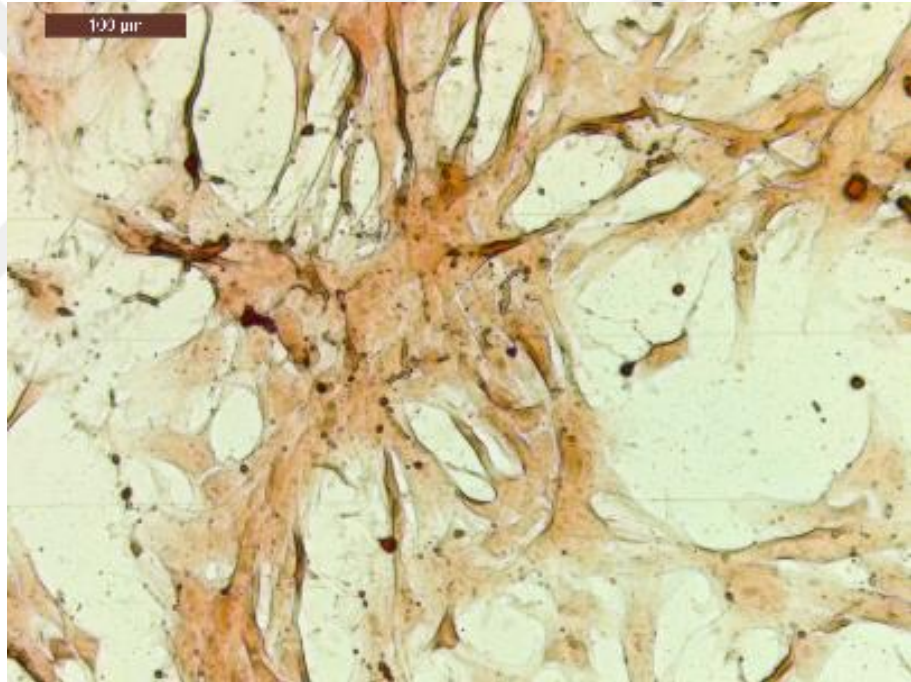
Şekil 4.7 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 21. gündeki Alsiyan Mavisi boyaması

4.6.3 Osteojenik soya farklılaşma

Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin osteojenik soya farklılaşma kapasitesini belirlemek amacıyla Alizarin Kırmızısı ile boyama yapıldı.

4.6.3.1 Alizarin Kırmızısı (AR-S) boyaması

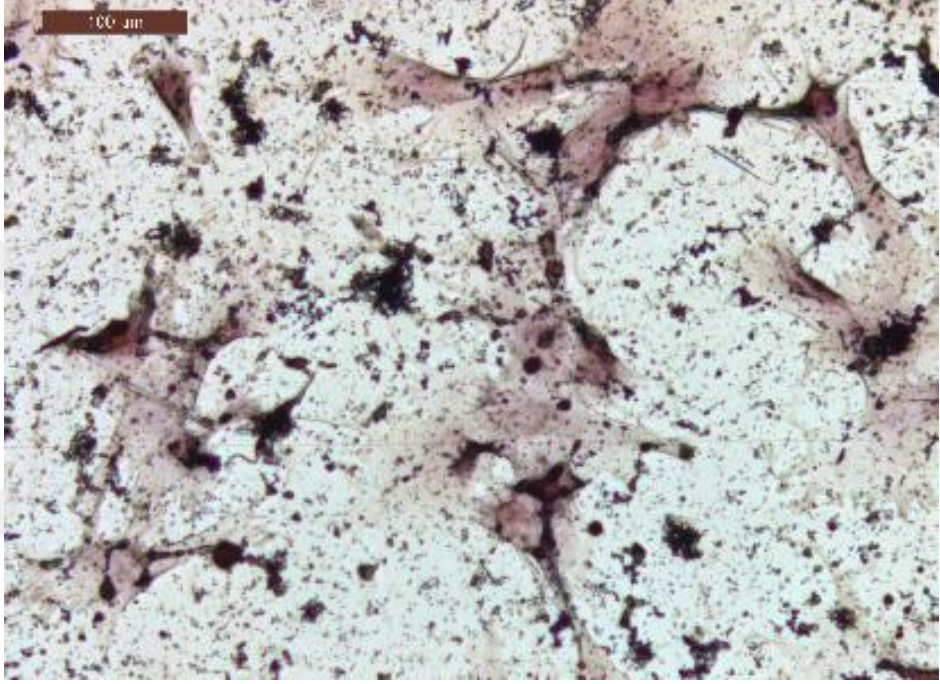
Osteojenik soya farklılaştırılmış köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kültürün 28. günündeki kalsiyum depoları Alizarin Kırmızısı boyaması ile belirlendi. Alizarin Kırmızısı boyaması ile osteositler sarımsı-kırmızı renge boyandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 28. günündeki Alizarin Kırmızısı boyaması

4.6.3.2 Von Kossa boyaması

Osteojenik soya farklılaştırılmış köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kültürün 28. günündeki mineral depoları ve yoğun matriks mineralizasyonu Von Kossa boyaması ile belirlendi. Von Kossa boyaması ile kemik benzeri yapılar sarımsı-kahverengi renge boyandı (Şekil 4.9).

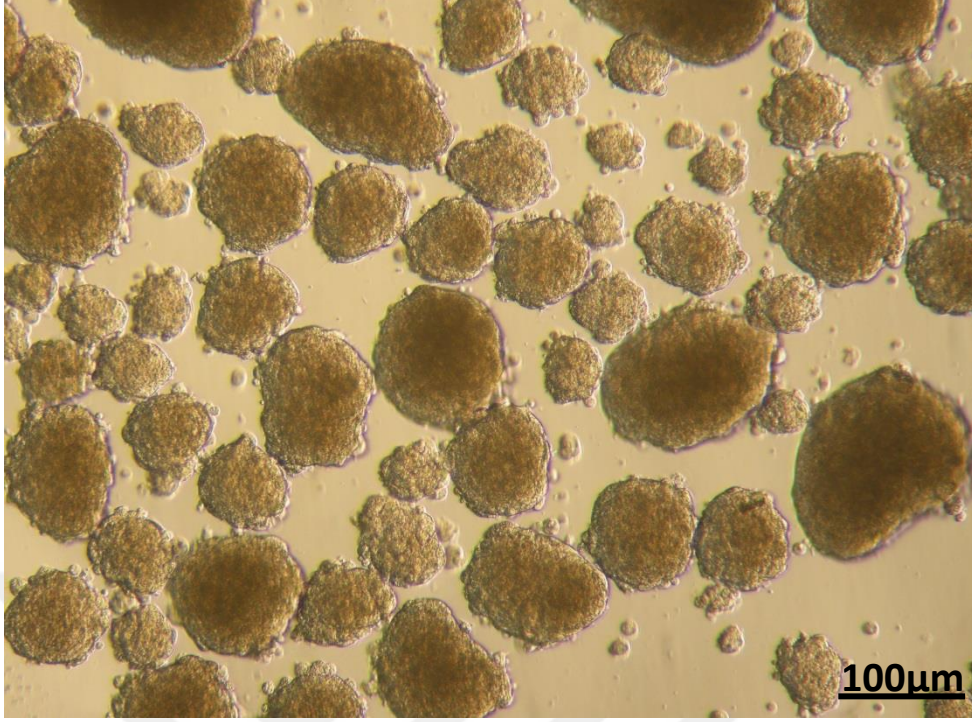


Şekil 4.9 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin 28. günündeki Von Kossa boyaması

4.7 Nörojenik Farklılaşma

4.7.1 Kİ-MKH'lerden nörokürelerin oluşturulması (In-vitro nörojenik farklılaştırmanın 1. basamağı)

Nörojenik indüksiyonun ilk aşamasında köpek kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ~100-150 µm boyutlarındaki nörokürelere farklılaştı. Elde edilen nöroküreler faz kontrast mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 4.10-4.11).



