

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İNSAN GÖBEK KORDONUNDAN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

SERBAY ÖZKAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. MERAL KOYUTÜRK**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

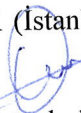


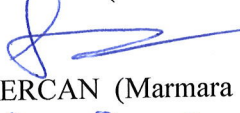

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Arş. Gör. Serbay ÖZKAN tarafından hazırlanan İnsan Göbek Kordonundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

05 / 01 / 2016

Tez Sınav Jürisi

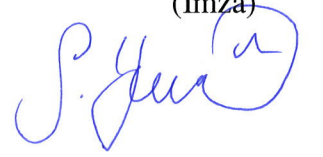
<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)	
2.Prof. Dr. İsmail SEÇKİN (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)	
3.Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU (İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)	
4.Prof. Dr. Serap ARBAK (Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)	
5.Prof. Dr. Feriha ERCAN (Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

SERBAY ÖZKAN

(İmza)



İTHAF

Yeğenlerim EGEMEN ve MELİS'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tezimin başlangıç aşamasından sonuna kadar bilgi ve tecrübeleri ile hep yanımda olan, tezim için gerekli tüm imkânları sağlayan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Meral KOYUTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yüksek lisans eğitimime katkıları olan kürsümüzün değerli hocaları Sayın Prof. Dr. İsmail SEÇKİN'e, Sayın Prof. Dr. Mustafa TAŞYÜREKLİ'ye Sayın Prof. Dr. Şenol ERTÜRKÖĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Elif GÜZEL MEYDANLI'ya ve kürsümüzün emekli olmuş hocalarından Sayın Prof. Dr. Faruk ALKAN'a ve Sayın Prof. Dr. Oktay ARDA'ya tek tek teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca İ.Ü. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.B.D öğretim üyeleri Sayın. Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu, Sayın Prof. Dr. Bülent Ahışhalı, Sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR ve Sayın Prof. Dr. Leyla TAPUL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin flow sitometrik analizlerinin yapılması ve değerlendirilmesindeki iş birliği için Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A.B.D. öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Zafer BAŞLAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezim için gerekli göbek kordonu materyallerinin temin edilmesindeki iş birliği için Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Semih KALELİ'ye ve Uz. Dr. Mahmut ÖNCÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezim sırasında kültür laboratuvarı teknikleri konusunda yardımlarını esirgemeyen ve bana yol gösteren Dr. Öğr. Burcu BİLTEKİN'e ve Araş. Gör. Dr. Gamze TANRIVERDİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin elektron mikroskopik incelemeleri kısmında bana yardımcı olan, bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen başta Uz. Dr. Pelin ERTÜRKÜNER'e olmak üzere Arş. Gör. Tuğba EKİZ YILMAZ'a, Dr. Öğr. Aslı EMİNCİK'e ve Yük. Öğr. Zehra SEZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin elektron mikroskopi parçalarının hazırlanmasında yardımcı olan Azize HARDAL GÜMÜŞYAZICI ve Ercüment BOZTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, yüksek lisans arkadaşlarım Arş. Gör. Başak İŞILDAR'a ve Arş. Gör. Halil İbrahim SAYGI'ya, Dr. Öğr. Belisa KALECİ'ye, Dr. Öğr. Sibel DEMİRCİ, Uz. Bio. Emine MAMAL'a, Uz. Dr. Şirin BAKTI DEMİRAY'a, Uz. Öğr. Kübra ÇAKILLI'ya ve Uz. Öğr. Betül KAYMAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Kurum Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 095.2014-YL-35/27-09

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kök Hücreler.....	5
2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	5
2.1.2. Yetişkin Kök Hücreler	6
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler.....	7
2.2.1. MKH'lerin Karakterizasyonu	10
2.2.2. MKH'lerin Bağışıklık Reaksiyonu Düzenleyici Etkisi.....	10
2.2.2.1. Kalıtsal Bağışıklık Sistemi	10
2.2.2.2. Adaptif Bağışıklık Sistemi	11
2.2.3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları	12
2.2.3.1. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri	12
2.2.3.2. Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücreleri ve Avantajları	12
2.3. İnsan Göbek Kordonu	13
2.3.1. Göbek Kordonu Stromal Hücreleri	14
2.3.1.1. Miyofibroblastik Hücreler.....	14
2.3.1.2. Bölgesel Dağılımı.....	15
2.3.2. Göbek Kordonunun Ekstraselüler Matriksi	16
2.4. Göbek Kordonundan Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu	17
2.4.1. Doku Eksplantı Yöntemi.....	17

2.4.2. Enzimatik Yöntem	18
2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları	18
2.5.1. Kanser Terapisi	18
2.5.2. Renal Hastalıkların Tedavisi	21
2.5.3. Kardiyovasküler Hastalıkların Tedavisi.....	22
2.5.4. Karaciğer Hastalıklarının Tedavisi	23
2.5.5. Kıkırdak Yenilenmesi	24
2.5.6. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereçler.....	27
3.1.1. Alet ve teçhizat.....	27
3.1.2. Kimyasal malzemeler.....	28
3.1.3. Cihazlar	29
3.2. Göbek Kordonundan MKH'lerin İzolasyonu	29
3.2.1. Göbek Kordonlarının Taşınması.....	29
3.2.2. MKH'lerin Bölgesel İzolasyonu	30
3.2.2.1. Subamniyotik Alandan İzolasyon	30
3.2.2.2. Perivasküler Alandan İzolasyon.....	31
3.2.2.3. İntervasküler Alandan İzolasyon.....	32
3.3. İzole Edilen MKH'lerin Işık Mikroskopik Analizi.....	32
3.4. İzole Edilen MKH'lerin Proliferasyon Hızlarının Hesaplanması	33
3.5. İzole Edilen MKH'lerin Flow Sitometrik Analizi	33
3.6. Ultrastrüktürel Yöntemler	34
3.7. İstatistiksel Yöntemler	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	35
4.2. Proliferasyon Değerlendirmesi	42
4.3. Flow Sitometrik Bulgular	45
4.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları.....	55
5. TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	71
FORMLAR	81
ETİK KURUL KARARI	83

ÖZGEÇMİŞ.....84



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Farklı iGK-MKH'lerin ilerleyen pasajlardaki katlanma süreleri (saat olarak).	42
Tablo 4-2: Farklı iGK-MKH gruplarının erken (P1-P4) ve geç dönemdeki (P4-P7) ve genel (P1-P7) PKS'lerinin ortalamaları (saat olarak).	43
Tablo 4-3: Enzimatik ve doku eksplantı yöntemleriyle incelenen örneklerde ilk hücrelerin ortaya çıkma süresi (gün olarak).	43
Tablo 4-4: iGK-MKH'lerinin CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyonlarının flow sitometrik analizleri	45
Tablo 4-5: İzole edilen iGK-MKH'lerinde ayırt edilen yapıların miktarlarının semi-kantitatif olarak değerlendirilmesi.	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:Kök hücre hiyerarşisi (Salem ve Thiemermann, 2010).	5
Şekil 2-2: Yetişkin kök hücreler (Uccelli ve ark. 2008).	7
Şekil 2-3: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri (Uccelli ve ark. 2008).	9
Şekil 2-4: Göbek kordonun şematik gösterimi (Nazari-Shafti ve ark. 2015).	14
Şekil 4-1: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.	35
Şekil 4-2: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.	36
Şekil 4-3: Erken dönemde iGK-MKH'leri gruplarının genel morfolojisi.	37
Şekil 4-4: Geç dönemde iGK-MKH'leri gruplarının genel morfolojisi.	37
Şekil 4-5: Doku eksplantı ile izole edilen iGK-MKH'leri gruplarının geç ve erken dönem hücre morfolojilerinin karşılaştırılması; üst panel 2. pasaj hücreleri alt panel 5. pasaj hücreleri.	38
Şekil 4-6: Enzimatik yöntem ile izole edilen iGK-MKH'leri gruplarının geç ve erken dönem hücre morfolojilerinin karşılaştırılması; üst panel 2. pasaj hücreleri alt panel 5. pasaj hücreleri.	38
Şekil 4-7: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.	39
Şekil 4-8: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.	40
Şekil 4-9: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.	41
Şekil 4-10: Farklı iGK-MKH'lerin ilerleyen pasajlardaki katlanma süresindeki değişimi.	42
Şekil 4-11: Enzimatik ve doku eksplantı yöntemleri ile ilk hücrelerin gözlenme sürelerinin ortalamaları ve standart sapmalarının grafiksel analizi.	44
Şekil 4-12: Enzimatik ve doku eksplantı yöntemleri ile elde edilen primer hücrelerin (P0) invert mikroskop ile çekilen görüntüleri.	44
Şekil 4-13: Farklı iGK-MKH'leri gruplarının 3. pasajında yapılan flow analizlerinin nokta alan (dot blot) grafikleri.	46
Şekil 4-14: Farklı iGK-MKH'leri gruplarının 5. pasajında yapılan flow analizlerinin nokta alan (dot blot) grafikleri.	47
Şekil 4-15: Farklı iGK-MKH'leri gruplarının 7. pasajında yapılan flow analizlerinin nokta alan (dot blot) grafikleri.	48

Şekil 4-16: 3. Pasajdaki farklı iGK-MKH gruplarının CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyeleri.....	49
Şekil 4-17: 5. Pasajdaki farklı iGK-MKH gruplarının CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyeleri.....	50
Şekil 4-18: 7. Pasajdaki farklı iGK-MKH gruplarının CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyeleri.....	50
Şekil 4-19: IVA-E grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.....	51
Şekil 4-20: IVA-D grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.....	52
Şekil 4-21: PVA-E grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.....	52
Şekil 4-22: PVA-D grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.....	53
Şekil 4-23: SAA-E grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.....	53
Şekil 4-24: SAA-D grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.....	54
Şekil 4-25: İzole edilen iGK-MKH'lerinin genel morfolojisi.....	56
Şekil 4-26: 3. Pasaj IVA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.....	57
Şekil 4-27: 3. Pasaj PVA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.....	58
Şekil 4-28: 3. Pasaj SAA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.....	59
Şekil 4-29: 5. Pasaj IVA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.....	60
Şekil 4-30: 5. Pasaj PVA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.....	61
Şekil 4-31: 5. Pasaj SAA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.....	62

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MKH:	Mezenkimal Kök Hücre
GK:	Göbek Kordonu
SAA:	Subamniyotik Alan
PVA:	Perivasküler Alan
IVA:	İntervasküler Alan
HKH:	Hematopoetik Kök Hücre
Kİ:	Kemik İliği
iGK:	İnsan Göbek Kordonu
ESM:	Ekstraselüler Matriks
D:	Doku Eksplantı
E:	Enzimatik
EKH:	Embriyonik Kök Hücre
iPKH:	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
YKH:	Yetişkin Kök Hücre
CD:	Başkalaşım Kümesi (Cluster of differentiation)
DH:	Dendritik Hücre
MHK:	Temel Doku Uyum Kompleksi (Major Histokompatibilite Kompleksi)
IL:	İnterlökin
NK:	Doğal Öldürücü Hücre (Natural Killer)
IFNγ:	İnterferon Gama
HLA-G:	İnsan Lökosit Antijeni-G
GAG:	Glikozaminoglikan
HA:	Hiyalüronik Asit
SDF:	Stromal Hücre-Kökenli faktör
CXCR:	Kemokin Reseptör
PDGF:	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
ERK:	Ekstraselüler Sinyal ile Regüle Edilmiş Kinaz
MAPK:	Mitojen ile Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
AKT:	Protein Kinaz B

- GFP:** Yeşil Floresan Protein
- AME:** Akut Miyokard Enfarktüsü
- PBS:** Fosfatla Tamponlanmış Tuz Solüsyonu
- H:** Hematoksilen
- E:** Eozin
- P:** Pasaj
- SAA-D:** Subamniyotik Alan Doku Eksplantı
- PVA-D:** Perivasküler Alan Doku Eksplantı
- IVA-D:** İntervasküler Alan Doku Eksplantı
- SAA-E:** Subamniyotik Alan Enzimatik
- PVA-E:** Perivasküler Alan Enzimatik
- IVA-E:** İntervasküler Alan Enzimatik
- MU:** Mikrovillus Benzeri Uzantı
- FU:** Filopodyum Uzantısı
- GER:** Granüllü Endoplazmik Retikulum
- OEV:** Otofajik ve Endositotik Vezikül
- VY:** Vakuol Yapısı
- GG:** Glikojen Granülleri
- gGER:** Genişlemiş Granüllü Endoplazmik Retikulum
- MISL:** Mikrovillus Benzeri Yapılar İçeren İnterasitoplazmik Luminal Alan
- LD:** Lipit Damlacığı

ÖZET

Özkan, S. (2016). İnsan Göbek Kordonundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji A.D. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), pluripotent kök hücreler olup, rejeneratif tıpta oldukça önemli bir yer tutmaktadır. MKH kaynakları arasında, göbek kordonu (GK), invaziv yöntem gerektirmemesi ve bio-etik açıdan daha az sorun teşkil etmesi bakımından avantajlıdır. Bu çalışmada insan GK'nun subamniyotik (SAA), intervasküler (IVA) ve perivasküler alanlarından (PVA), enzimatik ve doku eksplanti yöntemleri kullanılarak, MKH izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Sezaryen ile doğum yapan term gebelerden elde edilen insan GK (iGK) dokularının farklı bölgelerinden -SAA, PVA ve IVA- enzimatik ve doku eksplanti yöntemleri kullanılarak MKH'ler izole edildi. iGK-MKH'leri, farklı pasajlarda morfolojilerinin ışık ve elektron mikroskopik incelenmesiyle, CD34, CD45, CD44 ve CD90 protein ekspresyonlarının flow sitometrik analiziyle ve proliferasyon oranları popülasyon katlanma sürelerinin hesaplanmasıyla karakterize edildi. Farklı bölgelerden, farklı yöntemler kullanılarak izole edilen iGK-MKH'lerinde ışık mikroskopik olarak erken dönemde aktif, geç dönemde inaktif fibroblast benzeri hücre morfolojisi izlenmiş olup, elektron mikroskopik incelemelerinde ökromatik nükleus, belirgin nükleolus, genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum yapıları görülmüştür. Gruplar arasında, proliferasyon hızlarında, belirgin bir fark izlenmemiştir. Flow sitometrik analizlerde, MKH belirteçleri olan CD44 ve CD90 yüksek oranda eksprese edilirken, hematopoetik kök hücre belirteçleri olan CD34 ve CD45 ekspresyonları ise düşük seviyelerde bulunmuştur. Elde edilen bulgular, farklı bölgelerden ve farklı yöntemler ile izole edilen iGK-MKH'leri arasında belirgin bir farklılığın olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, Göbek Kordonu, Enzimatik Yöntem, Doku Eksplanti, Geçirimli Elektron Mikroskobu.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Kurum Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 095.2014-YL-35/27-09

ABSTRACT

Ozkan, S. (2016). Isolation and Characterization of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. İstanbul University, Institute of Medical Sciences, Histology and Embryology Department. Master Thesis, İstanbul.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are pluripotent stem cells and considered as an important tool in regenerative medicine. Among the MSC sources, umbilical cord (UC) is advantageous in terms of not requiring invasive techniques and having less bio-ethical concerns. This study is aimed to isolate and characterize the MSCs from subamniotic (SAA), intervacular (IVA) and perivascular areas (PVA) of UC by utilizing two different methods namely enzymatic and tissue explant. Human UCs (hUCs) were obtained from full term pregnancies by cesarean section delivery. MSCs were isolated from different regions of UCs, SAA, PVA and IVA by applying enzymatic and tissue explant methods. Moreover, hUC-MSC were characterized at different passages by light and electron microscopic investigation for defining the morphologies; flow cytometry analysis for identifying the expression levels of CD34, CD45, CD44 and CD90; and population doubling time calculation for proliferation rates. hUC-MSCs, which were isolated from different regions by utilizing different methods, have active and inactive fibroblast like cell morphology by light microscopic analysis at early period and late period respectively. In electron microscopic analysis, euchromatic nucleus, distinct nucleolus and dilated rough endoplasmic reticulum were defined. Among the groups, there was no clear difference in proliferation rate. Furthermore, flow cytometry analysis showed that CD44 and CD90 MSC markers were highly expressed, while CD34 and CD45 hematopoietic stem cell markers were expressed at very low degree. Those results have showed that there is no conspicuous difference among the hUC-MSCs obtained from different regions by different methods.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Umbilical Cord, Enzymatic Method, Tissue Explant, Transmission Electron Microscope.