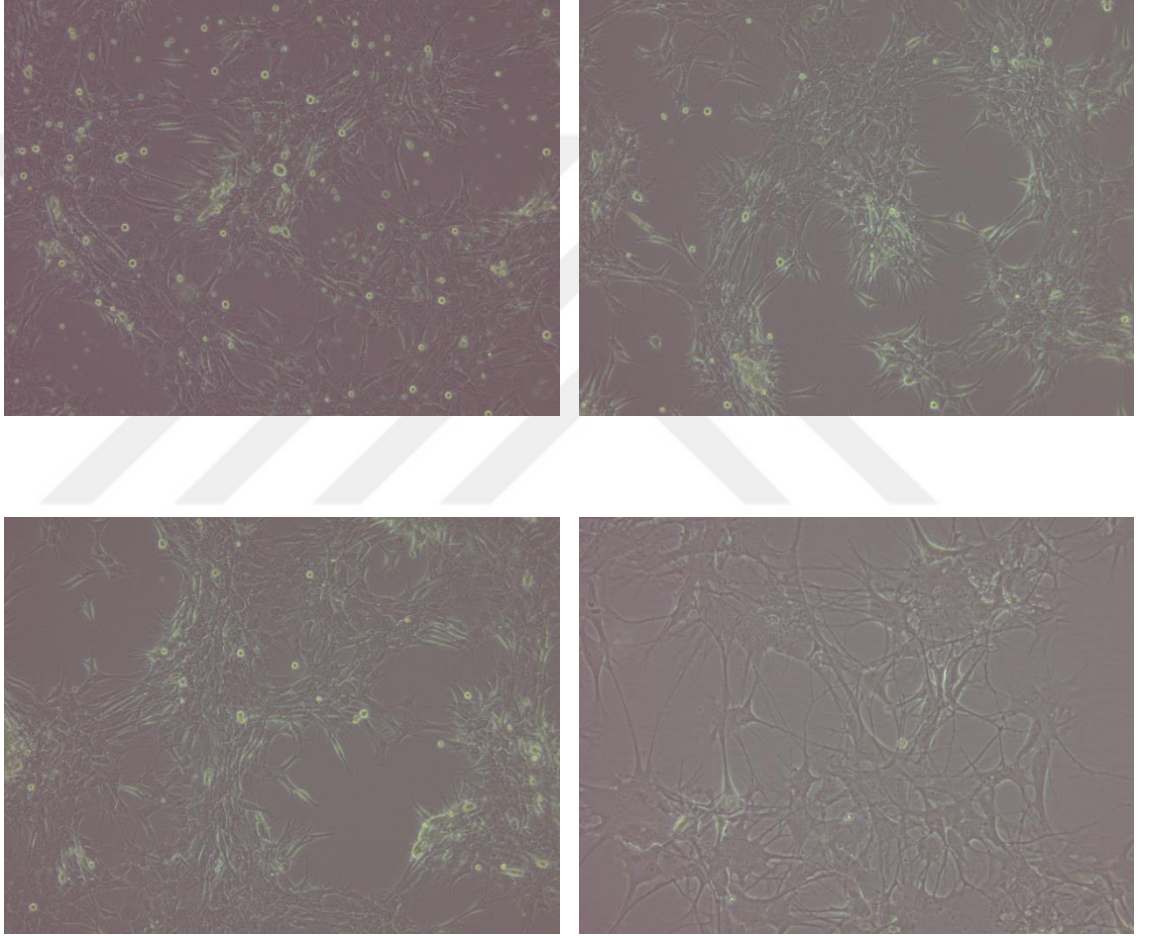
Şekil 4.10 Nörojenik indüksiyonun ilk aşamasından sonra elde edilen Nestin-pozitif nörokürelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Boyut çubuğu: 100µm



Şekil 4.11 Nörojenik indüksiyonun ilk aşamasından sonra elde edilen nörokürelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Boyut çubuğu: 200µm

4.7.2 Dağıtılan nörokürelerin nörojenik farklılaştırması (In-vitro nörojenik farklılaştırmanın 2. basamağı)

Nöroküreleri oluşturan hücrelerin süspansiyonu laboratuvarında poli-L (ornitin) (Sigma) ile kaplanıp sterilize edilen kültür kaplarına aktarıldıktan sonra NGF, BDNF, B-27 ve N-2 içeren nörobazal vasatta altı gün süre ile kültüre alındılar. Yaklaşık olarak % 80 bolluğa ulaşan hücreler, faz kontrast mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 4.12).

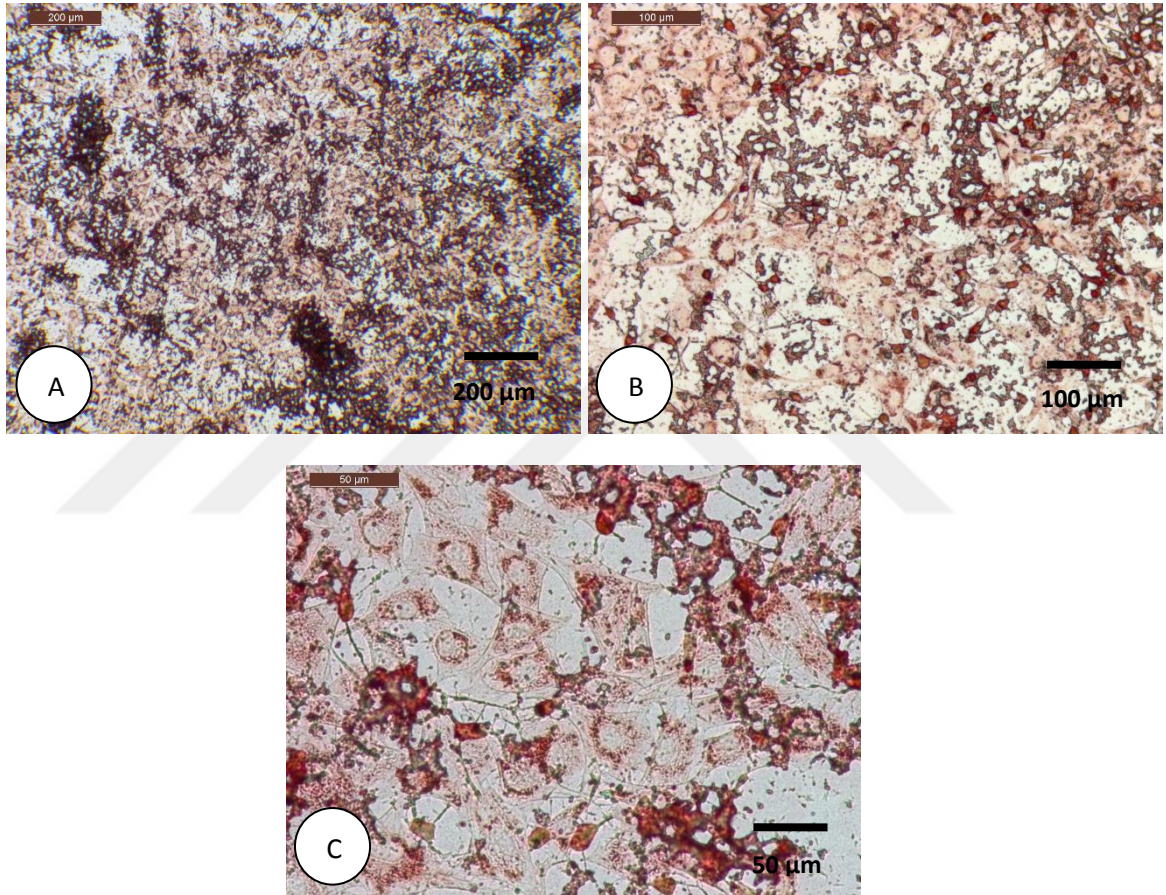


Şekil 4.12 Nörojenik indüksiyonun ikinci aşamasından sonra elde edilen nöron-benzeri hücrelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri

4.8 İmmünohistokimyasal Boyamalar

4.8.1 MAP-2 (anti-ERK1 + anti-ERK2) boyaması

Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin antijenik işaretçilerle tanımlanması için MAP2 birincil antikoru kullanıldı.

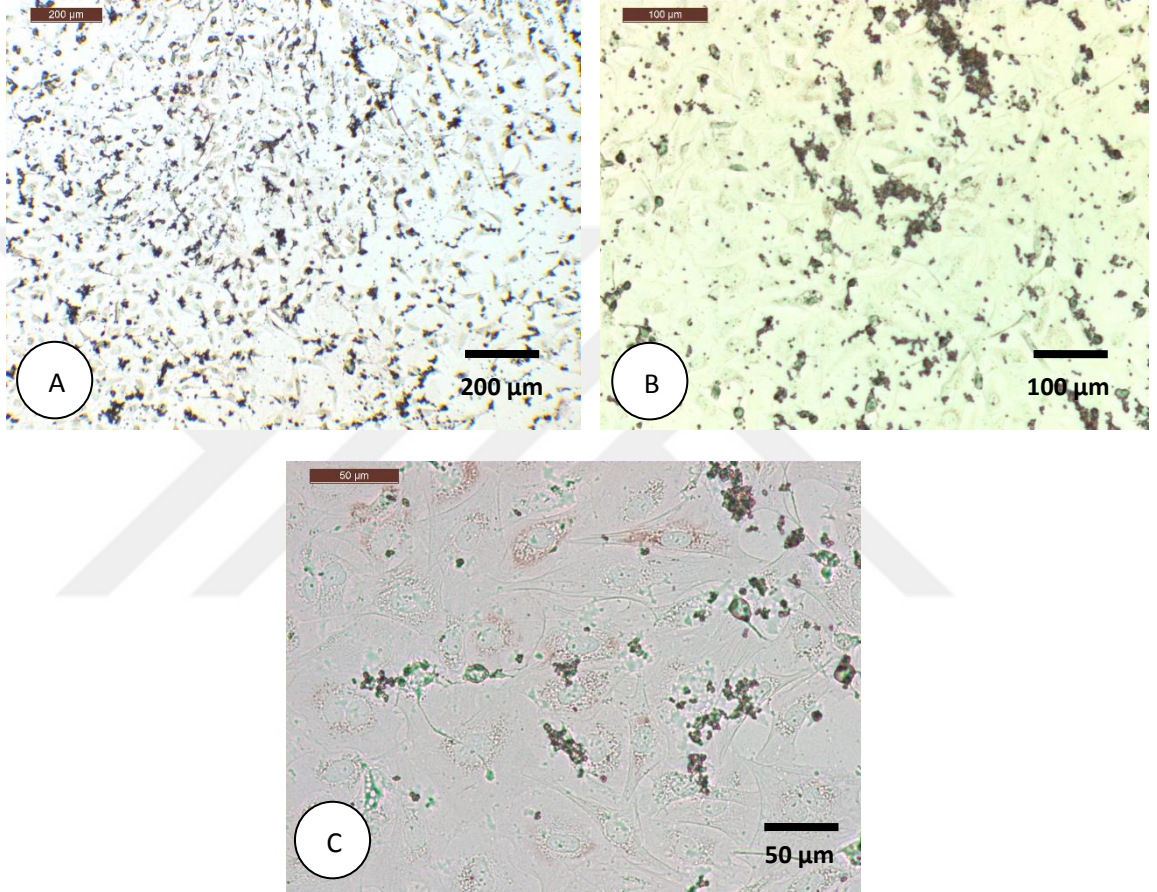


Şekil 4.13 Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin MAP -2 boyamaları
Ölçü çubukları, A:200 µm, B:100 µm, C:50 µm

Nöron hücre belirteci olan MAP-2 antikoru ile yapılan boyamalarla kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin olgun ve olgunlaşmamış nöron-benzeri hücrelere, çoğunlukla da nöronal hücrelere farklılaştığı gösterildi (Şekil 4.13).

4.8.2 CNPaz (anti-2',3'-Siklik Nükleotid--3'-Fosfodiesteraz) boyaması

Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin farklılaşma kapasitelerini belirlemek amacıyla oligodendrosit ve schwann hücrelerine özgü CNPaz birincil antikoru kullanıldı.

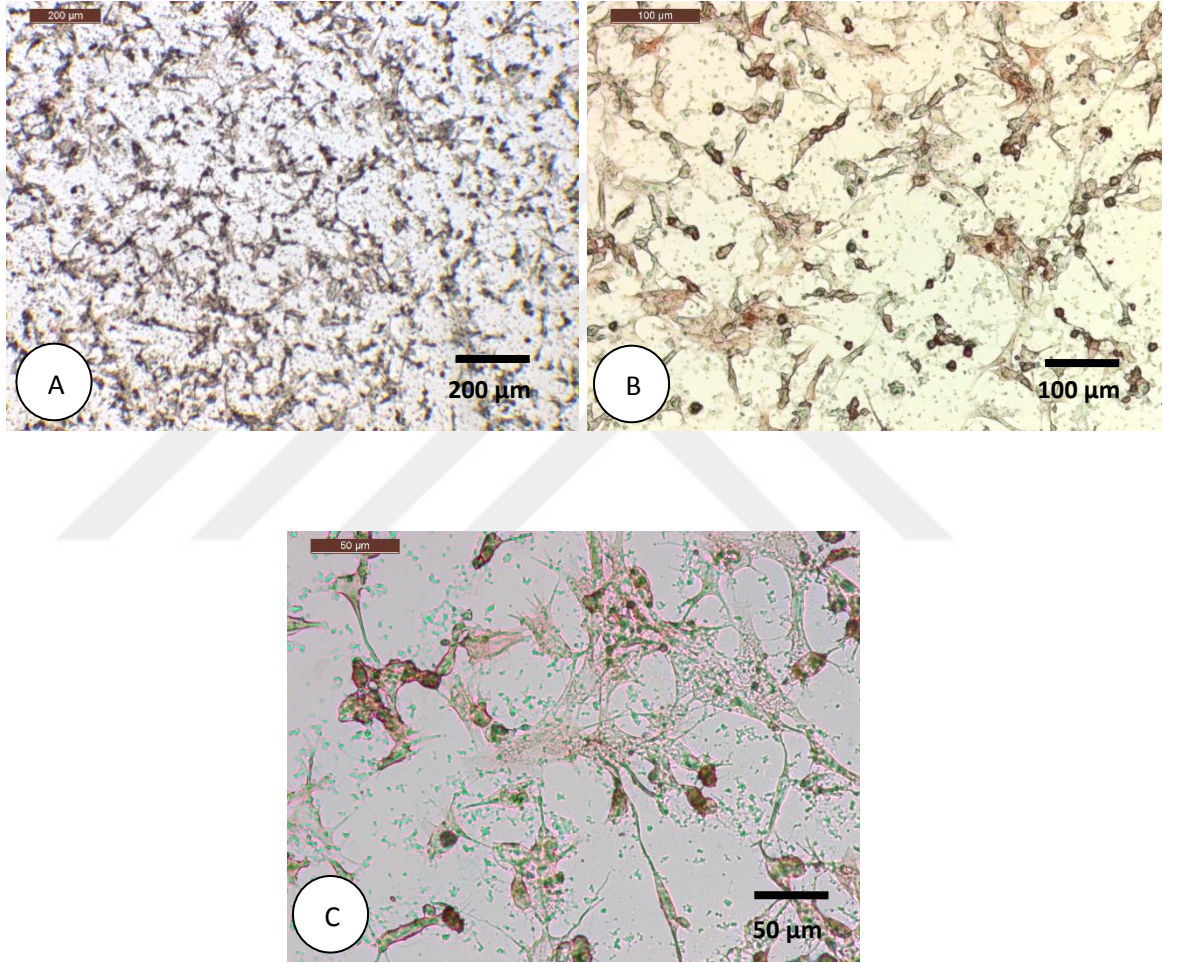


Şekil 4.14 Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin CNPaz boyamaları, Ölçü çubukları, A:200 µm, B:100 µm, C:50 µm

Şekil 4.14'deki fotoğraflardan da görüldüğü üzere çok yoğun olmamakla birlikte farklılaşmanın gerçekleştiği immunhistokimyasal boyama ile gösterildi.

4.8.3 Beta III tübülün boyaması

Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin nöron-benzeri hücrelere farklılaşma kapasitesi anti-nöron spesifik beta III tübülün birincil antikoru ile yapılan immunhistokimya boyaması ile gösterildi. Farklılaştırılmış hücrelerin bir kısmı kırmızı-bordo renge boyandı (Şekil 4.15).