The present study was funded by the Foundation of Academic Member Training Program. Project No: 095.2014-YL-35/27-09

1. GİRİŞ VE AMAÇ

MKH'ler pluripotent kök hücreler olup, birçok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanır. İn vitro ve in vivo çalışmalarda bu hücrelerin farklılaşabildiği hücre tipleri arasında; osteoblastlar, kondroblastlar, miyositler, adipositler ve pankreas adacıklarının beta hücreleri gösterilmiştir (Porcellini, 2009). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda, MKH'lerin nöron ve astrositlere de farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Deans ve Moseley, 2000; Pittenger ve ark. 1999; Prockop, 1997).

Mezenkim, mezoderm tabakasından köken alan embriyonik bağ doku olup, hematopoetik hücrelere ve bağ dokuya köken vermektedir. MKH'ler, stromal hücreler olarak da adlandırılırlar. Stromal hücreler bağ doku hücreleri olup, içlerinde buldukları dokuyu oluşturan hücresel elemanlardır. Ancak stromal hücre tanımı, bu hücrelerin farklı doku tiplerine farklılaşıp doku hasarlarını onarabilme kabiliyetleri göz önünde bulundurulduğunda yetersiz kalan bir tanımlamadır (Prockop, 1997).

MKH'lerin varlığı ilk olarak Friedenstein yaptığı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada, Friendestein bütün bir kemik iliği örneğini plastik kültür tabağına koyup, 4 saat sonrasında yapışmayan hücreleri ortamdaki uzaklaştırmıştır; bu şekilde hematopoetik kök hücreleri (HKH'leri) ve onların derivasyonlarını ortamdaki uzaklaştırmıştır. Çalışmada az sayıda, görünüş olarak heterojen olan, sıkı bir şekilde yapışmış, sayıları iki ile dört arasında değişen iğ şekilli hücre gruplarının varlığı tespit edilmiştir. Bu hücrelerin 2 ile 4 gün kadar uyku halinde kalıp (dormant), sonrasında hızlı bir şekilde çoğalmaya başladıkları gösterilmiştir. Birçok pasajlama sonrasında hücrelerin homojen iğ şekilli bir görünüm aldığı ve en önemlisi de bu hücrelerin daha sonrasında kemik ve kıkırdak matriksi benzeri kolonilere farklılaştıkları gözlenmiştir (Friedenstein ve ark. 1974). Daha sonrasında buna benzer çalışmalar birçok grup tarafından yapılmıştır (Prockop, 1997).

MKH'ler adipoz doku, amniyotik sıvı ve membran, kemik iliği, diş pulpası, endometriyum, uzuv tomurcuğu, kas dokusu, periosteum, periferik kan, plesanta, fetal membran, tükürük bezi, deri, sinovyal sıvı ve Wharton jeli gibi çok çeşitli dokulardan izole edilmiştir (Nagamura-Inoue ve He, 2014; Taran ve ark. 2014). Göbek kordonu (GK) stromasının diğer dokular ile karşılaştırıldığında, MKH kaynağı bakımından

birçok avantajı bulunmaktadır. Bu bağlamda Baksh ve ark. (Baksh ve ark. 2007) tarafından yapılan araştırmada, GK stroması ve kemik iliği (Kİ) MKH'leri karşılaştırılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre, GK stroması MKH'lerinin; kaynak çeşitliği, yüksek proliferasyon kabiliyeti, düşük bağışıklık reaksiyonu vermesi ve biyetik açıdan daha az sorun teşkil etmesi gibi önemli avantajlara sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca GK atılan bir dokudur ve Kİ'nin elde edilmesi sırasında uygulanan invaziv yöntemler kullanılmamaktadır. Bir başka çalışmada ise GK stromasının, GK kanından daha iyi MKH kaynağı olduğu gösterilmiştir (Zeddou ve ark. 2010).

İnsan göbek kordonunun (iGK'nun) yaklaşık uzunluğu 50 ile 60 cm arasında değişir ve ortalama çapı 1,5 cm civarındadır. GK, iki arter ve bir venden oluşan damar yapılarını saran embriyonik bağ dokusundan oluşur ve dıştan tek katlı kübikten çok katlı yassıya değişen bir epitel ile örtülüdür, derinin çok katlı yassı keratinize epiteli ile devamlılık gösterir. GK bağ dokusu özelleşmiş fibroblast-benzeri hücreler ve ara madde ile liflerden oluşan ekstraselüler matriks (ESM) bileşenlerinden meydana gelir. Bu özel matriks Wharton jeli olarak adlandırılır. İçerisinde kapiler ya da lenfatik kanallar bulunmaz (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Conconi ve ark. 2011; Di Naro ve ark. 2001).

Wharton jeli, GK içerisinde yer alan umblikal arterler ve ven için adventisya olarak işlev görmektedir. iGK stroması, hücrel karakteristikleri ve ESM elementlerinin gösterdiği farklılıklar dikkate alındığında üç bölümde incelenebilir. Yüzey epiteli altında yer alan subamniyonik stroma, umblikal damarlar çevresinde yer alan perivasküler stroma ve damarlar arasına yerleşmiş intervasküler stroma (Can ve Balci, 2011).

GK stromal hücreleri yapısal ve fonksiyonel olarak fibroblast hücreleriyle benzerlik gösterirler ve kolajen ve diğer matriks komponentlerini sentezlemektedirler. Bu hücrelerin tipik fibroblastlardan farklı olarak kas hücrelerine özgü spesifik hücre iskeleti elemanlarını da eksprese ettikleri gösterilmiş ve bu nedenle miyofibroblast hücreleri olarak da adlandırılmışlardır. Bu hücrelerde fibroblast gibi mezenkimden köken alan hücrelere spesifik vimentin ara filamanının ekspresyonu tespit edilmiştir. Vimentin ara filamanı düz kas hücrelerinde görülmez ve bu hücrelerde vimentin ve desmin proteinlerinin birlikte bulunmaları, bu hücrelerin miyofibroblast olarak adlandırılmalarını desteklemektedir. Bu zamana kadar kesin bir delil olmamakla birlikte, stromal hücrelerin yapılarındaki farklılıklar ve GK içindeki

lokalizasyonlarındaki ayrışmanın fark edilmesinden sonra, stromal hücrelerin arasındaki farklılıkları ve orjinlerini açıklamak için bölgesel bir yaklaşımı göz önünde bulundurmanın gerekliliği gündeme gelmiştir. SAA, PVA ve IVA'lar arasında, stromal hücrelerin yoğunlukları farklılık göstermektedir. Hücre yoğunluğu SAA'da en düşükken, PVA'da en yüksek hücre oranına ulaşır. Mikroskopik olarak morfolojik görüntülerinde de farklılıklar gösterilmiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Karahuseyinoglu ve ark. 2007; Kasper ve ark. 1988; Nanaev ve ark. 1997; Takechi ve ark. 1993).

GK'nundan MKH izolasyonuna dair birçok farklı prosedür bulunmakla birlikte, bu metotlar, enzimatik (E) ve doku eksplantı (D) yöntemleri olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir. Bunlar GK doku matriksinin sindirim enzimleri yardımıyla parçalanarak matriks içine gömülü halde bulunan stromal hücrelerin ortaya çıkarılması işlemi, diğeri ise küçültülmüş doku parçalarının hücre kültür tabağına konulması ve belirli bir süre sonrasında yapışmayan doku parçacıklarının ve hücrelerin uzaklaştırılmasına dayanan enzim kullanımı içermeyen doku eksplantı işlemidir. Bu iki yöntemin uygulama detayları çalışma gruplarına göre çeşitlilik göstermektedir. Bu bağlamda enzimatik yöntem uygulamasında kullanılan enzim çeşitleri değişmekle birlikte, tek tip sindirim enzimi kullanımından çeşitli sindirim enzim kokteyllerinin kullanımına ve kullanılan enzimlerin dozlarına kadar çeşitlilik göstermektedir. Uygulanan metotlardaki bu tür değişiklikler, elde edilen hücrelere dair birçok parametrenin değişmesini beraberinde getirmektedir. Bu parametreler arasında, elde edilen primer hücrelerin, sayısı, adezyon süreleri, yoğunluğa ulaşma süreleri, proliferasyon hızları (populasyon katlanma süreleri) gibi önemli faktörler bulunmaktadır (Can ve Balci, 2011; Han ve ark. 2013; Montanucci ve ark. 2011; Sarugaser ve ark. 2005).

İzole edilen MKH'lerinin kültür tabağına yapışması, fibroblast benzeri ya da fuziform, iğsi hücre morfolojisine sahip olması ve çeşitli MKH antijenlerin ekspresyon analizlerinin gösterilmesi önemlidir. Bu bağlamda bu zamana kadar yapılan çeşitli araştırmalarda, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerinin varlığına bakılmıştır. Diğer taraftan hematopoetik kök hücre ya da endotelyum belirteçleri olarak bakılan CD14, CD31, CD34, CD45, CD71, c-kit, CD106, CD133, HLA-DR pozitif hücrelerin varlığı GK kanı veya vasküler endotel

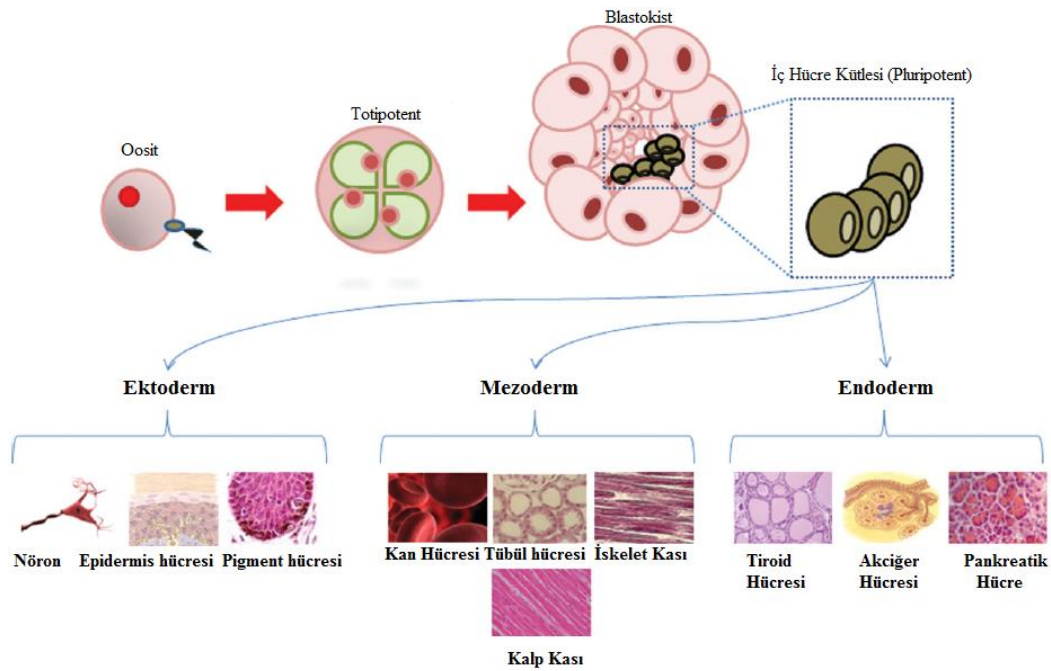
hücrelerinin ortama karıştığını göstermektedir (Burra ve ark. 2012; Ding ve ark. 2013; Han ve ark. 2013; Liang ve ark. 2012; Zhu ve ark. 2013).

Yukarıda belirtildiği üzere, MKH'ler birçok hücre hattına farklılaşabilme kabiliyetine sahiptir. Bu bağlamda MKH'lerin rejeneratif tıpta deneysel tedavi edici çalışmaları son zamanlarda büyük ilgi uyandırmıştır. Bu bağlamda en önemli MKH kaynaklarından birisi de GK'dur. Literatürde GK'ndan elde edilen hücrelerin izolasyon yöntemi ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Han ve ark. 2013; D. W. Kim ve ark. 2013). Ancak GK'ndan MKH izolasyonu ve izole edilen hücrelerin bölgesel karakterizasyonu alanındaki araştırmalar, uygulamaya yönelik çalışmalar için yeterli değildir. Bu noktada, iGK'nun farklı bölgelerinden -PVA, IVA ve SAA -farklı yöntemler ile -doku eksplantı (D) ve enzimatik (E)- izole edilen iGK-MKH'lerinin ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerle analizi, flow sitometrik yöntem ile belirlenen yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi ve proliferasyon hızlarının değerlendirilmesi ile GK'nun MKH kaynağı bakımından en uygun bölgesinin ve izolasyon yönteminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendini sınırsız yenileyebilen ve uygun koşullarda özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen hücreler olarak tanımlanırlar (Uccelli ve ark. 2008). Kök hücreler embriyonik ve yetişkin kök hücreler olmak üzere temel olarak iki ana başlık altında incelenirler (Şekil 2-1) (Salem ve Thiemermann, 2010).



Şekil 2-1: Kök hücre hiyerarşisi (Salem ve Thiemermann, 2010).

2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH) döllenmiş oositin dört blastomerli evresindeki totipotent hücrelerden ve bu hücrelerin köken verdiği, daha sonrasında embriyoyu oluşturacak olan pluripotent blastokist iç hücrelerinden oluşmaktadır. Blastokist içindeki pluripotent EKH'ler üç germ tabakasının, ektoderm, endoderm, mezoderm, köken verdiği bütün hücelere farklılaşabilme kabiliyetine sahiptirler (Salem ve Thiemermann, 2010). Ayrıca 2006 yılında Yamanaka ve Takahashi tarafından yapılan çalışmada yetişkin fibroblast hücrelerine Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 faktörlerinin

uygulanmasının ardından, kültür şartlarında indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) olarak adlandırılan EKH karakteristiklerine sahip hücreler geliştirilmiştir. iPKH'lerin EKH belirteçlerini eksprese ettiği ve EKH'lerin morfolojik özelliklerine ve büyüme kabiliyetlerine sahip olduğu gösterilmiştir. iPKH'lerin fareye transplantasyonu sonrasında üç farklı germ tabakasından da doku içeren tümör gelişimi gözlenmiştir. iPKH'lerin blastosite enjekte edilmesi sonrasında, hücrelerin farenin embriyonik gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak farklılaşmış yetişkin hücrelerinin, pluripotent EKH karakterine geri döndürülebileceği gösterilmiştir (Takahashi ve Yamanaka, 2006).

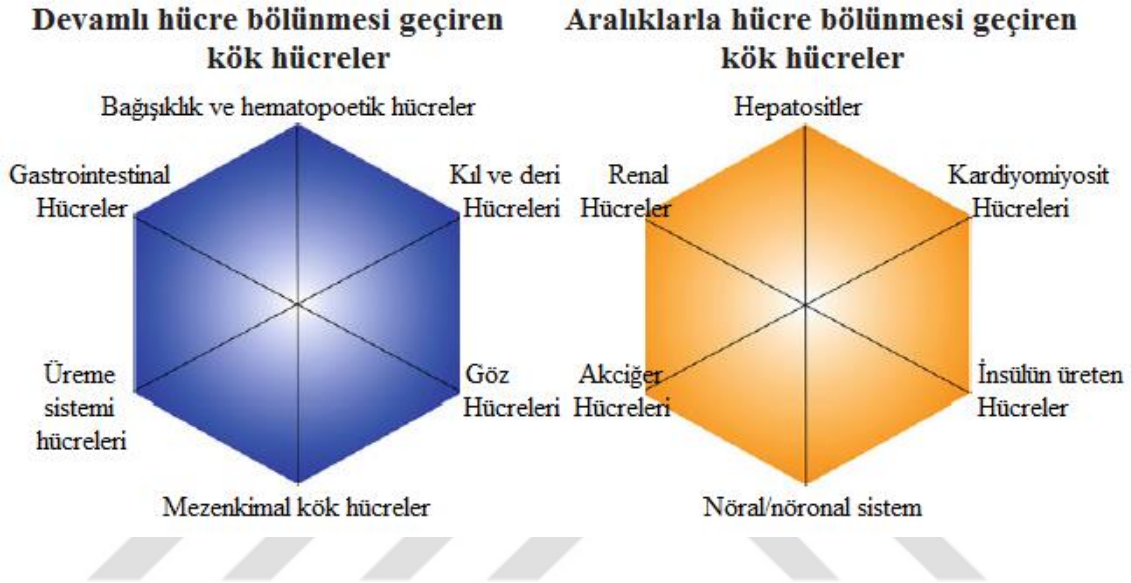
Teorik olarak EKH'ler birçok hücre hattına farklılaşabilme yetenekleri bakımından rejeneratif tıp uygulamalarında önemli potansiyele sahip gözüktükçe de, EKH'lerin kullanımına dair etik sorunlar ve klinikte uygulanmasına yönelik çalışmalarda çoğunlukla teratom oluşumuna sebep olması önemli dezavantajları olarak görülmektedir (Blum ve Benvenisty, 2008).