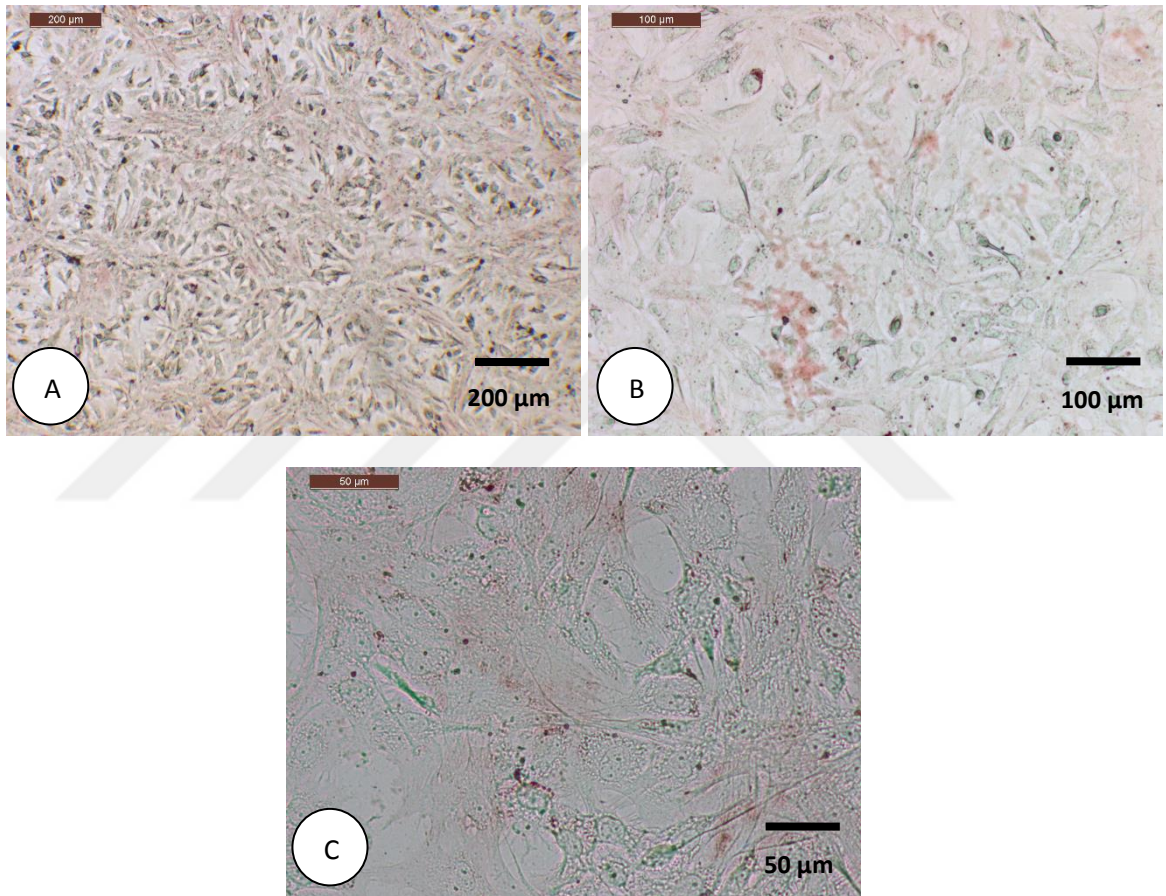


Şekil 4.15 Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin beta III tübülün boyamaları

Ölçü çubukları, A:200 µm, B:100 µm, C:50 µm)

4.8.4 GFAP (anti-Gliyal Fibriler Asidik Protein) boyaması

Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde glia hücrelerini belirlemek için astrositlerde bulunan hücre yüzey antijenine özgü anti-GFAP birincil antikoru ile boyama yapıldı. Elde edilen görüntüler ile kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin glia hücrelerinin farklılaştığı gösterildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.16 Nörojenik nesle farklılaştırılmış köpek Kİ-MKH'lerinin GFAP boyamaları
Ölçü çubukları, A:200 µm, B:100 µm, C:50 µm

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mezenkimal kök hücre araştırmalarında karşılaşılan en büyük zorluk; insan rahatsızlıklarında deneyimlenen karmaşıklığı yansıtan iyi hayvan modelleri bulmaktır. Kök hücre transplantasyonunun optimizasyonu için gerekli tekniklerin köpek modeli kullanılarak geliştirilmesi; insanlarda hematopoietik yeniden yapılanmanın başarısı için kritik rol oynamaktadır (Hayes vd. 2008). Büyük köpekler insan hastalıkları araştırmalarında; uzun yaşam beklentisi, büyük vücut kütlesi ve insan yapısını etkileyen hastalıkların doğal gelişiminden dolayı potansiyel hayvan modeli olarak tercih edilmektedir (Waltona vd. 2008). Sıçan ve fare gibi deney hayvanlarının aksine, köpekler nispeten daha uzun bir ömre sahiptir ve laboratuvar dışında kanser, obezite ve travmatik yaralanmalar gibi çeşitli hastalık durumlarıyla ilgili çevresel faktörlere maruz kalmaktadır. Kemirgenlerle karşılaştırıldığında; insan patolojilerinin klinik gösterimi ve ilerlemesi de genellikle köpekler tarafından daha iyi temsil edilmektedir (Parker vd. 2010). Kemirgen modellerinde zor veya imkansız olan görüntüleme ve biyolojik örneklemeler; boyutlarından dolayı köpeklerde çok daha kolaydır (Uranio vd. 2011). Bu koşullar, aynı zamanda, yeni tedavi yöntemlerinin insanlara karşı istenmeyen yan etkilerinin saptanmasına da izin vermektedir. Bu sebeplerden dolayı yapılan deneysel çalışmalarda mezenkimal kök hücre kaynağı olarak köpek kemik iliği tercih edilmiştir (Jeffery vd. 2006).

Farklı yaşlardaki köpeklerden elde edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin sayısı incelendiğinde köpek yaşına bağlı olarak elde edilen hücre sayısının değiştiği belirlenmiştir. Köpeğin yaşının artması, mezenkimal kök hücre üzerinde negatif etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre deneysel çalışmalara en fazla mezenkimal kök hücre elde edilen 4 yaşındaki köpek ile devam edilmesine karar verilmiştir. Benzer şekilde; Volk vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada çalışmasında donör özelliklerinin köpek mezenkimal kök hücre özellikleri üzerine etkisini incelemiştir. Yapılan çalışmada köpek yaşının mezenkimal kök hücrelerin koloni oluşturma ve osteojenik soya farklılaşma potansiyelleri üzerinde negatif bir etkisi olduğu gözlenmiştir.

Seçilen hücre hattıyla karakterizasyon çalışmalarına devam edildi. Koloni oluşturma eğilimini incelemek amacıyla CFU-F deneyi yapıldı. Oluşan hücre kolonilerini görüntülemek amacıyla H&E histokimya boyası kullanıldı. Elde edilen sonuçlarla mezenkimal kök hücrelerin pasajlanmadığında koloni oluşturma eğiliminde oldukları gözlendi. 2015 yılında Bertolo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada benzer şekilde köpek mezenkimal kök hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri incelenmiş ve bu hücrelerin köklülük özelliğini koruduğu oluşan hücre kolonilerinin Gisela ile boyanması ile gösterilmiştir.

Farklı yoğunluğa sahip köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin çoğalmaları eş-zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlendi. Elde edilen hücre büyüme eğrisi sonuçları, ekimden hemen sonra hücrelerin e-plakanın tabanına yapışmaya başladığını gösterdi (Silvani vd. 2011). Böylece Uluslararası Hücre Tedavi Derneği (ISCT)'nin MKH'leri tanımlamak için bildirmiş olduğu özelliklerden biri olan yüzeye yapışma özelliği eş-zamanlı hücre analiz sistemiyle gösterildi. Ayrıca hücrelerin, hücre yoğunluğuyla orantılı paralel bir büyüme eğrisi gösterdiği görüldü.

Köpeklerden izole edilerek çoğaltılan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri için akım sitometri analizinde; anti-CD105 monoklonal, anti-human İntegrin beta 1/CD29, anti-CD73 poliklonal, anti-CD34 monoklonal, anti-CD90 monoklonal, anti-CD133 monoklonal yüzey işaretçileri kullanıldı. Hücrelerin CD73 (% 92,4), CD90 (% 99,8), CD105 (% 99,5)'in yanı sıra, CD29 (% 99,5)'u yüksek düzeyde ifade ettiği; diğer yandan hematopoetik işaretleyiciler olan CD34 ve CD133' ise ihmal edilebilecek düzeyde ifade ettiği belirlendi (Takemitsu vd. 2012). Böylece Uluslar arası Hücre Tedavi Derneği'nin MKH'ler için temel kriterlerinden olan CD73, CD90 ve CD105 yüzey antijenlerinin yüksek seviyede ifade edilmesi ve hematopoetik soya ait yüzey antijenleri olan CD133 ve CD34 ifade edilmemesi şartlarını sağladığı belirlendi (Hu vd. 2009). Benzer şekilde 2011 yılında Tharasanit ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli incelenmiştir. Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için yapılan n çalışmada akım sitometri sonuçlarına göre CD44 ve CD90 pozitif, hematopoetik kök hücre yüzey antijeni olan CD34 negatif bulunmuştur. Malagola ve arkadaşları tarafından 2016

yılında yapılan bir çalışmada ise köpek karaciğer ve kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerinin karakterizasyonu yapılmış ve CD105, CD90, CD166, CD29 ekspresyonu pozitif, CD45 ekspresyonu negatif bulunmuştur. Sonuç olarak; yapılan tez çalışmasında elde edilen akım sitometri sonuçları ile diğer çalışmalarda elde edilen akım sitometri sonuçlarının paralellik gösterdiği belirlendi.

Uluslararası Hücre Tedavi Derneği (ISCT)'nin MKH'leri tanımlamak için bildirmiş olduğu son özellik olan çoklu soy farklılaşmasını göstermek amacıyla köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelere osteojenik, kondrojenik ve adipojenik olmak üzere üç farklı soya farklılaşma protokolleri uygulandı. Hücrelerin adipojenik soya farklılaşması hücre kümelerini içeren güçlü morfolojik değişimlerin gözlenmesiyle ve lipid kofullarının birikimiyle gösterildi ve adipojenez; kültürün ondördüncü gününde lipid kofullarının Oil Red O boyası ile boyanmasıyla tespit edildi. Kondrojenik farklılaşma için köpek kemik iliği mezenkimal kök hücreler Alsiyan Mavisi ile boyandı. Hücre yapısındaki proteoglikan yapıları ve hücrelerin hücre dışı matriks yapısı ile çevrili olduğu pozitif Alsiyan boyaması ile gösterildi. Osteojenik soya farklılaştırılmış köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kültürün yirmisekizinci gündeki kalsiyum depoları ise osteositlerin Alizarin kırmızısı ile sarımsı-kırmızı renge boyanması ile gösterildi. 2015 yılında Bertolo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise kemik iliğinden izole edilen köpek ve insan mezenkimal kök hücreleri karakterize edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Çoklu soy farklılaşması Oil Red O, Von Kossa ve Alsiyan Mavisi boyamaları ile hisolojik olarak gösterilmiştir. Histokimya çalışmaları sonucunda farklılaşmaların gerçekleştiği ve hücrelerin mezenkimal özelliklerini koruduğu gösterilmiştir.

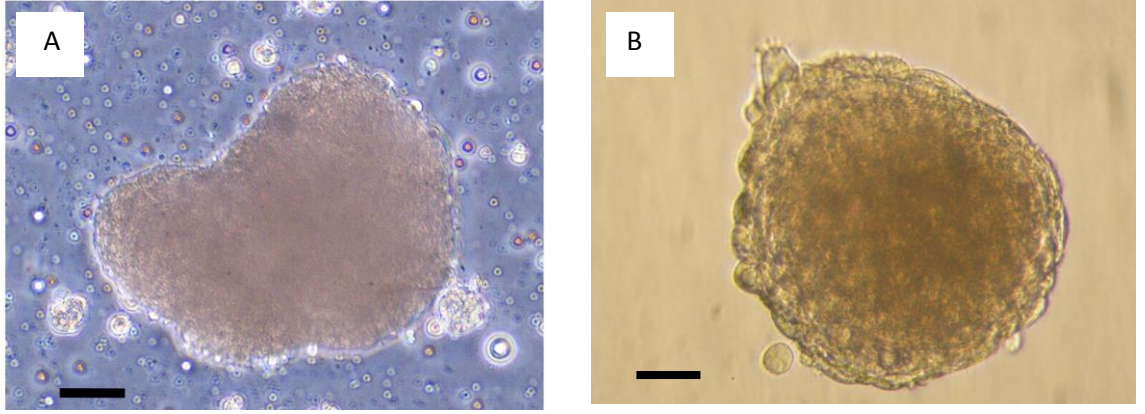
Köpek mezenkimal kök hücreleri belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra iki-aşamalı nörojenik farklılaştırma protokolüne geçildi. Bu protokol, öncelikle Nestin-pozitif nörokürelerin elde edilmesini ve daha sonra nörokürelerin dağıtılarak daha ileri düzeyde nörojenik farklılaştırma sürecine geçilmesini kapsamaktadır. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri in-vitro ortamda hızlı çoğalırlar ve nöronal, glial ve endodermal hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir. Buna rağmen; araştırmacılar tarafından

nörojenik farklılaşma için birçok farklı metot geliştirildiğinden standart sonuçlar elde etmek mümkün değildir (Suzuki vd. 2004).

Yapılan tez çalışmasında nöron-benzeri hücelere farklılaşma çalışması yapıldı (Kamishina vd. 2008). Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin nörokürelere indüklendiği ve çoğu hücrenin nöronal hücrelerin öncül işaretleyicisi olan nestin için pozitif olduğu; ayrıca; elde edilen nörokürelere geliştirilen indüksiyon metoduyla nöronal ve glial fenotiplere farklılaştığı da gösterildi. Farklılaşmada öncelikle öncül hücrelerin elde edilmesi, daha sonra ise bu hücrelerin nöronal hücre tiplerine farklılaştırılmasının daha doğru bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir.

Geliştirilen protokolde, nörojenik indüksiyonun ilk aşamasında üç gün süre ile kültür işleminde kullanılan nörobazal vasat, B-27 ve N-2'ye ilave olarak EGF ve bFGF büyüme faktörleri içermektedir. Epidermal büyüme faktörü ve bazik fibroblast büyüme faktörü nöral öncül hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği için tercih edilmiştir. Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin ~100-150 µm boyutlarındaki nörokürelere farklılaştığı gözlemlendi.

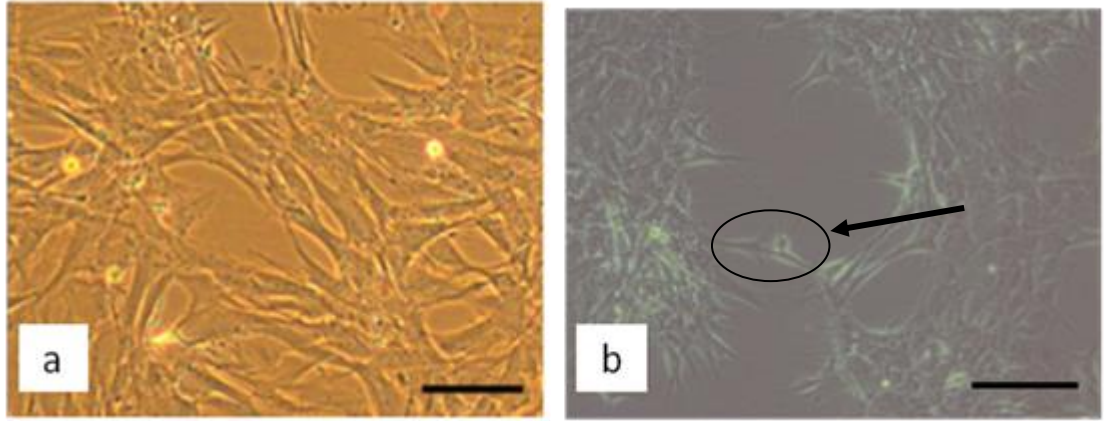
Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda genelde tek aşamada gerçekleşen nörojenik farklılaşma protokolleri uygulanmaktadır (Ladak vd. 2011, Takemitsu vd. 2012, Blecker vd. 2017). 2013 yılında Chung vd. tarafından yapılan bir çalışmada, köpek kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile adipoz mezenkimal kök hücrelerinin nöroküreye farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda ve tez çalışması sonucunda elde edilen nöroküre yapıları Şekil 5.1'de görülmektedir. Nöroküre yapılarının benzerlik gösterdiği ve yaklaşık 100 µm boyutlarında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.1 Nörokürelerin mikroskopik görüntüleri