2.1.2. Yetişkin Kök Hücreler

Gelişimini tamamlamış yetişkine ait doku ve organlar EKH'lerden köken almış olup, multipotent yetişkin kök hücre (YKH) nişleri içermektedirler. YKH'leri doku veya organ spesifiktir. İlk olarak YKH'ler köken aldıkları germ tabakasının farklılaşabileceği bütün hücre tiplerine farklılaşabilen hücreler olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonrasında bu hücrelerin diğer germ tabakalarından hücrelere de farklılaşabildiklerinin gösterilmesi ve iPKH'lerin geliştirilmesi bu hücrelerin sınıflandırılmasını karmaşıktır (Salem ve Thiemermann, 2010). YKH devamlı hücre bölünmesi geçiren; hematopoetik sistem, gastrointestinal sistem, üreme sistemi, deri ve gözdeki belirli hücreleri ve MKH'leri içine alan YKH'ler ve aralıklarla hücre bölünmesi geçiren karaciğer, böbrek, nöral sistem gibi hücre sistemlerindeki YKH'ler olmak üzere iki bölümde incelenir (Şekil 2-2) (Rich, 2015).

EKH'lerin klinik öncesi çalışmalarda kullanımındaki etik problemler ve teratomlara sebep olan agresiflikteki kendini yenileyebilme potansiyelleri, bu tür çalışmaları alternatif kaynaklara yöneltmiştir (Blum ve Benvenisty, 2008). Bu bağlamda YKH'ler önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Üzerinde en çok çalışma yapılan kemik iliği kök hücreleri önemli bir kaynak olarak görülmüştür. Yetişkin kemik iliği, HKH'leri, makrofajları, eritrositleri, fibroblastları, adipositleri ve endotelial

hücreleri içeren oldukça heterojen bir hücre popülasyonudur (Salem ve Thiemermann, 2010). Bununla birlikte ilk olarak Friedenstein ve ark tarafından, yetişkin kemik iliğinde, hematopoetik kökenli olmayan ve multipotent potansiyele sahip hücrelerin varlığı keşfedilmiştir (Friedenstein ve ark. 1968). Daha sonrasında bu hücreler, Caplan tarafından mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) olarak adlandırılmıştır (Caplan, 1991).



Şekil 2-2: Yetişkin kök hücreler (Uccelli ve ark. 2008).

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Tarihsel olarak MKH'lerin kemik iliğindeki (Kİ'ndeki) varlığı ilk olarak 1867'de Cohnheim tarafından ortaya konulmuştur. Yapmış olduğu çalışmada, çözünür olmayan anilin boyasını tavşana intravenöz olarak enjekte etmesi sonrasında, tavşanın arka ayağında oluşturulmuş yarada boyanmış bazı hücreler gözlemlemiştir. Bu durumu Kİ'nden köken alan fibroblastik hücrelerin dolaşım sistemi aracılığı ile yara bölgesine göç etmesi olarak açıklamıştır (Baghaban Eslaminejad ve Malakooty Poor, 2014). 1951 yılında Lorenz ve ark. tarafından yapılan çalışmada ölümcül seviyede radyasyona maruz kalan farelere dalak ya da Kİ hücreleri verildiğinde, radyasyonun zararlı etkilerinden korundukları gösterilmiştir (Kode ve ark. 2009; Thomas ve Blume, 1999). Ayrıca bir dizi Kİ transplantasyonu çalışmasında, in vivo koşullarda kırıkta ve kemik benzeri dokuların gelişimi gözlenmiştir (Baghaban Eslaminejad ve Malakooty Poor, 2014).

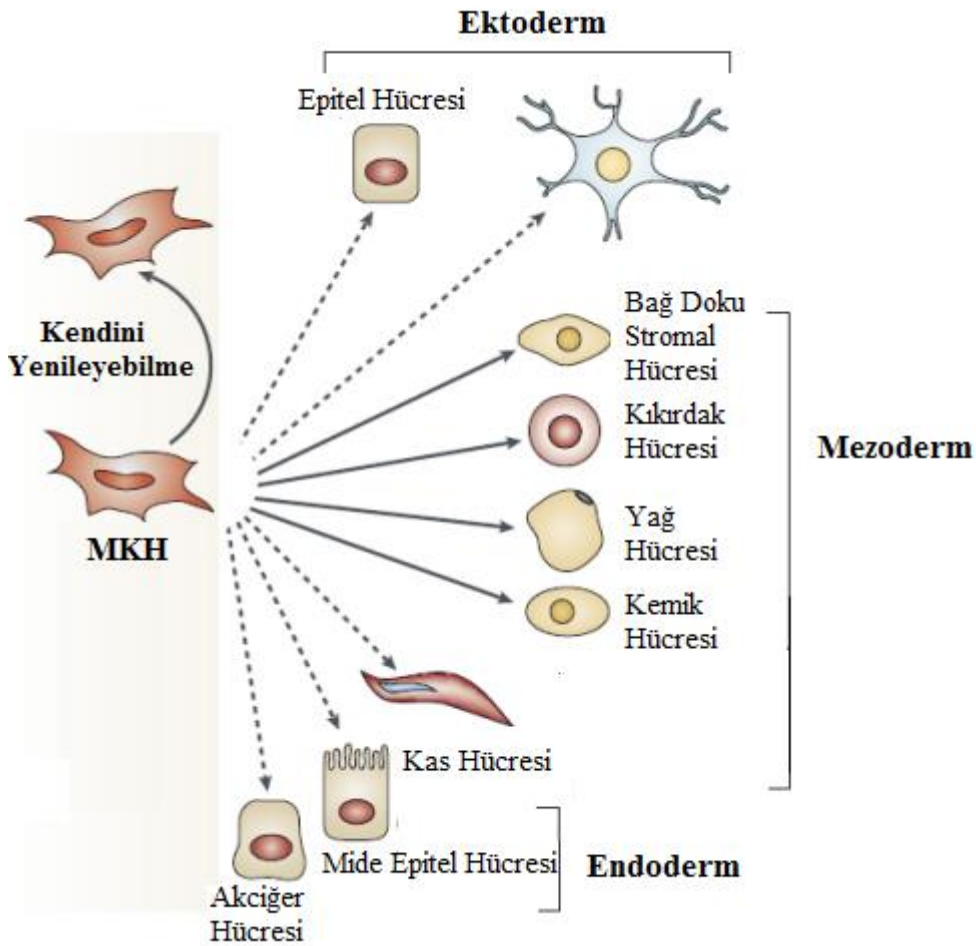
Yukarıda belirtilen çalışmalarda gözlemlenen gelişmelerden sorumlu hücrelerin varlığı ilk olarak Friedenstein ve ark. tarafından tanımlanmış ve *multipotent stromal öncül hücreler* olarak adlandırılmıştır. Bu çalışmada, Friendestein bütün bir Kİ örneğini plastik kültür tabağına koyup, 4 saat sonrasında yapışmayan hücreleri ortamdan uzaklaştırmıştır; bu şekilde aslında HKH'leri ve onların derivasyonlarını ortamdan uzaklaştırmıştır. Çalışmada az sayıdaki yapışmış hücrenin, görünüş olarak heterojen olduğu ancak sıkı bir şekilde yapışmış ve sayıları iki ile dört arasında değişen iğ şeklinde hücre grupları oluşturdukları bildirilmiştir. Daha sonrasında bu hücrelerin 2 ile 4 gün kadar uyku halinde kalıp (dormant) daha sonrasında hızlı bir şekilde çoğalmaya başladıkları gösterilmiştir. Birçok pasajlama sonrasında hücrelerin homojen iğ şekilli görünüm aldıkları ve en önemlisi de bu hücrelerin daha sonrasında kemik ve kıkırdak matriksi benzeri kolonilere farklılaştıkları gözlenmiştir (Friedenstein ve ark. 1974; Friedenstein ve ark. 1968). Daha sonra yapılan çalışmalar, Kİ'nden elde edilen stromal hücrelerin mezenkimal dokuların öncülü olduğu gösterilmiştir (Deans ve Moseley, 2000; Prockop, 1997).

Mezenkim, mezoderm tabakasından köken alan embriyonik bağ doku olup, hematopoetik hücrelere ve bağ dokuya köken vermektedir. Bu noktada, MKH'ler ilk olarak stromal hücreler olarak da adlandırılmışlardır. Stromal hücreler bağ doku hücreleri olup, içlerinde buldukları dokuyu oluşturan hücresel elemanlardır. Ancak stromal hücre tanımı, bu hücrelerin farklı doku tiplerine farklılaşp doku hasarlarını onarabilme kabiliyetleri göz önünde bulundurulduğunda yetersiz kalan bir tanımlamadır (Prockop, 1997). Bu noktada, Caplan, kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme özelliklerine sahip kemik iliğinden elde edilen bu stromal hücreleri ilk olarak kök hücre olarak sınıflandırarak, *mezenkimal kök hücre* olarak adlandırmıştır (Caplan, 1991).

MKH'ler pluripotent karakterde olup, birçok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. İn vitro ve in vivo çalışmalarda bu hücrelerin farklılaşabildiği hücre tipleri arasında; osteoblastlar, kondroblastlar, adipositler, miyositler ve hepatosit hücreleri gösterilmiştir (Deans ve Moseley, 2000; Pittenger ve ark. 1999; Prockop, 1997; Wu ve Tao, 2012). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda, MKH'lerin nöron benzeri hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Low ve ark. 2008). Bir diğer deyişle, MKH'ler trans-farklılaşma olarak da tanımlanan diğer germ tabakasından

köken alan hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptir (Şekil 2-3) (Uccelli ve ark. 2008).

MKH'lerin zayıf bağışıklık reaksiyonu oluşturma özellikleri klinikte allojenik transplantasyonu mümkün kılan önemli karakteristiklerinden birisidir (Uccelli ve ark. 2008). Ayrıca hücre terapilerinde, enjekte edilen hücrelerin hedef organa ulaşması terapötik etkinin gözlenmesi açısından önemlidir. Bu bağlamda MKH'lerin sistemik bir şekilde uygulanması sonrasında öncelikli olarak hasarlı doku ya da organ alanına lokalize olması, bu hücrelerin fonksiyonel ve yapısal iyileşmeyi destekleme potansiyellerini ortaya koymaktadır (Salem ve Thiernemann, 2010).



Şekil 2-3: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri (Uccelli ve ark. 2008).

2.2.1. MKH'lerin Karakterizasyonu

İzole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücresi Komitesi (*The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*) tarafından belirlenen minimal kriterlerin karşılanması gerekmektedir. Bu kriterler: birinci olarak; MKH'ler standart kültür ortamında, plastik-adherent olmalıdır, ikinci olarak; MKH'ler CD105 [Başkalaşım Kümesi Molekülleri-105 (Cluster of differentiation-105)], CD90, CD73'ü eksprese ederken, HKH ya da endotelyum belirteçleri olan CD45, CD34, CD14, veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR yüzey moleküllerini eksprese etmemeleri gerekmektedir, üçüncü ve son olarak; MKH'lerin in-vitro koşullarda osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşabilmeleri gerekmektedir (Dominici ve ark. 2006).

2.2.2. MKH'lerin Bağışıklık Reaksiyonu Düzenleyici Etkisi

MKH'ler immün-düzenleyici özelliğe sahiptirler; bu özellikleri ilk olarak Di Nicola ve ark. tarafından Kİ'nden izole edilen MKH'lerin in vitro koşullarda hücresel veya spesifik olmayan mitojenik uyarıcı ile indüklenmiş T-lenfosit proliferasyonunu baskıladığının gösterilmesiyle ortaya çıkmıştır (Di Nicola ve ark. 2002).

2.2.2.1. Kalıtsal Bağışıklık Sistemi

Kalıtsal bağışıklık sisteminin en önemli elemanlarından birisi olan dendritik hücrelerin (DH'lerin) temel görevi, pro-inflamatuvar sitokinler ve/veya patojen ilişkili moleküller ile uyarıldıktan sonra daha önce antijenle karşılaşmamış (naive) T-hücrelerine antijen sunmaktır. Bu bağlamda yapılan araştırmalarda; in-vitro koşullarda MKH'lerin monositlerin ve CD34 pozitif hematopoetik progenitör hücrelerin DH'lere olgunlaşmasını engellediği gösterilmiştir (Jiang ve ark. 2005; Nauta ve ark. 2006). Ayrıca, olgunlaşmış DH'lerin MKH'ler ile inkübasyonu sonrasında, temel doku uyum kompleksi [major histokompatibilite kompleks (MHK)] sınıf II ekspresyonunda, CD11c, CD83, yardımcı uyarıcı moleküllerin ve interlökin-12 (IL-12) üretiminde azalma görülmüştür; bu durum DH'lerin antijen-sunma fonksiyonlarının hasar gördüğünü göstermektedir (Uccelli ve ark. 2008).

Doğal öldürücü [Natural killer (NK)] hücreleri kalıtsal bağışıklık sisteminin önemli efektör hücreleridir ve anti-viral ve anti-tümöral bağışıklık reaksiyonlarda,

sitolitik aktiviteleri ve pro-inflamatuvar sitokinleri üretmeleri ile anahtar role sahiptirler (Moretta, 2002). Bu bağlamda MKH'lerin, dinlenme (resting) halindeki NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini, bu hücrelerin aktivasyonunda ve hedef-hücrenin öldürülmesinde rol alan NKp30 ve NK grup 2D (NKG2D) reseptörlerin ekspresyonlarını düşürerek azalttıkları gösterilmiştir. Ancak diğer taraftan, sitokin ile aktive edilmiş NK hücrelerinin MKH'lerini öldürdüğü gösterilmiştir (Spaggiari ve ark. 2006).

Kalıtsal bağışıklık sisteminin bir diğer önemli elemanı nötrofillerdir. Bakteriyel enfeksiyon sonrasında hızla mobilize olup aktifleşerek mikroorganizmaların öldürülmesinde görev alırlar. MKH'lerin diğer kalıtsal bağışıklık sistemi elemanları üzerindeki etkisinin tersine, dinlenme halindeki ya da aktifleşmiş nötrofillerin ömrünü, doğal olarak gelişen apoptozu geçiktirerek IL-6 bağımlı mekanizma ile uzattığı gösterilmiştir (Raffaghello ve ark. 2008).

2.2.2.2. Adaptif Bağışıklık Sistemi

T-hücreleri adaptif bağışıklık sisteminin en önemli elemanlarından birisidir. Bu tip lenfosit hücrelerinin, sitokin salınımı (yardımcı T hücreleri) ve enfekte hücrelerin yok edilmesi ($CD8^+$ T hücrelerin sitotoksik aktivitesi) gibi önemli görevleri bulunmaktadır. Poliklonal mitojen, allojenik hücreler ya da spesifik antijenler ile uyarılmış T hücre proliferasyonunun MKH'ler tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Baghaban Eslaminejad ve Malakooty Poor, 2014; Di Nicola ve ark. 2002). MKH'lerin T-hücre proliferasyonunu engellemesi, yardımcı T2-hücreleri tarafından interferon gama (INFg) salınımında azalmaya ve IL-4 üretiminde artışa yol açmıştır; bu durum T-hücrelerinin pro-inflamatuvar evreden anti-inflamatuvara geçtiğini göstermektedir (Uccelli ve ark. 2008). Düzenleyici (regülatör) T hücreleri bağışıklık sisteminin aktivasyonunu baskılayan, bu şekilde vücut homeostazının korunmasını ve kendi antijenlerine karşı toleransın oluşmasını sağlayan özelleşmiş hücrelerdir. MKH'lerin düzenleyici $CD4^+/CD25^+$ T hücrelerinin proliferasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (Maccario ve ark. 2005). Sonuç olarak; MKH'ler bağışıklık reaksiyonun şiddetini antijen-spesifik T-hücre proliferasyonunu ve sitotoksitesini engelleyerek ve düzenleyici T hücrelerinin üretimini artırarak kontrol etmektedir.

Adaptif bağışıklık sisteminde rol alan diğer hücreler antikor üretimi için özelleşmiş B hücreleridir. Yapılan araştırmalarda; deneysel şartlardaki farklılıklara

bağlı olarak MKH'ler ile B hücreleri arasındaki etkileşime dair farklı sonuçlar elde edilmiştir. Birçok araştırmada MKH'lerin in vitro koşullarda B hücre proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca MKH'lerin B hücre farklılaşmasını ve kemokin reseptör ekspresyonunu engellediği gösterilmiştir. Ancak in-vitro koşullarda yapılan bir başka araştırmada ise, MKH'lerinin B hücrelerinin yaşamasını, proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir. Elde edilen bu farklı sonuçlara rağmen, B hücrelerinin T hücre bağımlı reaksiyon gösterdikleri düşünüldüğünde; in vivo koşullarda, MKH aracılı T hücre fonksiyonun engellenmesi durumu daha da önem kazanmaktadır (Uccelli ve ark. 2008).