A. Chung vd. tarafından 2013 yılında elde edilen nöroküre görüntüsü B. Tez çalışmasına ait nöroküre görüntüsü (Boyut çubuğu:100 μ m)

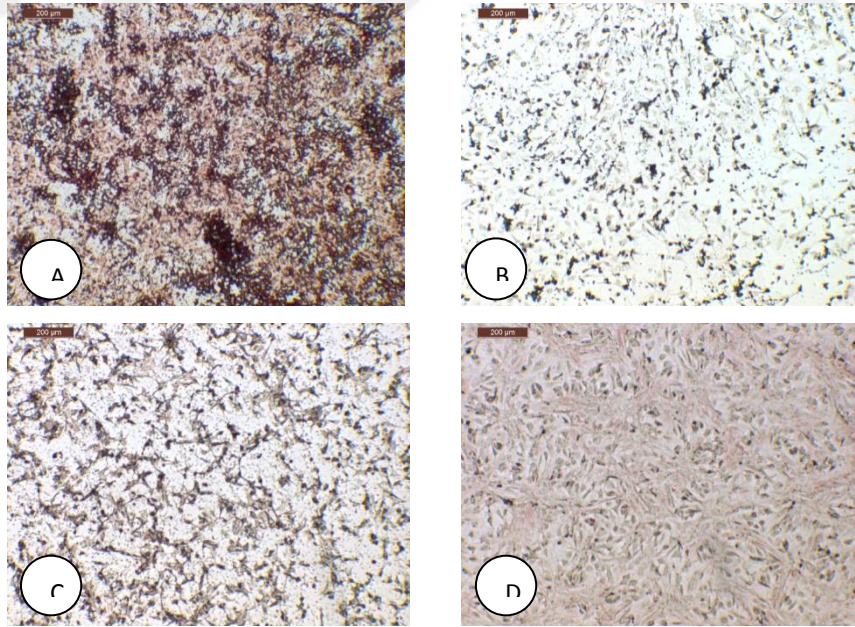
Nöroküreler elde edildikten sonra hücre süspansiyonu; yüzeyleri laboratuvarında poli-L (ornitin) ile kaplanıp sterilize edilen kültür kaplarına aktarıldıktan sonra sinir büyüme faktörü NGF, BDNF, B-27 ve N-2 içeren nörobazal vasatta altı gün süre ile kültüre alındılar. Yaklaşık olarak % 80 bolluğa ulaşan hücreler, faz kontrast mikroskobu ile görüntülendi. Mikroskop görüntüleri incelendiğinde, hücrelerin nöron-benzeri hücre morfolojisi gösterdiği ve nöron-benzeri hücreler arasında sinaps benzeri etkileşimlerin olduğu belirlendi (Wilcox vd. 2011). Oda ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin nöron-benzeri hücrelere farklılaşma özellikleri incelenmiştir. Farklılaşma için uygulanan protokolde indüksiyon amacıyla besiyeri olarak % 10 FBS, bFGF, EGF, cAMP ve IBMX içeren DMEM tercih edilmiştir ve indüksiyon ondört gün boyunca sürdürülmüştür.



Şekil 5.2 Nöron-benzeri hücrelerin mikroskobik görüntüleri

A. Oda vd. tarafından 2013 yılında elde edilen nöron-benzeri hücre görüntüsü B. Tez çalışmasına ait nöron-benzeri hücre görüntüsü (Boyut çubuğu:50 µm)

Köpek Kİ-MKH'lerinin antijenik işaretçilerle tanımlanması için astrositlerde bulunan hücre yüzey antijenine özgü anti-GFAP, oligodendrosit ve schwann hücrelerine özgü CNPaz, nöronlara özgü ise anti-nöron spesifik beta III tübulin ve MAP2 birincil antikorları kullanıldı.



Şekil 5.3 Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin nörojenik indüksiyonunun ikinci aşamasından sonra elde edilen nöron-benzeri hücrelerin immunhistokimya boyama sonuçları

A: MAP-2 boyaması, B: CNPaz boyaması, C: Beta III tubulin boyaması, D: GFAP boyaması

Köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin nöron-benzeri hücrelere farklılaştığı yapılan immunhistokimya boyamaları ile gösterildi. Nöronlara özgü anti-nöron spesifik beta III tübülün ve MAP2 boyamaları ile indüksiyon sonrası elde edilen hücre karışımının içinde yüksek yoğunlukta nöronal hücre olduğu belirlendi. Anti-GFAP boyaması ile nöron-benzeri hücre karışımının içinde astrositlerin de bulunduğu belirlendi. Son olarak; oligodendrosit ve schwann hücrelerine özgü anti-CNPaz boyaması ile köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin nörojenik farklılaştırılması sonucu elde edilen hücre topluluğunun içinde oligodendrosit ve schwann hücrelerinin de bulunduğu gösterildi.

Yapılan tez çalışmasıyla in-vitro ortamda, köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin, nöronal ve glial işaretçileri ifade eden hücrelere farklılaşabildiği ve bazı mezenkimal kök hücrelerin nöral potansiyel gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen nöron-benzeri hücrelerin yakın bir gelecekte etkin rejeneratif tedavilerin omurilik yaralanmalarında kullanılabileceği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir.

Sonuç olarak; köpeklerin insan hastalıklarının araştırılmasında hayvan modeli olarak kullanılabileceği, köpek kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin ise nörojenik farklılaşma ile nöron-benzeri hücrelere dönüşebildiği yapılan deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Arsenijevic, Y., Villemure, J.G., Brunet, J.F., Bloch, J.J., Déglon, N., Kostic, C., Zurn, A. and Aebischer, P. 2001. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Experimental Neurology*, 1, 48-62.
- Asplund, C., Bettcher, S. and Borchers, J. 2009. Facial protection and head injuries in ice hockey: a systematic review. *British Journal of Sports Medicine*, 43, 993-9.
- Avasthi, S., Srivastava, R.N., Singh, A. and Srivastava, M. 2007. Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article. *Internet Journal of Medical*, 3, 22-30.
- Bauman, J.A., Li, S., Yang, A., Huang, L. and Kole, R. 2010. Anti-tumor activity of splice-switching oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 38, 8348–8356.
- Baykan, E., Koc, A., Elcin, A.E. and Elcin, Y.M. 2014. Evaluation of a biomimetic poly (ϵ -caprolactone)/ β tricalcium phosphate multispiral scaffold for bone tissue engineering: In vitro and in vivo studies. *Biointerphases*, 9, 029011.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana and F., Chimenti, S. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114, 763–76.
- Bergsland, M. 2010. From stem cell to neuron-a sox perspective. (Yayınlanmış doktora tezi). Karolinska Intitutet, Stockholm, Sweden.
- Bersenev, A. 2015. Cell therapy clinical trials – 2014 report. *Cell Trials blog*.
- Bertolo, A., Schlaefli, P., Malonzo-Marty, C., Baur, M., Pötzel, T., Steffen, F. and Stoyanov, J. 2015. Comparative Characterization of Canine and Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow. *International Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 2, 1.
- Bertolo, A., Steffen, F., Malonzo, C. and Stoyanov, J. 2015. Canine Mesenchymal Stem Cell Potential and the Importance of Dog Breed: Implication for Cell-Based Therapies. *Cell Transplantation*, 24, 1969–1980
- Bez, A., Corsini, E., Curti, D., Biggiogera, M., Colombo, A., Nicosia, R.F., Pagano, S.F. and Parati, E.A. 2003. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Research*, 993, 18-29.
- Blanpain, C., Horsley, V. and Fuchs, E.. 2007. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*, 128, 445-458.
- Blecker, D., Elashry, M.I., Heimann, M., Wenisch, S. and Arnhold, S. 2017. New Insights into the Neural Differentiation Potential of Canine Adipose Tissue-