MKH'lerin tüm bağışıklık baskılayıcı aktivitelerine rağmen, bazı durumlarda MKH'lerin antijen sunucu hücre görevi de gördüğü gösterilmiştir. Örneğin; düşük INFg konsantrasyonu MKH'lerin MHK sınıf II ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bir başka deyişle, düşük INFg konsantrasyonunun olduğu bağışıklık reaksiyonun erken döneminde, MKH'ler antijen sunucu hücre olarak hareket etmektedir (Uccelli ve ark. 2008).

2.2.3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

MKH'ler kemik iliği, adiipoz dokusu, amniyotik sıvı ve amniyotik membran, diş pulpası, endometriyum, uzuv tomurcuğu, kas ve periosteum, periferik kan, plasenta ve fetal membran, tükürük bezi, deri, sinovyal sıvı ve Wharton jeli gibi çok çeşitli dokulardan izole edilmiştir (Nagamura-Inoue ve He, 2014; Taran ve ark. 2014).

2.2.3.1. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri

MKH'ler yaklaşık 50 yıl öncesinde ilk olarak Friedenstein tarafından Kİ'nden izole edilmiştir (Friedenstein ve ark. 1968). Bu süreçte karakterizasyonu ve klinik potansiyellerinin değerlendirilmesi anlamında birçok çalışma yapılmıştır. Bu sebeple bu hücrelere ait veriler "altın standart" olarak değerlendirilmektedir (Salem ve Thiemermann, 2010; Uccelli ve ark. 2008). Diğer kaynaklardan izole edilmiş MKH'lerin karakterizasyonu ve klinik çalışmalarından elde edilen sonuçlar Kİ-MKH'lerinden elde edilenler ile karşılaştırılmaktadır (Baksh ve ark. 2007).

2.2.3.2. Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücreleri ve Avantajları

GK stroması diğer dokular ile karşılaştırıldığında, MKH kaynağı olarak birçok avantaja sahiptir. Baksh ve ark. tarafından yapılan araştırmada, GK stroması ve Kİ-

MKH'leri karşılaştırılmıştır; elde edilen sonuçlara göre, GK-MKH'leri kaynak çeşitliği, yüksek proliferasyon ve farklılaşma kabiliyeti bakımından Kİ-MKH'lerinden daha avantajlıdır (Baksh ve ark. 2007; Venugopal ve ark. 2011).

GK-MKH'lerinin Kİ-MKH'lerinden daha iyi bağışıklık reaksiyonu düzenleyici özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. GK-MKH'lerinin Kİ-MKH'lerinden daha fazla miktarda tolerojenik IL-10, TGF-B ve insan lökosit antijeni-G (HLA-G) eksprese ettiği gösterilmiştir. HLA-G düzenleyici T-hücrelerinin yayılmasını indüklemektedir; düzenleyici T-hücrelerinin, T-effektör hücrelerinin baskılanmasında rol aldığı düşünüldüğünde, artmış HLA-G ekspresyonu bağışıklık baskılanması sürecinde önemli role sahiptir. (Tamura ve ark. 2011).

Bir başka çalışmada ise GK stromasının GK kanından daha iyi MKH kaynağı olduğu gösterilmiştir (Zeddou ve ark. 2010). Gen ekspresyon profilleri bakımından da, GK-MKH'leri EKH profiline Kİ-MKH'lerinden daha çok benzerlik göstermektedir (Nagamura-Inoue ve He, 2014).

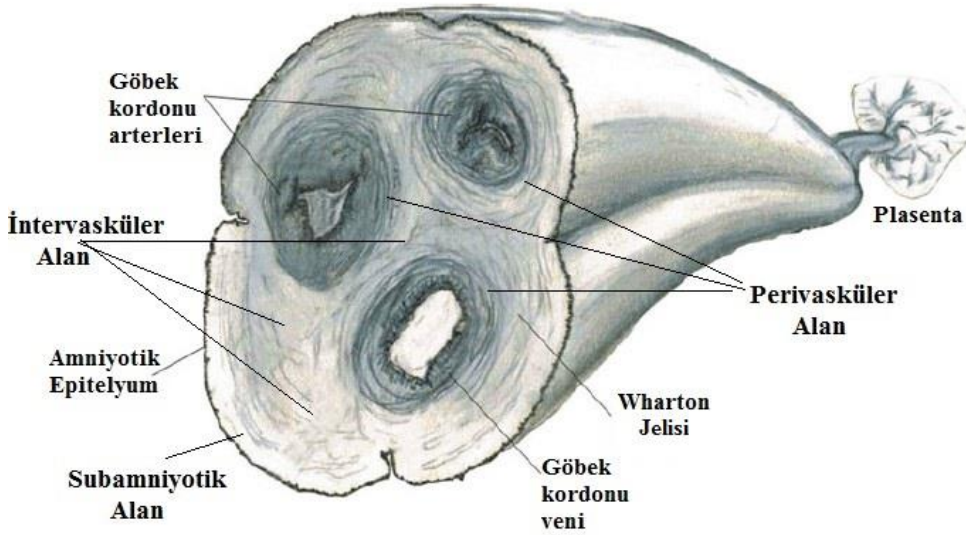
Son olarak, GK atılan bir dokudur ve Kİ'nde olduğu gibi izolasyon için invaziv yöntem gerektirmemektedir. Bio-etik açıdan daha az sorun teşkil etmesiye diğer bir önemli avantajdır.

2.3. İnsan Göbek Kordonu

İnsan göbek kordonu (iGK) gebeliğin 26. gününde ekstraembriyonik mezoderm ve embriyonik mezodermden köken alır. iGK yaklaşık 40 gr kadar ağırlıkta olup, ortalama 1,5 cm çapında ve uzunluğu 30 ile 65 cm arasında değişen bir dokudur. iGK gebelik süresince; anne ile fetus arasında vasküler bir bağ görevi görür; kan damarlarının korunmasını ve böylelikle fetus için gerekli besinlerin kan ile taşınmasını ve aynı şekilde biyolojik atıkların uzaklaştırılmasını sağlar. iGK erken gebelikte tek katlı kübik ya da yassı, geç gebelikteyse çok katlı yassı ya da kübik epitelyum tabakası ile çevrilmiştir. iGK iki umbilikal arter, bir umbilikal ven ve bunları çevreleyen bağ dokudan oluşur (Conconi ve ark. 2011). Bu bağ dokusu özelleşmiş fibroblast-benzeri hücreler ve ara madde ile liflerden oluşan ESM bileşenlerinden meydana gelir. Bu özel matriks Wharton jeli olarak da adlandırılır. İçerisinde kapiller ya da lenfatik kanallar bulunmaz (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Di Naro ve ark. 2001).

Wharton jeli, GK içerisinde yer alan umbilikal ven ve arterler için adventisya olarak işlev görmektedir. İGK stroması, hücresel karakteristikleri ve ESM

elementlerinin gösterdiği farklılıklar dikkate alındığında üç bölümde incelenebilir (Şekil 2-4). Yüzey epiteli altında yer alan subamniyonik stroma, umbilikal damarlar çevresinde yer alan perivasküler stroma ve damarlar arasına yerleşmiş intervasküler stroma (Can ve Balci, 2011).



Şekil 2-4: Göbek kordonunun şematik gösterimi (Nazari-Shafti ve ark. 2015).

2.3.1. Göbek Kordonu Stromal Hücreleri

2.3.1.1. Miyofibroblastik Hücreler

GK stromal hücreleri yapısal ve fonksiyonel olarak fibroblast hücreleriyle benzerlik gösterdiği ve kordondaki gerilmeye yapısal olarak duyarlı olduğu için ilk olarak *sıradışı fibroblastlar* olarak adlandırılmışlardır (Parry, 1970). Bu hücrelerde, düz kas hücrelerinde eksprese edilmeyen, fibroblast gibi mezenkimden köken alan hücrelere spesifik vimentin ara filamanının ekspresyonu tespit edilmiştir (Kreis ve Vale, 1999). Diğer taraftan ise, kas hücrelerine özgü spesifik desmin ara filament proteininin de bu stromal hücrelerde ekspresyonu, bu hücrelerin ne fibroblast ne de düz kas hücresi olarak adlandırılabilceğini göstermiş olup; ilk olarak Majino ve ark. tarafından *miyofibroblast* hücreleri olarak sınıflandırılmışlardır (Majno ve ark. 1971). Bu hücreler, düz kas hücrelerinde tipik olarak bulunan subplazmalemmal ve intrasitoplazmik fokal yoğun plakları içermektedirler. 10 nm kalınlığında intrasitoplazmik filamentlerin varlığı ve

genellikle uzun hücresel uzantıların ara yüzünde görülen hücreler arası iletişimde rol oynayan ara bağlantı proteinlerinin (gap junctions) varlığı, bu hücrelerin bir çeşit kasılma özelliğine sahip *sıradışı fibroblast* hücreleri olarak sınıflandırılmasında yardımcı olmuştur (Parry, 1970). Hücre yüzeyleri kısmi olarak eksternal lamina ile örtülmüştür. Eksternal lamina çoğunlukla, kolajen tip IV, laminin ve heparan sülfatlanmış proteoglikanlarından oluşmaktadır (Can ve Karahuseyinoglu, 2007).

GK stromal hücreleri kasılma kabiliyetlerinin yanı sıra; kolajen ve diğer matriks komponentlerini de sentezlemekten sorumludur. İyi gelişmiş endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi, genişlemiş sisternalar ve çok sayıda mitokondriyon aktif protein sentezi ve salgılanma aktivitesini göstermektedir (Parry, 1970). Orta seviyede intrasitoplazmik glikojen, lipit damlacıkları ve pro-kolajen sekresyon granülleri içermekle birlikte, kolajen sentezinde rol alan prolil-4-hidroksilaz enziminin varlığının gösterilmesi, göbek kordonu stromal hücrelerinin birincil olarak kolajen ve diğer matriks komponentlerinin sentezlenmesinden sorumlu olduğunu göstermiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007).

Sitokeratin ara filamanı genellikle endoderm ve ektoderm kökenli epitelyum hücrelerinde eksprese edilen hücre iskeleti elemanıdır (Kreis ve Vale, 1999). Nanaev ve ark. yaptığı çalışmada GK stromal hücrelerinde sitokeratin ekspresyonunda önemli bir değişiklik tespit etmemişlerdir (Nanaev ve ark. 1997). Ancak Karahuseyinoglu ve ark. perivasküler alandaki stromal hücrelerin, sitokeratin filamanları için güçlü bir şekilde pozitif sonuç verdiklerini göstermiştir (Karahuseyinoglu ve ark. 2007).

Spesifik olarak kasılabilen proteinlerin örneğin aktin, kas proteini olmayan miyozin, desmin ve α -düz kas aktin proteinleri miyofibroblastlar için belirteçtir ve stromal hücrelerde farklı oranlarda eksprese edilmişlerdir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007).

2.3.1.2. Bölgesel Dağılımı

Bu zamana kadar kesin bir delil olmamakla birlikte, stromal hücrelerin yapılarındaki çeşitliliğin ve GK içindeki lokalizasyonlarındaki ayrışmanın fark edilmesiyle, stromal hücrelerin arasındaki farklılıkları ve orjinlerini açıklamak için bölgesel bir yaklaşımı göz önünde bulundurmanın gerekliliği gündeme gelmiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Conconi ve ark. 2011; Karahuseyinoglu ve ark. 2007; Mennan ve ark. 2013). SAA, PVA ve IVA'lar arasında stromal hücrelerin

yoğunluklarının, farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Hücre yoğunluğu SAA'da en düşükken, PVA'da en yüksek hücre oranına ulaşmaktadır. Mikroskopik olarak morfolojik görüntülerinde de farklılıklar gösterilmiştir (Karahuseyinoglu ve ark. 2007; Nanaev ve ark. 1997; Schugar ve ark. 2009; Takechi ve ark. 1993). İntervasküler hücreler, perivasküler hücrelerden daha uzun ve fazla miktarda sitoplazmik uzantıya sahiptirler (Takechi ve ark. 1993). Yüzeiden damarların bulunduğu noktaya doğru, stromal hücrelerin iskelet yapılarındaki karmaşıklıkta bölgesel farklılaşmalar ile birlikte belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Kobayashi ve ark. 1998; Nanaev ve ark. 1997). Bu farklılaşma durumuna paralel olarak, yüzeiden damarlara doğru stromal hücrelerin proliferasyon kabiliyetlerinde belirgin bir düşüş tespit edilmiştir (Nanaev ve ark. 1997). Sonuç olarak, olgunlaşmamış, çoğalma kabiliyetini kaybetmemiş hücrelerin amniyotik yüzeye yakın, yüksek oranda farklılaşmış stromal hücrelerin ise GK damarlarına yakın yer aldıkları bildirilmiştir.

2.3.2. Göbek Kordonunun Ekstraselüler Matrisi

Anne ile fetus arasında bağlantı sağlayarak iki yönlü kan akışını sağlayan GK'nun mekanik özelliği son derece önemlidir. GK-ESM'nin bağ doku lifleri ve ilişkili çözünebilir proteinlerden oluşan özel yapısı, kordon damarlarını eğilmekten ve bükülmeden korur (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Parry, 1970). Hücreler arasında bulunan en yaygın fibril komponenti kolajen fibrillerdir. Elastik fibriller bulunmamaktadır. İlk olarak, çoğunlukla GK epitelinin bazalinde bulunan tip VII kolajen liflerinin varlığı immunohistokimya ve polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Nanaev ve ark. tarafından yapılan çalışmada; tip I, III ve VI kolajenleri SAA'da, IVA'da ve damar duvarlarında, tip IV kolajenin ise GK epitelinin bazal membranında ve SAA stromal hücrelerinin eksternal laminasında, tip VII kolajenin ise sadece GK epitelinin bazal membranında bulunduğu gösterilmiştir (Nanaev ve ark. 1997). Sobolewski ve ark tarafından yapılan bir başka araştırmada ise kolajenlerin niceliksel miktarları değerlendirilmiştir; kolajenler, kuru GK ağırlığının yarısını teşkil etmektedir. Tip I ve III kolajenleri IVA'da ve arter duvarlarında en çok bulunan kolajen tipidir. Ayrıca stromada bulunan kolajen miktarının arter duvarında bulunan miktarının en az 4 katı olduğu gösterilmiştir ve tip I kolajenin, tip III kolajene oranının, arterde stromadakinin iki katı olduğu bildirilmiştir (Sobolewski ve ark. 1997). Bu bağlamda IVA'nın, kolajen çözücülere karşı gösterdiği

direnç yüksek orandaki tip III kolajen oranı ile ilişkilendirilmiştir. Kolajenlerin kimyasal ve organik çözücülere karşı olan direnci bu moleküllerin glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar ile güçlü iyonik bağlar kurması ile de ilişkilendirilmiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Sobolewski ve ark. 1997).

Wharton jelinin diğer önemli komponenti ise çoğunlukla glikozaminoglikandan (GAG'dan) oluşan temel maddedir. Wharton jelinde bulunan GAG miktarı arterlerdeki miktarın 2 katı kadardır. GAG'ların %70'lik kısmını hiyalüronik asit (HA) molekülleri oluşturmaktadır, sülfatlanmış GAG'ların miktarı ise (keratin, heparan, dermatan, kondroidin-4 ve kondroitin-5 sülfat) ise oldukça düşüktür ve heparin çok az miktarda bulunmaktadır (Sobolewski ve ark. 1997). GK'nun ESM'inde bulundurduğu HA miktarı oldukça fazladır. Ancak anormal miktarlardaki HA ise çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Örneğin; Down sendromlularda HA miktarının normalin çok üzerinde olduğu gösterilmiştir (Raio ve ark. 2005).

2.4. Göbek Kordonundan Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

İlk olarak 1991 yılında, GK'nundan fibroblast benzeri hücrelerin izolasyonu McElreavey tarafından gerçekleştirilmiştir (Nagamura-Inoue ve He, 2014). GK'nundan MKH izolasyonuna dair birçok farklı prosedür bulunmakla birlikte, bu metotlar, enzimatik ve doku eksplantı yöntemleri olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir (Han ve ark. 2013; Salehinejad ve ark. 2012).

2.4.1. Doku Eksplantı Yöntemi

Doku eksplantı yöntemi, ilk olarak Kİ'nden MKH'lerin izolasyonu sırasında Friedenstein tarafından da kullanılan yöntem olup, küçültülmüş doku parçalarının hücre kültür tabağına konulması ve belirli bir süre sonrasında yapışmayan doku parçacıklarının ve hücrelerin uzaklaştırılmasına dayanan, enzim kullanımı içermeyen izolasyon metodudur (Friedenstein ve ark. 1968; Han ve ark. 2013; Hendijani ve ark. 2014). Bu noktada MKH'lerin standart kültür ortamında, plastik-adherent olmaları özelliklerinden faydalanılmaktadır (Dominici ve ark. 2006). Doku eksplantı yönteminde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, kültür tabağına yerleştirilen, küçültülmüş doku parçalarının eklenen medyum ile plastik taban ile temasını kaybetmemesinin sağlanmasıdır. Aksi takdirde yüzer haldeki doku parçalarından hücre migrasyonu ve izolasyonu mümkün değildir (Nagamura-Inoue ve He, 2014).

2.4.2. Enzimatik Yöntem

Enzimatik yöntem GK dokusu matriksinin sindirim enzimleri yardımıyla parçalanarak matriks içine gömülü halde bulunan stromal hücrelerin ortaya çıkarılması işlemidir. Enzimatik yöntemin uygulama detayları çalışma gruplarına göre çeşitlilik göstermektedir. Bu bağlamda enzimatik yöntem uygulamasında kullanılan enzim çeşitleri değişmekle birlikte, tek tip sindirim enzimi kullanımından çeşitli sindirim enzim kokteyllerinin kullanımına ve kullanılan enzimlerin dozlarına kadar çeşitlilik göstermektedir. Uygulanan metotlardaki bu tür değişiklikler, elde edilen hücrelere dair birçok parametrenin de değişmesini beraberinde getirmektedir. Bu parametreler arasında, elde edilen primer hücrelerin, sayısı, adezyon süreleri, yoğunluğa ulaşma süreleri, proliferasyon süreleri (populasyon katlanma süresi) gibi önemli faktörler bulunmaktadır (Can ve Balci, 2011; Han ve ark. 2013; Montanucci ve ark. 2011; Nazari-Shafti ve ark. 2015; Sarugaser ve ark. 2005; H. Zhang ve ark. 2012).

2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları

2.5.1. Kanser Terapisi

Son yıllarda, kanser, insan ölümlerinin en önemli sebeplerinden birisi haline gelmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler (cerrahi operasyon, kemoterapi, radyoterapi) genel olarak semptomatik olup kesin çözüm üretmemektedir. Uygulanan tedavilerin en önemli sorunu tümör spesifik olmamasıdır. Bu bağlamda tümör dokusuna spesifik etkili tedavi stratejilerin geliştirilmesi önemlidir (Sun ve ark. 2011). MKH'ler primer ve metastatik kanser dahil birçok hastalığın tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir (Karnoub ve ark. 2007). MKH'lerin doku formasyonuna katkısı, kronik inflamasyon veya yaralanma sonrasındaki doku yenilenmesi sürecinde belirgin olarak gözlemlenmiştir. Bu süreç içerisinde, yaralanmış ya da enfekte olmuş dokudan spesifik uyarıların salınması ve Kİ'ne taşınması sonrasında, multi-potent MKH'lerin hasarlanmış alana mobilizasyonu gerçekleşmektedir (Fox ve ark. 2007). Örneğin, oluşan yaralanma sonrasında, MKH'lerin fibröz skar oluşumuna katkı sağladığı gösterilmiştir (Karnoub ve ark. 2007). Kanser gelişimine, çoğunlukla pro- ve anti-tümörojenik etkiye sahip çeşitli stromal hücrelerin katılmasını içine alan iyi organize olmuş desmoplastik reaksiyon eşlik eder ve bu durum, yara iyileşmesi ve skar oluşması sırasında verilen reaksiyona benzemektedir (Bissell ve Radisky, 2001). Devamlı olarak büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve matriks şekilendirici proteinlerin salgılanması,

tümör alanını “iyileşmeyen yara” kılar ve MKH’lerin de dahil olduğu hücrelerin tümör alanına göçünü indükler. Birçok çalışmada, MKH’lerin in-vitro ve in-vivo şartlarda ksenograft tümör alanına yüksek oranda göç ettiği gösterilmiştir. MKH’lerin tümör mikroçevresine tropizmi açık bir şekilde görülmektedir. Ancak bu durumun altında yatan moleküler mekanizma tam olarak açıklanamamıştır (Karnoub ve ark. 2007; Sun ve ark. 2011). Kök hücrelerin bu lokalize olma kabiliyetinin, sitokinler/büyüme faktörleri ve reseptörleri arasındaki etkileşim ile sağlandığı düşünülmektedir (Muller ve ark. 2001).

Tümör hücreleri ve ilgili oldukları stroma tarafından çok sayıda sitokin ve büyüme faktörleri salgılanmaktadır. MKH’ler bu salgı üretim alanlarına, membran yüzeylerinde eksprese ettikleri çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerine ait reseptörlerin oluşturduğu tropizm ile göç ederler. Örneğin, Kİ-MKH’lerinin stromal hücre-kökenli faktör-1(SDF-1) için kemokin reseptör-4 (CXCR4), ve fraktalin için CXCR3 eksprese ettiği gösterilmiştir. Ayrıca tümör hücreleri SDF-1, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi moleküller salgılayarak çevre dokulardan ve Kİ’nden hücreleri çekmektedir (Tamura ve ark. 2011). Sonuç olarak MKH’lerin spesifik olarak tümör alanlarına lokalize olabilmesi, bu hücrelerin kanser tedavisinde önemli bir potansiyel olarak görülmesini sağlamıştır.

Khakoo ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada, Kaposi sarkomu modelinde intravenöz enjekte edilen Kİ-MKH’lerinin tümörlü alana lokalize olduğu ve tümör gelişimini engellediği gösterilmiştir. Ancak bu etki sadece direkt kontakt olduğu durumda gözlenmiştir (Khakoo ve ark. 2006). Ganta ve ark. ile Ayuzawa ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda ise insan ve sıçan GK-MKH’lerin in vitro ve in vivo ortamda birçok kanser hücre hatlarındaki büyümeyi önemli oranlarda yavaşlattığı gösterilmiştir (Ayuzawa ve ark. 2009; Ganta ve ark. 2009).

MKH’lerin tümör gelişimini yavaşlatma mekanizması tam olarak açıklanamasa da, iki potansiyel mekanizma önerilmektedir. Bunlardan birincisi; kanser hücrelerini ölüme götüren ya da bölünmeleri durduran çok sayıda sekretuar proteinin üretimidir. Bu üretilen moleküller, tümör hücrelerinde kaspaz aktivitesini indüklemekte ve hücre bölünmesini durdurmaktadır. Bu durum, MKH’lerin kanser hücreleri ile direkt temasta bulunmadan da etki edebileceklerini göstermektedir (Kim ve ark. 2013). Ganta ve ark. tarafından yapılan araştırmada; Mat B III hücre hattının, sıçan GK-MKH’leriyle inkübe

edilerek uygun hale getirilmiş (şartlandırılmış) medyum içinde inkübasyonu sonrasında, *ekstraselüler sinyal ile regüle edilmiş kinaz-1/2* (ERK1/2) fosforilasyonunda azalma ve *p38 mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz* (MAPK) fosforilasyonunda artma gözlenmiştir. Sıçan GK-MKH'leri ile birlikte kültürlenmiş Mat B III hücrelerinde, azalmış ERK1/2 ve protein kinaz B (AKT) fosforilasyonu varken, azalmış pro-kaspaz 3 ile birlikte artmış aktif kaspaz-3 seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir (Ganta ve ark. 2009).

Diğer taraftan, GK-MKH'lerinin poröz bir membran ile Mat B III sıçan memeli tümör hücrelere direkt temasının engellendiği yarıgeçirgen hücre kültürü ortamında, GK-MKH'lerinde birçok tümör-baskılayıcı genin aşırı-ekspresyonu görülmüştür. Normal GK-MKH'leri ile tümör hücreleriyle inkübe edilen sıçan GK-MKH'leri karşılaştırıldığında, beş genin, follistatin (FST), sülfataz-1 (SULF-1), glukoz fosfataz izomeraz (GPI), HtrA serin peptidaz (HTRA1) ve adiposit farklılaşmasıyla ilişkili protein (ADRP) ekspresyonları artış gösterirken, *transforming-büyüme faktör beta-indüklenmiş (TGFB1)* ve *podoplanin (PDPN)* ekspresyonlarında azalma görülmüştür (Tamura ve ark. 2011).

Önerilen diğer mekanizma ise; bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı güçlendirilmesidir. İmmünohistokimyasal analizlere göre, sıçan GK-MKH'leri ile muamele edilen tümör alanlarında lenfositlerin çoğunluğunun T-lenfositleri olduğu ve CD8 pozitif T-lenfositlerinin yoğunluğunun arttığı gösterilmiştir (Ganta ve ark. 2009). Yapılan DNA mikroarray analizleri sonucunda; sıçan GK-MKH'lerinin lenfosit yayılması ile ilişkilendirilmiş monosit kemotaktik protein-1 (MKP-1) aracılığı ile lenfosit göçünü indüklediği düşünülmektedir (Tamura ve ark. 2011). Bu sonuçlar, yukarıda tanımlanan MKH'lerin düşük bağışıklık reaksiyonuna sebep olma özellikleri ile çelişse de; MKH'lerin bağışıklık reaksiyonu oluşturmaları tümör hücrelerinin mikro-çevreye bağlı olarak değişiklik göstermesi ile açıklanabilir.

MKH'lerin spesifik olarak tümör alanına lokalize olabilme kabiliyetleri, mevcut kanser tedavilerindeki en önemli dezavantaj olan sağlıklı doku ve hücrelerin olumsuz etkilenmesi için de potansiyel bir çözüm olarak görülmektedir. Bu anlamda; MKH'lerin sitotoksik sitokinleri eksprese edebilecek ve tümör gelişimini durdurabilecek nanopartiküller ile yüklenerek düzenlenmesi ile tümör-baskılayıcı özelliklerinin güçlendirilebileceği gösterilmiştir. GK-MKH'lerinin IL-8 ve CXCR reseptörlerini aşırı

eksprese etmeleri, bu hücrelerin Kİ-MKH'lerinden daha iyi göç kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir (Kim ve ark. 2013). Bu doğrultuda GK-MKH'leri ile yapılan çalışmada; sitotoksik sitokin IFN-beta üretme kabiliyeti kazandırılmış GK-MKH'lerinin in-vitro ve in-vivo ortamda insan meme adenokarsinoma hücrelerinin ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Matsuzuka ve ark. 2010).

2.5.2. Renal Hastalıkların Tedavisi

Genel olarak kronik böbrek hastalıkları, önemli miktarda hücre kaybı, ESM proteinlerinin birikmesi ve interstisyel fibröz gelişimi ile karakterize edilmektedir (Salem ve Thiernemann, 2010). Bu süreci engellemeye yönelik geleneksel tedavi yöntemlerinin aksine, hücre terapisi çoğunlukla hücresel onarımı ve doku yenilenmesini destekleyecek mekanizmaların aktive edilmesi prensibi üzerinden çalışmaktadır. Szczycka ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, folik asit ile indüklenmiş renal yaralanma sonrasında, Kİ kökenli hücrelerin böbrekte lokalize olduğu gösterilmiştir (Szczycka ve ark. 2005). Ito ve ark. yaptığı bir çalışmada ise, yeşil floresan protein (GFP) ile işaretlenmiş sıçan (özellikle hematopoetik kökenli olmayan) Kİ hücrelerinin, glomerülonefritli sıçan böbreklerinin mezengiyumuna lokalize olduğu, glomerüler hücrelere köken vererek hasarın onarılmasını hızlandırdığı gösterilmiştir (Ito ve ark. 2001).

İskemik-reperfüzyon hasarı, akut böbrek hasarının en önemli sebebidir ve çoğunlukla böbrek endotel ve proksimal tübül hücrelerinde olmak üzere fonksiyonel ve yapısal değişikliklere sebep olur (Salem ve Thiernemann, 2010). Morigi ve ark. tarafından yapılan çalışmada, anti-kanser ajanı olan sisplatin uygulanarak oluşturulmuş akut renal hasarlı sinjenik dişi farelere, erkek Kİ-MKH'leri verilerek, renal fonksiyonların korunduğu ve tübüler hasarın engellendiği görülmüştür. Enjekte edilen hücrelerin tübül epiteline yerleştiği ve *Lens kulinaris lektin* için bağlanma noktası olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Bu durum, MKH'lerin hasarlı böbreğe yerleştiğini ve tübül epitel hücrelerine farklılaşarak renal yapıyı ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediğini göstermektedir (Morigi ve ark. 2004). Lang ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, akut renal hasarlı sıçanlarda MKH uygulanmasıyla, renal fonksiyonlarda 2 ve 3'üncü günlerde önemli oranda düzelme ve 3'üncü günde hasar skorlarında iyileşme gözlenmiştir. MKH'lerin, infüzyon sonrasında böbrek korteksine yerleştiği ve renal fonksiyonlardaki iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir. MKH'lerin

gösterdiği bu renal-iyileştirici etkinin böbreklerdeki pro-inflamatuvar sitokinlerin, IL-1b, TNF-a, TFN-g ve iNOS ekspresyonlarının azaltılması ve anti-inflamatuvar sitokinlerin IL-10, bFGF, TGF-a ve Bcl-2 ekspresyonlarının artırılması ile sağlanan parakrin etki aracılığı gerçekleştiği gösterilmiştir (Togel ve ark. 2005). Bir başka araştırmada, kronik renal hasar sonrasında, %50'si yenilenen proksimal tübül hücrelerinin KI'inden elde edilen hücrelerin farklılaşması ile değil, hücre füzyonu ile oluştuğu gösterilmiştir. Erken dönemde yapılan çalışmalarda, MKH'lerin hasarlı böbrek alanına yerleştiği ve tübül epitel hücrelerine farklılaştığı ve renal yapının ve fonksiyonun korunduğu düşünülmekteyken, iskemik reperfüzyon modeli ile oluşturulmuş akut renal hasarlarda, etiketlenmiş MKH'lerin tübül hücrelerine farklılaşmadığı ve tübüllerde ya da vasküler endotel hücrelerinde değil, çoğunlukla glomerüllere lokalize olduğu bildirilmiştir (Salem ve Thiernemann, 2010).

Diğer bir çalışmada ise iGK-MKH'lerinin, sisplatin ile uyarılmış kronik ve akut böbrek hasarlı sıçanların renal fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu bağlamda, erken dönemde GK-MKH'leri uygulanmış deney grubunda, kan üre ve kreatin seviyesi analizleri, oluşturulan hasarda iyileşme olduğunu göstermiştir. Ayrıca GK-MKH'lerinin transplantasyonu ile renal hücre rejenerasyonun arttığı, hücre apoptozunun engellendiği ve inflamatuvar reaksiyonun ortadan kalktığı gösterilmiştir. Masson boyaması ile de GK-MKH'leri uygulanmış böbreklerde oluşan interstisyel fibröz doku alanında azalma olduğu gösterilmiştir (Peng ve ark. 2013).

2.5.3. Kardiyovasküler Hastalıkların Tedavisi

Akut miyokard enfarktüsü (AME), kardiyomiyosit hücrelerinin apoptoz veya nekroz ile ölmesi ile ilişkilendirilmiş patolojik durumdur. Kalbin rejeneratif potansiyelinin olduğu gösterilse de, kardiyomiyosit hipertrofisi ve fibrozis ile belirli oranda telafi edilen AME hasarını düzeltebilecek kapasiteye sahip olmadığı gösterilmiştir. Sınırlı donör kaynağı ve yardımcı cihaz implantasyonunun uzun süreli kullanımı ile ilgili problemler, kardiyomiyositlere farklılaşan ve skar dokularını yenileyen MKH'lerin önemli bir alternatif tedavi yolu olarak görülmesini sağlamıştır (Salem ve Thiernemann, 2010).

Birçok çalışma grubu, MKH'lerin fizyolojik veya fizyolojik olmayan uyarıcılara maruz kalmaları durumunda, kardiyomiyosit benzeri hücrelere farklılaşma kabiliyeti olduğunu göstermiştir (Makino ve ark. 1999; Xu ve ark. 2004). Shake ve ark. tarafından

yapılan araştımda, domuzlarda oluşturulan miyokard enfarktüs modelinde, domuzdan elde edilen Kİ-MKH'lerinin direk olarak miyokardiyuma enjekte edilmesi ile MKH'lerin etkin bir şekilde miyokardiyuma yerleştiği ve iki hafta içinde miyojenik farklılaşmanın gerçekleştiği, kaslara özgü proteinlerin eksprese edildiği ve bu sürede enfarktüs alanının küçüldüğü, kasılma fonksiyonlarında iyileşme ve duvar incelmesinde azalma olduğu görülmüştür (Shake ve ark. 2002).

Sıçan dilate kardiyomiyopati modelinde ise, sıçan Kİ-MKH transplantasyonunun kapiler yoğunluğunda önemli artış sağladığı ve miyokardiyal fibrozisi engellediği gösterilmiştir. MKH'lerin hem miyojenik hem de anjiyojenik farklılaşma geçirmesi, ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerini salgılaması; MKH'lerin iyileştirici etkilerini ve miyokardiyosit farklılaşmasını parakrin sinyalizasyon aracılığı ile gerçekleştirdiğini göstermiştir (Nagaya ve ark. 2005).