- Derived Mesenchymal Stem Cells. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 46, 304-315.
- Brignone, M.S., Lanciotti, A., Camerini, S., Nuccio, C., Petrucci, T.C., Visentin, S. and Ambrosini, E. 2015. MLC1 protein: a likely link between leukodystrophies and brain channelopathies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 66.
- Cai, J., Wu, Y., Mirua, T., Pierce, J.L., Lucero, M.T., Albertine, K.H., Spangrude, G.J. and Rao, M.S. 2002. Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Developmental Biology*, 251, 221–240.
- Caplan, A.I. 2017. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. *Stem Cells Translational Medicine*, 6, 1445–1451.
- Chen, S., Cai, Q., Shen, Y., Cai, X. and Lei, H. 2014. Combined use of NGF/BDNF/bFGF promotes proliferation and differentiation of neural stem cells *in vitro*. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 38, 74–78.
- Chung, C., Fujita, N., Naoya, K., Sho, Y., Eunryel, N. and Ryohei, N. 2013. A Comparison of Neurosphere Differentiation Potential of Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *The Japanese Society of Veterinary Science*, 75, 879–886.
- Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I. and Prockop, D.J. 2001. *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 148-152.
- Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Nobuyoshi, Y.H., Sawada, H., Ishikawa, H., Mimura, T., Kitada, M. and Suzuki, Y.C. 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 1701–1710.
- Diez del Corral, R. and Storey, K.G. 2001. Markers in vertebrate neurogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 22, 835–839.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- Elcin, Y.M. 2003. *Tissue engineering, stem cells, and gene therapies*. Springer US: Springer Science & Business Media, 1-340.
- Fu, L., Zhu, L., Huang, Y., Lee, T.D., Forman, S.J. and Shih, C. 2008. Derivation of Neural Stem Cells from Mesenchymal Stem Cells: Evidence for a Bipotential Stem Cell Population. *Stem Cells and Development*, 17, 1109–1122.

- Gage, F.H., Ray, J. and Fisher, L.J. 1995. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, 18, 159-92.
- Gimble, J. And Guilak, F. 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5, 362-9.
- Halvorsen, Y.D., Franklin, D., Bond, A.L., Hitt, D.C., Auchter, C., Boskey, A.L., Paschalis, E.P., Wilkison, W.O. and Gimble, J.M. 2001. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Engineering*, 7, 729-41.
- Harrison, N., Mitterbauer, M., Tobudic, S., Kalhs, P., Rabitsch, W., Greinix, H., Burgmann, H., Willinger, B., Presterl, E. And Forstner, C. 2015. Incidence and characteristics of invasive fungal diseases in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 15, 584.
- Hayes, B., Fagerlie, S.R., Ramakrishnan, A., Baran, S., Harkey, M., Graf, L., Bar, M., Bendoraite, A., Tewari, M. and Torok, S.B. 2008. Derivation, characterization, and in vitro differentiation of canine embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 465–473.
- Hoterger, R. 1921. Histogenesis y evolucion normal; exodo y distribucion regional de la microglia. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 11, 213–268.
- Inanç, B. and Elçin, Y.M. 2011. Stem cells in tooth tissue regeneration--challenges and limitations. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7, 683-692.
- Jeffery, N.D., Smith, P.M., Lakatos, A. and Ibanez, C. 2006. Clinical canine spinal cord injury provides an opportunity to examine the issues in translating laboratory techniques into practical therapy. *Spinal Cord*, 44, 584–593.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M. and Verfaillie, C.M. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Experimental Hematology*, 30, 896–904.
- Jung, D.I., Ha, J., Kang, B.T., Kim, J.W., Quan, F.S., Lee, J.H., Woo, E.J. and Park, H.M. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 285, 67-77.
- Kamishina, H., Cheeseman, J.A. and Clemmons, R.M. 2008. Nestin-positive spheres derived from canine bone marrow stromal cells generate cells with early neuronal and glial phenotypic characteristics. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 44, 140–144.

- Kamishina, H., Deng, J., Oji, T., Cheeseman, J.A. and Clemmons, R.M. 2006. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 67, 1921-1928.
- Kettenmann, H. 2011. Microglia. *Glia*, 59, S2–S3.
- Kim, E.Y., Lee, K., Yu, J., Lee, J., Kim, K., Han, K., Park, K., Lee, D. and Kim, M. 2014. Neuronal cell differentiation of mesenchymal stem cells originating from canine amniotic fluid. *Human Cell*, 27, 51–58.
- Kingham, P.J., Kalbermatten, D.F., Mahay, D., Armstrong, S.J., Wiberg, M. and Terenghi, G. 2007. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology*, 207, 267-74.
- Kintner, C. 2002. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, 22, 639 –643.
- Kisiel, A., H., Laurie, A., Masaoud E., Bailey T.R., Gonzalez, E. And Nino-Fong, R. 2012. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American Journal of Veterinary Research*, 73, 1305-1317.
- Knight, M.N. and Hankenson, K.D. 2013. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Advances in Wound Care*, 2, 6.
- Ladak, A., Olson, J., Tredget, E.E. and Gordon, T. 2011. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Experimental Neurology*, 228, 242–252.
- Lee, J.A., Kim, B., Jo, C.H., Choi, C.W., Kim, E., Kim, H., Yoon, K. and Choi, J. 2010. Mesenchymal Stem-Cell Transplantation for Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rat Model. *Pediatric Research*, 67, 42–46.
- Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M. and McKay, R.D. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 18, 675–679.
- Lei, Z., Yongda, L., Jun, M., Yingyu, S., Shaoju, Z., Xinwe, Z. And Mingxue, Z. 2007. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biology International*, 31, 916-923.
- Levy, A.D., Patel, N., Abbott, R.M., Dow, N., Miettinen, M. and Sobin, L.H. 2004. Gastrointestinal Stromal Tumors in Patients with Neurofibromatosis: Imaging Features with Clinicopathologic Correlation. *American Journal of Roentgenology*, 183, 6.

- Lim, J.H., Boozer, L., Mariani, C.L., Piedrahita, J.A. and Olby, N.J. 2010. Generation and characterization of neurospheres from canine adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Reprogram*, 12, 417-425.
- Loeffler, M. and Potten, C.S. 1997. Stem-like cells and cellular pedigrees, a conceptual introduction. In: *Stem cells*. Potten C.S. Academic Press, 1-27.
- Lu, P., Blesch, A. and Tuszynski, M.H. 2004. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *Journal of Neuroscience Research*, 77, 174-191.
- Ludwin, S.K. 1997. The pathobiology of the oligodendrocyte. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56, 111–124.
- Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoudé, G.A. and Barrandon, Y. 2008. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, 456, 250-254.
- Malagola, E., Teunissen, M., van der Laan, L., Verstegen, M., Schotanus, B.A., Steenbeek, F.G., Penning, L.C., Wolferen, M., Tryfonidou, M.A. and Spee, B. 2016. Characterization and Comparison of Canine Multipotent Stromal Cells Derived from Liver and Bone Marrow. *Stem Cells and Development*, 25, 139–150.
- Mammadov, B., Karakas, N. and Isik, S. 2011. Comparison of long-term retinoic acidbased neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 47, 484–491.
- Mayer-Proschel, M., Kalyani, A.J., Mujtaba, T. and Rao, M.S. 1997. Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron*, 19, 773–785.
- Mohammad, H., Marchisella, F., Ortega-Martinez, S., Hollos, P., Eerola, K., Komulainen, E., Kuleskaya, N., Freemantle E., Fagerholm, V., Savontous, E., Rauvala, H., Peterson, B.D., van Praag, H. and Coffey, E.T. 2016. JNK1 controls adult hippocampal neurogenesis and imposes cell-autonomous control of anxiety behaviour from the neurogenic niche. *Molecular Psychiatry*, 1-17.
- Mu, M.W., Zhao, Z.Y. and Li, C.G. 2015. Comparative study of neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by different induction methods. *Genetics and Molecular Research*, 14, 14169-76.
- Muñoz-Elías, G., Woodbury, D. and Black, I.B. 2003. Marrow Stromal Cells, Mitosis, and Neuronal Differentiation: Stem Cell and Precursor Functions. *Stem Cells*, 21, 437-448.

- Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A. and Fischer, I. 2004. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *Journal of Neuroscience Research*, 77, 192–204
- Oda, Y., Tani, K., Kanei, T., Haraguchi, T., Itamoto, K., Nakazawa, H. and Taura, Y. 2013. Characterization of neuron-like cells derived from canine bone marrow stromal cells. *Veterinary Research Communications*, 37, 133–138.
- Parker, H.G., Shearin, A.L. and Ostrander, E.A. Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyses in the domestic dog. *Annual Review of Genetics*, 44, 309–336.
- Penfield, W. 1932. Neuroglia: normal and pathological. In: *Cytology and Cellular Pathology in the Nervous System*, edited by Penfield W. New York: Hoeber, 2, 421–479.
- Pereira, J.S., Silva, A.B.F., Martins, A.L.B., Ferreira, A.M.R. and Brooks, D.E. 2000. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. *Veterinary Ophthalmology*, 3, 43–47.
- Perry, V.H. and Teeling, J. 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol*, 35, 601–612.
- Pettersson, J. 2011. Biosynthetic Conduits and Cell Transplantation for Neural Repair. (Yayınlanmış doktora tezi). Department of Integrative Medical Biology Section for Anatomy. Umea University, Umea.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143–147.
- Purves, D., Augustine G.J. and Fitzpatrick D. 2001. Neuroglia cells. *Neuroscience*, 2nd Edition.
- Radtke, C., Schmitz, B., Spies, M., Kocsis, J.D. and Vogt, P.M. 2009. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27, 817–823.
- Razavi, S., Razavi, M.R., Kouhestani, M.K., Mardani, M. and Mostafavi, F.S. 2013. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: Promotes neurogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440, 381–387.

- Reid, A.J., Sun, M., Wiberg, M., Downes, S., Terenghi, G. and Kingham, P.J. 2011. Nerve repair with Adipose-derived Stem Cells Protects Dorsal root Ganglia Neurons from Apoptosis. *Neuroscience*, 199, 515-522.
- Requicha, J.F., Viegas, C.A., Albuquerque, C.M., Azevedo, J.M., Reis, R.L. and Gomes, M.E. 2012. Effect of Anatomical Origin and Cell Passage Number on the Stemness and Osteogenic Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8, 1211–1222.
- Reynolds, B.A. and Weiss, S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Neuron*, 1, 65-78.
- Rismanchi, N., Floyd, C.L., Berman, R.F. and Lyeth, B.G. 2003. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. *Brain Research*, 991, 46-55.
- Ryu, H., Lim, J., Byeon, Y., Park, J., Seo, M., Lee, Y., Kim, W., Kang, K. and Kweon, O. 2009. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *Journal of Veterinary Science*, 10, 273-284.
- Sabelström, H., Stenudd and M., Frisén, J. 2014. Neural stem cells in the adult spinal cord. *Experimental Neurology*, 260, 44–49.
- Sachin, A., Srivastava, R.N. and Ajai, S. 2008. Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article. *Internet Journal of Medical Update*, 3, 1.
- Sago, K., Tamahara, S., Tomihara, M., Matsuki, N., Asahara, Y., Takei, A., Bonkobara, M., Washizu, T. and Ono, K. 2007. In Vitro Differentiation of Canine Celiac Adipose Tissue-Derived Stromal Cells into Neuronal Cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 70, 353–357.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T., Saporta, S., Janssen, W., Patel N., Cooper, D. and Sanberg, P.R. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology*, 164, 247–256.
- Schäffler, A. and Büchler, C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 25, 27.
- Shakhbazov, A.V., Kosmacheva, S. M., Kartel, N.A. and Potapnev, M.P. 2010. Neurogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Transgenic approach. *Cell and Tissue Biology*, 4, 309–312.

- Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M. and Littlefield, J.W. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 13726-13731.
- Silvani, G., Galli, D., Benedetti, L., Ceccarelli, G., Crosetto, N., Olivieri, C., Danesino, C. and Angelis, M. 2011. Peculiar Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cell Clones Suitable as Tissue Engineering Models. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 2, 106.
- Sofroniew, M. and Vinters, H. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 7–35.
- Suzuki, H., Taguchi, T., Tanaka, H., Kataoka, H., Li, Z., Muramatsu, K., Gondo, T. and Kawai, S. 2004. Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 3.
- Takahashi, J., Palmer, T.D. and Gage, F.H. 1999. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures *Journal of Neurobiology*, 38, 65–81.
- Takemitsu, H., Zhao, D., Yamamoto, I., Harada, Y., Michishita, M. and Arai, T. 2012. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Veterinary Research*, 8, 150.
- Tharasanit, T., Phutikanit, N., Wangdee, C., Soontornvipart, K., Tantrajak, S., Kaewamatawong, T., Suwimonteerabutr, J., Supaphol, P. and Techakumphu, M. 2011. Differentiation Potentials of Canine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41, 79-86.
- Tropepe, V., Hitoshi, S., Sirard, C., Mak, T.W., Rossant, J. and van der Kooy, D. 2001. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*, 30, 65-78.
- Trounson, A. and McDonald, C. 2015. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*, 17, 11-22.
- Uranio, M., Valentini, L., Lange-Consiglio, A., Caira, M., Guaricci, A. C., L'Abbate, A., Catacchio, R., Ventura, M., Cremonesi, F. and Dell'Aquila, M.E. 2011. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Molecular Reproduction and Development*, 78, 361–373.

- Waltona, R. and Wolfea, J. 2008. In vitro growth and differentiation of canine olfactory bulb-derived neural progenitor cells under variable culture conditions. *Journal of Neuroscience Methods*, 169, 158-167.
- Weissman, I.L. 2004. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell*, 100, 157-168.
- Wilcox, C.E., Teshiba, T.M., Merideth, F., Ling, J. and Mayer, A.R. 2011. Enhanced cue reactivity and fronto-striatal functional connectivity in cocaine use disorders. *Drug and Alcohol Dependence*, 115, 137-144.
- Woodbury, R.L., Hardy, J.S. and Randall, L.L. 2002. Complex behavior in solution of homodimeric SecA. *Protein Science*, 11, 875-882.
- van den Berg, M.E., Castellote, J.M., Mahillo-Fernandez, I. and de Pedro-Cuesta, J. 2010. Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Neuroepidemiology*, 34, 184-92.
- Vishwakarma, S., Bardia, A., Tiwari, S., Paspala, S. and Khan, A.A. 2014. Current concept in neural regeneration research: NSCs isolation, characterization and transplantation in various neurodegenerative diseases and stroke: A review. *Journal of Advanced Research*, 5, 277-294.
- Volk, S.W., Wang, Y. and Hankenson, K.D. 2012. Effects of Donor Characteristics and Ex Vivo Expansion on Canine Mesenchymal Stem Cell Properties: Implications for MSC-Based Therapies. *Cell Transplantation*, 21, 2189-2200.
- Yamaguchi, S., Kuroda, S., Kobayashi, H., Shichinohe, H., Yano, S., Hida, K., Shinpo, K., Kikuchi, S. and Iwasaki, Y. 2006. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC)--a preliminary study using microarray analysis. *Brain Research*, 1087, 15-27.
- Zaheer, A., Zhong, W., Uc, E.Y., Moser, D.R. and Lim, R. 1995. Expression of mRNAs of multiple growth factors and receptors by astrocytes and glioma cells: detection with reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 15, 221-237.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279-4295.
- Zwart, I., Hill, A.J., Gridlestone, J., Manca, M.F., Navarrete, R., Navarrete, C. and Jen, L.S. 2008. Analysis of neural potential of umbilical cord blood derived multipotent mesenchymal stem cells in response to a range of neurogenic stimuli. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 1902-1915.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep KURT

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 18/07/1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Etimesgut Anadolu Lisesi, 2004

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölüm, 2008

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, 2011

Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, 2017

Yayınlar (SCI)

Can, P., Beşaltı, Ö., Akpınar, E., **Aktaş, Z.**, Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2010. Subarachnoid transplantation of autologous neurogenically induced bone marrow derived mesenchymal stem cells for the treatment of fibrocartilaginous embolic myelopathy in two dogs. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 40, 120-123.

Beşaltı, Ö., Can, P., Akpınar, E., **Aktaş, Z.**, Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2015. Intraspinal Transplantation of Autologous Neurogenically-Induced Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Paraplegic Dogs without Deep Pain Perception Secondary to Intervertebral Disk Disease. **Turk Neurosurg**, 25, 4, 625-632.

Beşaltı, Ö., **Aktaş, Z.**, Can, P., Akpınar, E., , A.E. and Elçin, Y.M.2016. The use of autologous neurogenically-induced bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of paraplegic dogs without nociception due to spinal trauma. **The Japanese Society of Veterinary Science**, 78, 1465–1473.