Yapılan bir başka araştımda ise sıçan modelinde, MKH'lerin enfarktüs sınır alanına direkt enjeksiyonunun, kardiyak fonksiyonların gelişmesini, miyosit apoptozunun azalmasını ve damar yoğunluğuğunun artışını sağladığı gösterilmiştir (Salem ve Thiernemann, 2010). Zhang ve ark. tarafından yapılan bir başka araştımda ise, AME modeli oluşturulmuş domuzlarda, iGK-MKH'lerinin enfarktüs alanına direkt enjekte edilmesinin sonrasında, bu hücrelerin yaşayabildikleri, kardiyomiyosit ve endotel hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin domuz kardiyak kök hücrelerinin farklılaşmasını desteklediği, apoptozda ve fibroziste azalmayı sağladığı gösterilmiştir. Bu şekilde ventriküler yenilenmeyi sağladığı ve fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2013).

2.5.4. Karaciğer Hastalıklarının Tedavisi

Karaciğer hastalıklarının tedavisinde, hücre terapisi yöntemi ortotopik karaciğer transplantasyonuna önemli bir alternatiftir. Önemli karaciğer hastalıklarından birisi olan, progresif hepatik fibrozis ve rejeneratif nodüllerin formasyonuna eşlik eden hepatik yapının kaybı ile karakterize edilen sirozun tedavisinde, rejeneratif potansiyelleri ve bağışıklık düzenleyici özellikleriyle MKH'ler önemli bir alternatiftir. Ayrıca MKH terapisi, karaciğer transplantasyonuna göre minimum seviyede invaziv olup, az miktarda komplikasyona sebep olmaktadır. Bu bağlamda, faz I denemesi

aşamasında, son aşamaki karaciğer sirozlu hastalara otolog MKH'lerin verilmesi ile yan etkiler görülmezsizin yaşam kalitesinde iyileşme görülmüştür. Ayrıca, faz I ve II klinik denemesinde, son aşama karaciğer hastalığı olan sekiz hastaya, otolog MKH'ler verilmiş ve MKH'lerin tolere edildiği ve karaciğer fonksiyonlarında iyileşmenin olduğu tespit edilmiştir (Kim ve Cho, 2013).

Farklılaştırılmamış iGK-MKH'lerinin, kısmi hepatektomi uygulanmış farelere transplantasyonu sonrasında, lokalize olan MKH'lerin 2, 4 ve 6. haftalarda albumin ve AFP gibi insan hepatik belirteçlerini eksprese ettiği gözlenmiştir. Bir başka çalışmada ise farklılaşmamış iGK-MKH'lerinin in vivo şartlarda hasarlı karaciğer fonksiyonlarını iyileştirdiği ve fibrozisin azalmasını sağladığı gözlenmiştir. Bu çalışma ile MKH'lerin farklılaşması olmadan da, endojenik parankimal hücrelerin farklılaşmasını uyararak ve fibröz matriksin yıkımını sağlayarak karaciğer iyileşmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, karaciğer sirozunun tedavisinde GK-MKH'lerinin anti-inflamatuvar ve anti-fibröz etkilerinin de rol oynadığı gösterilmiştir (Kim ve ark. 2013).

İnsan GK-MKH'lerinin in vitro koşullarda hepatojenik farklılaşma solüsyonuna maruz bırakıldıklarında hepatosit benzeri hücrelere farklılaştıkları, morfolojileri, olgun hepatosit hücre belirteçlerinin artışı, glikojen depolamaları, albumin ve üre sekresyonları ile gösterilmiştir. Karbon tetraklorat (CCl₄) ile oluşturulmuş akut karaciğer hasarlı farelere, GK-MKH'lerinin verilmesi sonrasında hızlı bir şekilde hasarlarda iyileşme gerçekleştiği histolojik analizler, azalmış inflamasyon seviyesi ve artmış katalaz aktivitesi ile gösterilmiştir (Burra ve ark. 2012).

2.5.5. Kıkırdak Yenilenmesi

Kıkırdak özelleşmiş bir bağ dokusudur, avasküler yapısıyla in vivo şartlarda kendini yenileyebilme kapasitesi oldukça sınırlıdır ve kıkırdak hasarlarının onarılması önemli bir problemdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; MKH'lerinin, hayvan modellerinde oluşturulan çeşitli kıkırdak hasarlarını onarabilme potansiyeli gösterilmiştir. Yapılan bir araştırmada, tavşan Kİ-MKH'leri aynı tavşanın diz kapağında oluşturulan derin osteokondral hasara implante edilmiştir. 14 hafta sonunda, tedavi grubunun semikantitatif histolojik skorlamalarının kontrol grubuna göre önemli oranda artmış olduğu, immünohistokimyasal analizlerinde ise matrikste tip II kolajen boyamasının daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak Kİ-MKH'lerinin

uygulandığı tedavi grubunda önemli oranda onarımın gerçekleştiği gösterilmiştir (Im ve ark. 2001).

Bazı araştırma grupları, hücrelerin bir iskelet içerisinde transplantasyonunu tercih etmektedir. Wakitani ve ark. bu yöntemi kullanarak, tavşan diz eklemine oluşturulan hasara, kolajen jel ile kombine edilmiş MKH'leri uygulamıştır ve iki hafta sonrasında, MKH'lerin kondrositlere farklılaşarak hasarlı dokunun yenilenmesini sağladığı, 24 hafta sonunda ise hasarın tamamen iyileştiği gösterilmiştir (Wakitani ve ark. 1994). Grigola ve ark. ise tavşan diz çapraz bağlarını keserek oluşturdukları osteoartritik hasara, Kİ-MKH'lerini hiyalüronik asit ile kombine ederek uyguladıktan 6 ay sonra, kontrol grubuna göre yenilenen doku kalitesinde önemli farklılık tespit etmişlerdir. Guo ve ark. ise keçi diz eklemi femur artiküler yüzeyinde oluşturdukları 4 x 8 mm boyutlarındaki kıkırdak hasarına, keçi Kİ-MKH'lerinin trikalsiyum fosfat içerisinde uygulanmasını takip eden 24 ay sonrasındaki yapılan değerlendirmelerde, hasarın hiyalin benzeri kıkırdak ile dolduğunu, graftın subkondral kemik ile entegre olduğunu ve 2-24 ay içerisinde onarılan dokudaki GAG içeriğinin önemli oranda arttığını göstermişlerdir (Baghaban Eslaminejad ve Malakooty Poor, 2014).

Ayrıca, MKH'lerin cerrahi müdahalesiz enjekte edilmesi de incelenmiştir. Bu bağlamda, Murphy ve ark. diz bağı ve menisküsün kesilmesi ile oluşturulmuş osteoartritik diz boşluğuna, hiyalüronik asit içerisinde süspanse edilmiş keçi Kİ-MKH'lerinin enjekte edilmesi sonrasında, mediyal menisküsün rejenerasyonunun kontrol grubuna göre daha belirgin olduğunu, tedavi grubunda eklemel kıkırdak dejenerasyonunda, osteofitik remodelizasyonda ve subkondral sklerozda önemli oranda azalma olduğu görülmüştür (Murphy ve ark. 2003).

Osteokondral dokular kıkırdak ve kemik dokusundan oluştuğu için, hücre kaynağı ve kıkırdak ile kemik arasındaki doku entegrasyonu, osteokondral rejenerasyon için önemlidir. Bu bağlamda, Wang ve ark. osteokondral dokuyu taklit eden destekleyici bir iskelet geliştirmiştir; osteojenik ve kondrojenik yapıların arasına GK-MKH'leri konularak yerleştirilen iskeletin, hasarlı alana uygulanmasının ardından, histolojik ve immünohistokimyasal analizler, kontrol grubuna göre daha iyi entegrasyonun gerçekleştiğini göstermiştir (Wang ve ark. 2011). Sonuç olarak, MKH'ler kıkırdak hasarlarının onarılmasında önemli bir tedavi kaynağı olarak görülmektedir (Kim ve ark. 2013).

2.5.6. Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisi

Son zamanlarda, MKH'lerin özellikle ölümcül ve tedavisi zor nöro-dejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanımı önemli bir çalışma alanı olmuştur. MKH'lerin beyin kökenli nörotropik faktör ve gliyal kökenli nörotropik faktör gibi büyüme faktörlerinin üretimiyle nöron hasarlarının onarılmasını ve yeni nöronların üretilmesini sağladığı gösterilmiştir. MKH'lerin hasarlı alana ulaştırılmasında çeşitli yollar denenmiştir, intraserebral veya intratekal enjeksiyon ya da intranasal yoldan infüzyon kullanılmıştır. MKH'lerin transplantasyonunu takiben, beyin içindeki MKH'ler endojen nöronal büyüme faktörlerin üretimini artırarak, tümörü azalttığı ve inflamasyonu regüle ettiği gösterilmiştir. MKH'lerin hasarlı doku mikroçevresinin modifikasyonunu kontrol edip, endojenik nörol rejenerasyonu hızlandırdığı ve korunmasını iyileştirdiği gösterilmiştir. Deneysel multipl skleroz modeli olarak alerjik ansefalomyelit oluşturulmuş farelerde, intraventriküler MKH enfüzyonu uygulanmış tedavi grubunda, akson sayısı kontrol grubuna göre iki kat artmıştır. Yapılan bir başka araştırmada ise, iKİ-MKH'lerinin bağışıklığı zayıflatılmış farelere transplantasyonu sonrasında, endojen nöral kök hücrelerinin proliferasyonunda önemli artış gözlenmiştir (Joyce ve ark. 2010). Zickri ve ark tarafından yapılan araştırmada ise, adriyamisin (ADR) ile oluşturulmuş serebral dejenerasyonun, GK-MKH'lerinin uygulanması ile iyileştiği gösterilmiştir (Zickri ve ark. 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 12.06.2014 tarihli ve 83045809/604/88248 sayılı onay alınmıştır ve tüm çalışmalar Etik Kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, T.C. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doku Kültürü, Işık ve Elektron Mikroskopi Laboratuvarları ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Laboratuvarlarında, 10.02.2015-25.11.2015 tarihleri arasında yürütülmüştür. Çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı'ndan sezaryan ile doğum yapan gönüllü vericilerden elde edilen 4 adet göbek kordonu kullanılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Alet ve teçhizat

11 numaralı ince uçlu pens

24 numaralı ince uçlu pens

Forseps

Cerrahi dikiş seti

Steril serolojik pipet 5 ml (Jet Biofil: GSP-010-005)

Steril serolojik pipet 10 ml (Jet Biofil: GSP-010-010)

1-10 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

10-100 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

10-200 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

100-1000 µl'lik mikropipet (Eppendorf)

10 µl, 100 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik mikropipet uçları

15 ml'lik steril dibi konik santrifüj tüpü (Corning Star: 430790)

50 ml'lik steril dibi konik santrifüj tüpü (Corning Star: 430829)

Eppendorf tüpü (Labosel 98/79/CE)

Kültür petri dish [(kapakları ile birlikte) BD Falcon)

25 m²'lik hücre kültür tabağı (Jet Biofil: TCF-012-050)

75 m²'lik hücre kültür tabağı (Jet Biofil: TCF-012-250)

24 kuyucuklu doku kültür tabağı (Biofil: TCP 011024)
 70 µm'lik hücre filtresi (SPL Life Sciences)
 Tek kullanımlık filtre 0,2 µm (Sartorius Biotech: 1653400449103)
 Hemositometre (Marienfeld: 0640010)
 Lam (Marienfeld)
 Yuvarlak lamel (Marienfeld)
 Grid [200 Mesh, 3 mm, Cu (Spi: 2020C)]

3.1.2. Kimyasal malzemeler

Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyum (DMEM/F12) (Sigma: D8062)
 Leibovitz-15 medyum (Pan-Biotech: P04-27500)
 Fetal bovine serum (FBS: Hyclone: HY30160.03)
 L-Glutamin 200 mM (Hyclone: SH30034.01)
 Amfoterisin B solüsyonu (Sigma: A5955)
 Penisilin+Streptomisin (Hyclone: SV30010)
 Enzim kolajenaz B (Roche 11088815001)
 Tripsin/EDTA solüsyonu (Hyclone: SH30042.01)
 Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS: Amresco E404)
 CD34-FITC antikor (BD Biosciences: 555801)
 CD44-PE- antikor (BD Biosciences:550989)
 CD45-APC-Cy antikor (BD Biosciences: 557833)
 CD90-APC-antikor (BD Biosciences: 559869)
 Metanol (Sigma-Aldrich: 24229)
 Hematoksilen (Invitrogen 00-8011)
 Eozin (Merck: 1.15935)
 Entellan Alkol bazlı kapatma solüsyonu (Merck 1.07961)
 Agar (Multicell: 800-010-LG)
 Gluteraldehit (Merck Millipore: 1.04239.0250)
 Osmium tetroksit (Merck Millipore: 1.00983.2511)
 Araldite M (Fluka Analytical: 10951)
 Araldite M 960 (Fluka Analytical: 10952)
 Araldite M 964 (Fluka Analytical: 10953)
 Etil Alkol %96 (Alkomed: CAS 64-17-5)

Propilen oksit (Merck: 8.07027.1000)
 Toluidin mavisi (Merck: 7471451)
 Uranil asetat dihidrat (Merck: 4087843)
 Kurşun sitrat (Sigma 15326-100G)
 Sodyum sitrat (Merc: 1.06448.1000)

3.1.3. Cihazlar

Sterile edilmiş sınıf II laminar havalandırılmalı tezgâh (Esco: Class II)
 İnkübatör (Thermo Scientific, Heracell 150i)
 Santrifüj (Eppendorf: 5810 R)
 Buz dolabı (Arçelik)
 Vorteks (Biocote: Stuart SA8)
 Dijital çalkalamalı sıcak su banyosu (Fisher Scientific)
 Manyetik karıştırıcı (IKA Rct Basic)
 Elektrikli pipet pompası (Ratiolab: Accupetta)
 Hassas terazi (Sartorius)
 Flow sitometer (BD FACSCanto II)
 Etüv (Heraeus)
 Mikrotom (Thermo Scientific Microm hm430)
 Ultramikrotom (Reichert UM2 - Reichert UM3)
 Mikrodalga fırın (Arçelik)
 Ters (İnvert) mikroskop (Olympus IX71)
 Işık mikroskobu (Olympus BX61)
 Kamera (Olympus DP72)
 Elektron mikroskobu (Jeol Jem-1011)
 Distile su cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium pro VF)
 UV'li Steril bidistile su cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium 61215)
 Masaüstü otoklav (Thermo Scientific Varioklav: 25T)

3.2. Göbek Kordonundan MKH'lerin İzolasyonu

3.2.1. Göbek Kordonlarının Taşınması

Elde edilen GK'ları %2'lik (v/v) amfoterisin B içeren Leibovitz-15 taşıma medyumunu içinde düşük ısı ortamında laboratuvara taşındı. Laminar havalandırılmalı

kabinde, forseps yardımı ile çıkartılıp 5 cm uzunluğunda olacak şekilde kesildi ve sonrasında işleme sokulmadan önce fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS) ile yıkandı (Can ve Balci, 2011).

3.2.2. MKH'lerin Bölgesel İzolasyonu

3.2.2.1. Subamniyotik Alandan İzolasyon

Enzimatik Yöntem

1. Gün: SAA'daki stromal hücrelerin izolasyonu amacı ile GK amniyotik membranın 0,2 cm kadar altına denk gelecek derinlikte boydan boya kesildi ve amniyotik membran aynı kalınlıkta olacak şekilde çepeçevre bisturi yardımı ile ayrıldı. Çıkarılan amniyotik membran 2-3 mm² lik 20 küçük parçaya ayrıldı ve falkon tüplere alınarak üzerine kültür medyumu [DMEM/F12(1/1), %10 FBS, 1% penisilin/streptomisin, 2,5 ug/mL amphoteresin B] eklendi. 250 g de 5 dakika boyunca 4°C'de çevrildi ve bu işlem 2 kez daha tekrarlandı. Pellet % 0,1'lik (w/v) kolajenaz B enzimi içeren kültür medyumunda yeniden süspanse edilip ve 3 saat boyunca 37 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Sindirim solüsyonu üzerine en az 3 katı kadar kültür medyumu eklendi. 350 g de santrifüj edilip, süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Elde edilen hücre pelletleri kültür medyumu ile yeniden süspanse edildi. Daha sonrasında elde edilen hücre solüsyonu T25 flaska ekildi. Hücreler 3 gün boyunca nemlendirilmiş ortamda, %5 CO₂ ve 37 °C'lik kültür ortamında inkübasyona bırakıldı.

4. Gün: Yapışmayan hücrelerin ve doku parçalarının uzaklaştırılması için flasklar önceden ısıtılmış kültür medyumu ile yıkanıp, 5 ml medyum ortama eklendi. Haftada 2 kez medyum değiştirildi.

12-15. Günler: Hücrelerin % 80-90 lık yoğunluğa ulaşması beklenmektedir. Yoğunluğa ulaşıldığında, trypsin/EDTA ile yapışan hücreler kaldırıldı. Ayrılan hücrelerin üzerine medyum eklenerek sindirim reaksiyonu durduruldu ve 200 g de 10 dakika boyunca çevrilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine medyum eklenerek yeniden süspanse edilen hücre solüsyonu hemositometre yardımı ile sayıldı. Pasajlanan primer kültür hücreleri [1.pasaj hücreleri (P1 hücreleri)] olarak adlandırıldı. Hemaotometre ile sayılan hücrelerin (P1) 3×10^5 tanesi sonraki pasaj (P2) için 25 cm²'lik flaska (T25 flaska) ekildi.

Doku Eksplantı Yöntemi

1. Gün: 20 adet 2-3 mm² lik amniyotik membran parçası, iç yüzleri petri tabağına temas edecek şekilde 0,5 cm aralıklarla yerleştirildi. Kültür medyumunda 4 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerine 5 ml daha medyum eklendi.

4. Gün: Medyum değiştirildi.

5-25. Günler: Bu günler arasında, haftada 2 kez medyum değiştirildi. Doku eksplantlarının etrafındaki hücre yoğunluğuna göre değişen sürelerde doku eksplantları uzaklaştırıldı. % 80-90'lık yoğunluğa ulaşıldığında, hücreler tripsin/EDTA ile pasajlanıp ve toplanan P1 hücreleri, hemositometre ile sayıldı ve 3×10^5 tanesi sonraki pasaj (P2) için T25 flaska ekildi.

3.2.2.2. Perivasküler Alandan İzolasyon

Enzimatik Yöntem

1. Gün: Amniyotik membranın uzaklaştırılması ile ortaya çıkan Wharton jelinden pens yardımıyla damarlar çekilmek suretiyle çıkarıldı. Çıkarılan damarlar boylamasına kesilerek 2-3 mm² lik 20 küçük parçaya ayrıldı. Sonraki aşamalarda subamniyotik alan hücre izolasyonunda uygulanan basamaklar aynen tekralandı.

4. Gün: Yapışmayan hücrelerin ve doku parçalarının uzaklaştırılması için flasklar kültür medyumunu ile yıkandı ve ortama yeni medyum eklendi.

5-15. Günler: Haftada 2 kez medyum değiştirildi. % 80-90'lık yoğunluğa ulaşıldığında, hücreler tripsin/EDTA ile pasajlanıp, toplanan P1 hücreleri, hemositometre ile sayıldı ve 3×10^5 tanesi sonraki pasaj (P2) için T25 flaska ekildi.

Doku Eksplantı Yöntemi

1. Gün: Çıkarılan göbek kordonu veni ve arterleri bir noktada boylamasına olacak şekilde açılıp ve perivasküler alan içe bakacak şekilde petri tabağına 20 adet 2-3 mm² lik küçük parçalar halinde, 0,5 cm aralıklarla yerleştirildi. Yapışma için beklenen süre sonunda ortama medyum eklendi.

4. Gün: Medyum değiştirildi.

5-25. Günler: Bu günler arasında, haftada 2 kez medyum değiştirildi. Doku eksplantlarının etrafındaki hücre yoğunluğuna göre değişen sürelerde doku eksplantları uzaklaştırıldı. % 80-90'lık yoğunluğa ulaşıldığında hücreler tripsin/EDTA ile

pasajlanıp, toplanan P1 hücreleri hemositometre ile sayıldı ve 3×10^5 tanesi sonraki pasaj (P2) için T25 flaska ekildi.

3.2.2.3. İntervasküler Alandan İzolasyon

Enzimatik Yöntem

1.Gün: En son olarak geri kalan intervasküler doku, 2-3 mm² lik 20 küçük parçaya ayrılıp, falkon tüplere alındı ve üzerine 20 ml kültür medyum ekildi. Bundan sonraki basamaklarda uygulanan işlemler subamniyotik alan hücre izolasyonu ile benzer şekilde gerçekleştirildi.

4.Gün: Yapışmayan hücrelerin ve doku parçalarının uzaklaştırılması için flasklar medyum ile yıkanıp, ortama yeni medyum ekildi.

5-15. Günler: Haftada 2 kez medyum değiştirildi. % 80-90'lık yoğunluğa ulaşıldığında, tripsin/EDTA ile pasajlandı, toplanan P1 hücreleri sayıldı ve 3×10^5 tanesi sonraki pasaj (P2) için T25 flaska ekildi.

Doku Eksplantı Yöntemi

1.Gün: 20 adet 2-3 mm² lik küçük parçalar haline getirilmiş doku parçaları petri tabağına 0,5 cm'lik aralıklarla yerleştirildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, üzerine medyum ekildi.

4.Gün: Medyum değiştirildi.

5-25.Günler: Bu günler arasında, haftada 2 kez medyum değiştirildi. Doku eksplantlarının etrafındaki hücre yoğunluğuna göre değişen sürelerde doku eksplantları uzaklaştırıldı. % 80-90'lık yoğunluğa ulaşıldığında hücreler tripsin/EDTA ile pasajlanıp, toplanan P1 hücreleri sayıldı ve 3×10^5 tanesi sonraki pasaj (P2) için T25 flaska ekildi.

3.3. İzole Edilen MKH'lerin Işık Mikroskopik Analizi

Her pasaj sonrasında, her gruptan izole edilen 5000 kadar iGK-MKH'si, sitokimyasal boyamalar için yuvarlak lameller üzerine ekildi. Lamellere ekilen hücreler 24 saat kültüre edildi, metanol ile fikse edildikten sonra hematoksilen (H) ile boyandı ve sonrasında eozin (E) ile boyanarak kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Daha sonrasında örnekler, Olympus BX61 mikroskop ile incelendikten sonra Olympus DP72 kamerası ile fotoğraflandı.

3.4. İzole Edilen MKH'lerin Proliferasyon Hızlarının Hesaplanması

25 cm²'lik kültür kabında %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşan hücreler tripsin/EDTA ile muamele edilerek toplandı ve invert mikroskop kullanılarak hemositometre ile sayıldı. Bu şekilde birbirini takip eden 1. ve 7. pasajlar arasında, geçen sürenin, hücre sayısındaki katlanma sayısına bölünmesi ile popülasyon katlanma süresi (PKS) hesaplandı (Denklem 3-1) (Salehinejad ve ark. 2012; Schugar ve ark. 2009).

$$PKS = \frac{A}{B}$$

Denklem 3-1

PKS: Popülasyon Katlanma Süresi

A: İki pasaj arasında geçen süre

B: Log2 (Elde edilen hücre sayısı / Ekilen hücre sayısı)

3.5. İzole Edilen MKH'lerin Flow Sitometrik Analizi

Belirlenen CD34, CD44, CD45 ve CD90 yüzey antijenlerinin ekspresyon seviyesi analizleri BD FACS Canto II Flow Sitometresi kullanılarak, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

SAA, PVA ve IVA'lardan enzimatik/doku eksplantı yöntemleriyle izole edilen hücrelerin ilerleyen pasajlardaki (P3, P5 ve P7) yüzey antijenlerinin ekspresyon seviyelerine bakıldı. Pasajlanan hücreler medyum içerisinde süspansedildi ve 70 µm'lik filtreden geçirildi. 1500 rpm de 5 dakika çevrilerek, supernatant uzaklaştırıldı. 2 ml boyama tamponu [%2'lik FBS'li PBS solüsyonu (stain buffer)] ile süspansedilen hücrelerden alınan örnekler tripan mavisi ile boyanarak canlı hücre oranı belirlendi. Canlı hücre sayısına göre, eklenecek antikor miktarı belirlendi. Sonrasında 2 ml'lik boyama tamponu içindeki hücreler sentrifüj edilip supernatant uzaklaştırılarak ve 100 µl boyama tamponu ve antikor eklenerek nazik bir şekilde yeniden süspansedilen hücreler, karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, 3000 rpm de 5 dakika santrifüjlenerek konjüge olmayan antikorlar supernatant ile uzaklaştırıldı. Son olarak 1,5 ml boyama tamponu eklenerek pellet tekrar süspansedildi ve yıkandı. 3000 rpm de 5 dk çevrilip, supernatant uzaklaştırıldı ve hücre sayısına göre boyama tamponu eklenerek analiz edildi.

3.6. Ultrastrüktürel Yöntemler

Geçirimli elektron mikroskobu incelemeleri için, 2. pasaj MKH'leri 75'cm²'lik flaslara 3x10⁵ kadar hücre ekildi. Konflüensiye ulaşan hücreler pasajlanıp ve P3 hücre pelleti elde edildi. Pellet üzerine % 2,5'luk glüteraldehit solüsyonu eklenerek 1 saat fikse edilip, inkübasyonun son 10 dakikasında, tüp 1200 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonrasında supernatant uzaklaştırılıp, Millonig tamponu eklenip ve nazıkçe karıştırıldı. 1200 rpm de 10 dakika tekrar santrifüjlendi. Supernatant uzaklaştırılıp ve %1'lik osmiyum tetroksit eklenerek, 30 dakika ikincil fiksasyona bırakıldı (Son 10 dakikada 1200 rpm'de santrifüjlenir). Tekrar Millonig tamponu ile yıkanıp, santrifüjlendi ve supernatant uzaklaştırıldı. Önceden hazırlanmış %2'lik sıvı agar lam üzerine damlatıldı ve hücre pelleti agar üzerine eklendi. Hücre pelleti agar içinde bırakılarak katılaşması beklendi. Agar içindeki hücre pelleti, dehidratasyon için 10'ar dakika %30, %50, %70, %80, %96'lık alkollerden, 15 dakika %100 alkolden geçirildi. Hücre pelleti 15 dakika propilen oksitte bekletildi. Ardından sırasıyla 1:1 oranında propilen oksit-araldit karışımında 1 saat, 1:3 oranında propilen oksit-araldit karışımında 45 dakika ve saf aralditte 1 gece bekletildikten sonra yuvarlak plastik kalıplara dökülmüş saf araldit içerisine gömüldü. Kalıplar 24 saat boyunca 45°C'lik etüvde, 48 saat boyunca 60°C'lik etüvde bırakılarak aralditin polimerizasyonu sağlandı. Elde edilen araldit bloklardan, önce Reichert UM2 mikrotomla 0,5 µ kalınlığında yarı ince kesitler alındı, toluidin mavisi ile boyanarak istenilen bölge tespit edildi. Reichert UM3 mikrotomla da 40-50 nm kalınlığında ince kesitler alındı ve bakır grid üzerine yapıştırıldı. Gridlerdeki kesitler %70 etanol ile hazırlanmış doymuş uranil asetat solüsyonu ile 30 dakika ardından Reynol'un kurşun sitratı ile 15 dakika kontrastlandı. Jeol Jem-1011 model elektron mikroskobunda incelen kesitlerin fotoğrafları Olympus Soft Imaging kamera sistemi ile görüntüldü. Elde edilen iGK-MKH'lerine ait ultrastrüktürel özellikler, az (+), orta (++) ve yoğun (+++) kategorilerinde semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel Yöntemler

Doku eksplantı ve enzimatik yöntemlerde, ilk fibroblast benzeri hücrelerin ortaya çıkışı için geçen sürelerin değerlendirilmesinde, iki grup arasındaki karşılaştırma için One Way ANOVA testi kullanıldı. p<0,05 sınırı anlamlılık değeri olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz GraphPad InStat programı ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

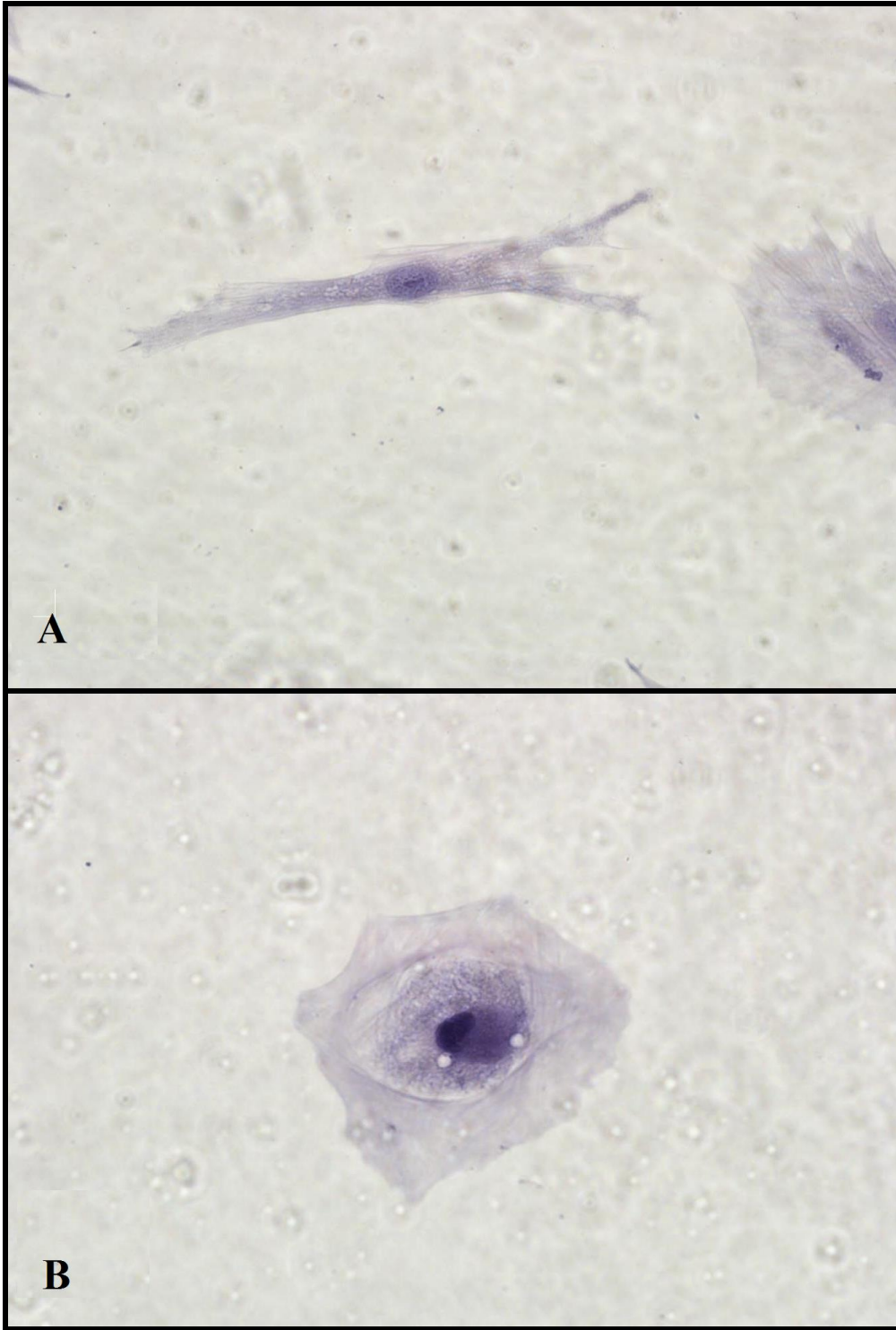
İGK-MKH'leri, üç farklı bölgeden, enzimatik (E) ve doku eksplantı (D) yöntemleri ile izole edildi. İntervasküler alan doku eksplantı (IVA-D), perivasküler alan doku eksplantı (PVA-D), subamniyotik alan doku eksplantı (SAA-D), intervasküler alan enzimatik (IVA-E), perivasküler alan enzimatik (PVA-E) ve subamniyotik alan enzimatik (SAA-E) MKH'leri fikse edildikten sonra hematoksilen-eozin (H+E) ile boyandı. İzole edilen iGK-MKH'leri incelendiğinde, üç farklı hücre morfolojisi tespit edilmiştir; aktif fibroblast benzeri dallanmış ya da stellat (Şekil 4-1), inaktif fibroblast benzeri fuziform (iğsi) (Şekil-2A) ve çok az sayıda yuvarlak (elips) (Şekil-2B) morfolojiye sahip hücreler.

İzole edilen iGK-MKH'lerinde genel olarak bir ya da iki belirgin nukleolus içeren ökromatik boyanan nukleus yapısı gözlenmiştir.



Şekil 4-1: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.

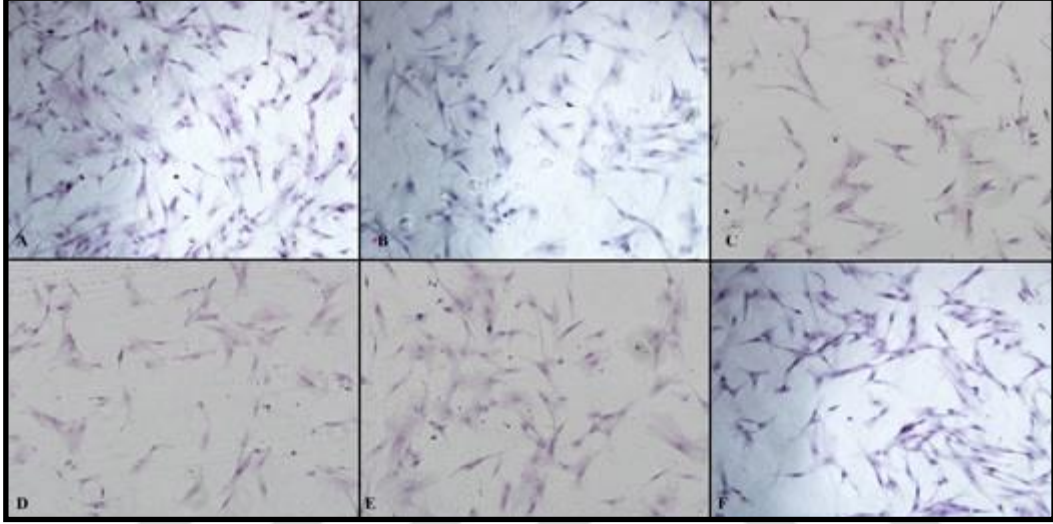
A) Aktif fibroblast benzeri dallanmış hücre morfoloji. (H+E, 40x)



Şekil 4-2: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.

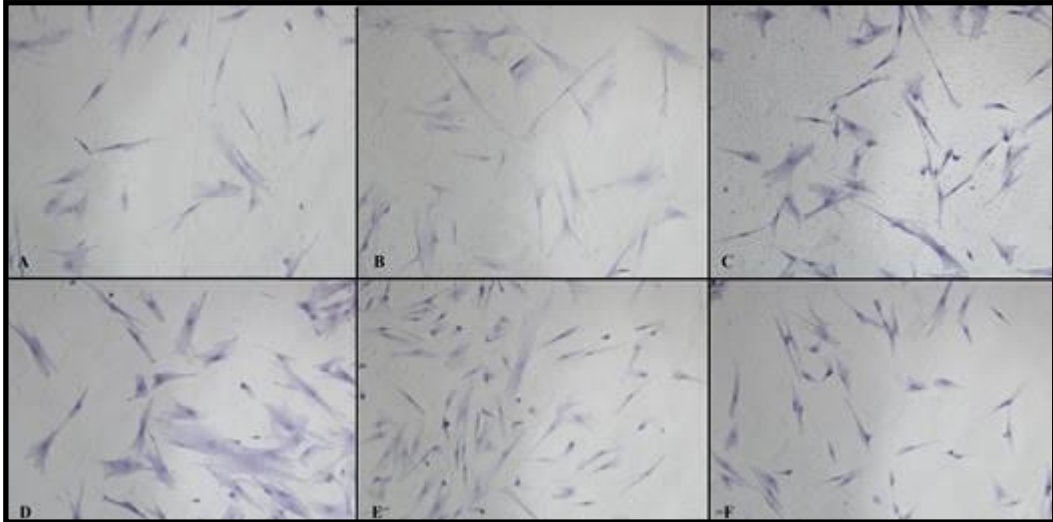
A) Fuziform (iğsi) hücre morfolojisi, B) Yuvarlak hücre morfolojisi. (H+E, 40x)

Erken dönemde (ilk pasajlar; P1, P2, P3) izole edilen iGK-MKH'leri gruplarında, hücrelerin genel olarak dallanmış aktif fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4-3). Geç dönemde ise (P4, P5, P6, P7) iGK-MKH'leri gruplarında, hücrelerin genel olarak fuziform (iğsi) morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4-4).



Şekil 4-3: Erken dönemde iGK-MKH'leri gruplarının genel morfolojisi.

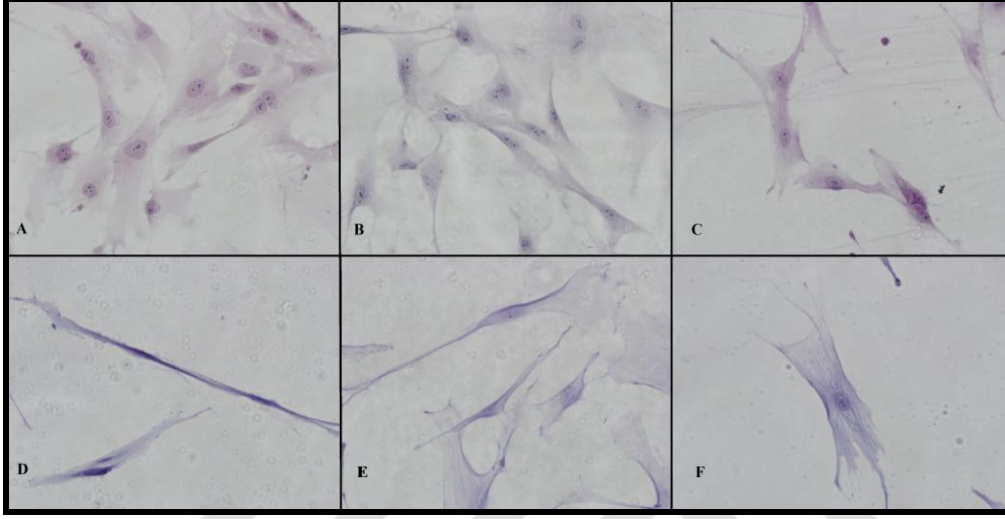
A) IVA-D-P2, B) PVA-D-P2, C) SAA-D-P2, D) IVA-E-P2, E) PVA-E-P2, F) SAA-E-P2. (H+E, 10X)



Şekil 4-4: Geç dönemde iGK-MKH'leri gruplarının genel morfolojisi.

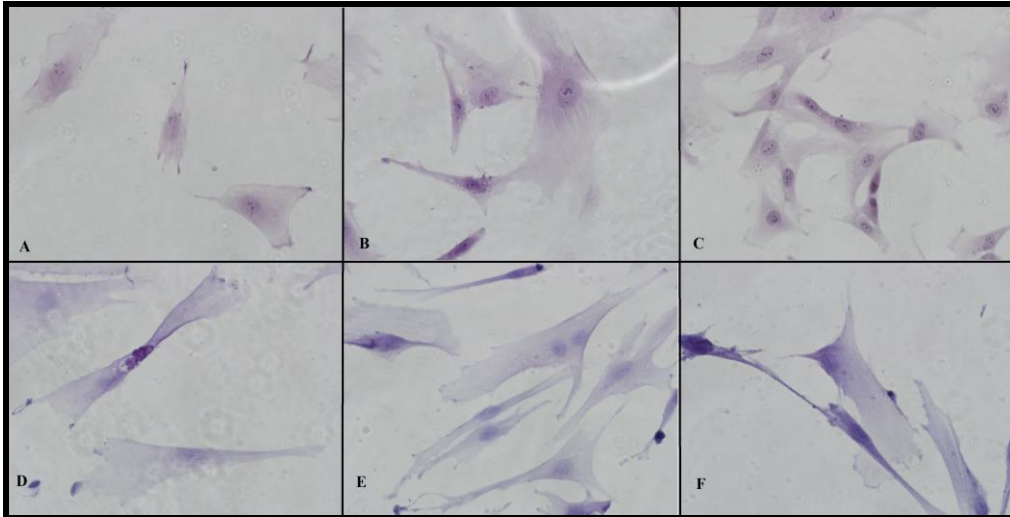
A) IVA-D-P5, B) PVA-D-P5, C) SAA-D-P5, D) IVA-E-P5, E) PVA-E-P5, F) SAA-E-P5. (H+E, 10X)

Erken dönem (ilk pasajlar; P1, P2, P3) ve geç dönem (P4, P5, P6, P7) enzimatik (Şekil 4-5) ve doku eksplantı (Şekil 4-6) yöntemi ile izole edilen iGK-MKH gruplarının yüksek büyütmedeki görüntüleri. Hücrelerin geç dönemde fuziform (iğsi) morfoloji kazanmasının yanında, boyutlarındaki artış da belirgin olarak gözlenmektedir.



Şekil 4-5: Doku eksplantı ile izole edilen iGK-MKH'leri gruplarının geç ve erken dönem hücre morfolojilerinin karşılaştırılması; üst panel 2. pasaj hücreleri alt panel 5. pasaj hücreleri.

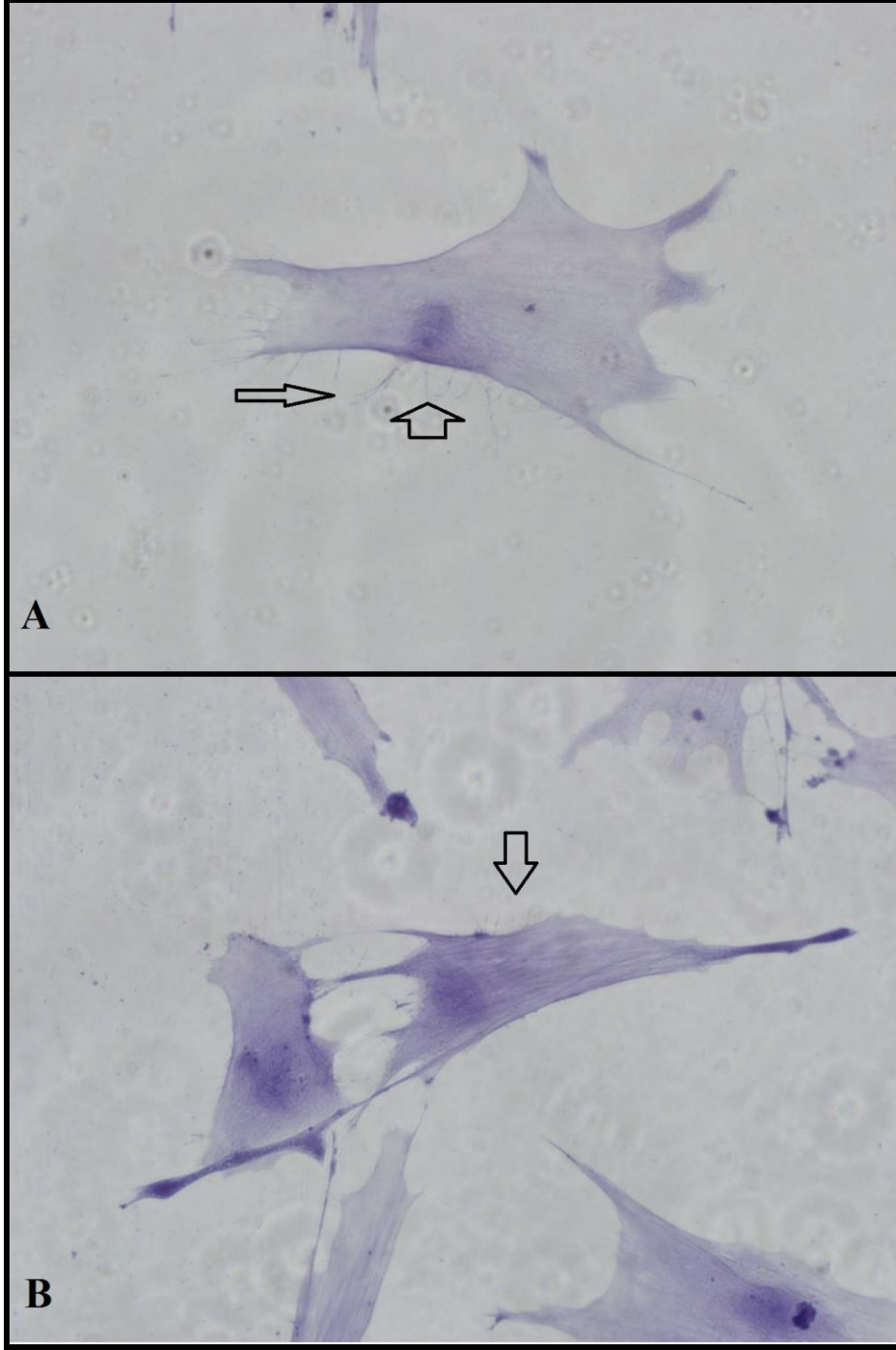
A) IVA-D-P2, B) PVA-D-P2, C) SAA-D-P2, D) IVA-D-P5, E) PVA-D-P5 F) SAA-D-P5. (H+E, 40X)



Şekil 4-6: Enzimatik yöntem ile izole edilen iGK-MKH'leri gruplarının geç ve erken dönem hücre morfolojilerinin karşılaştırılması; üst panel 2. pasaj hücreleri alt panel 5. pasaj hücreleri.

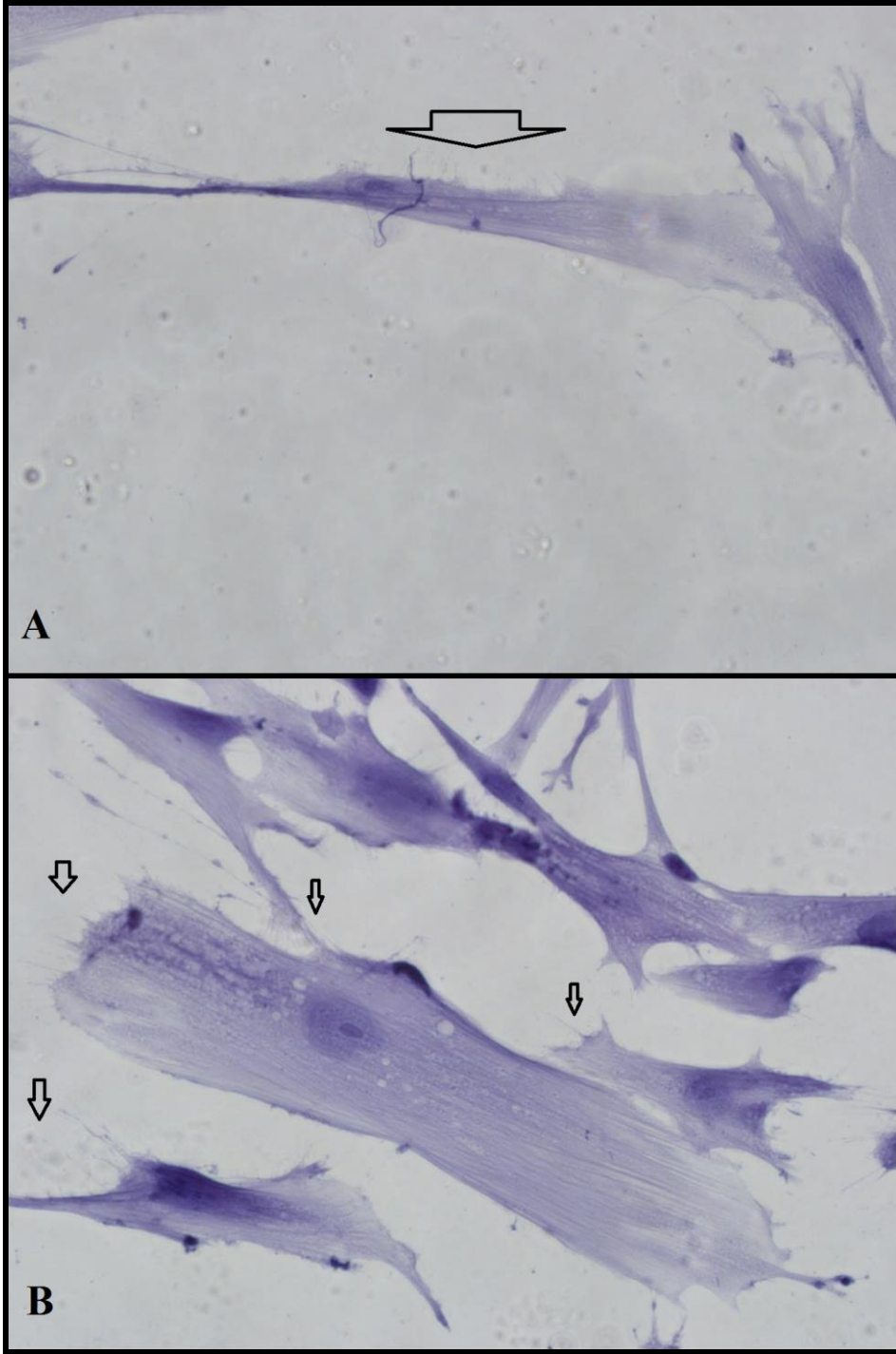
A) IVA-E-P2, B) PVA-E-P2, C) SAA-E-P2, D) IVA-E-P5, E) PVA-E-P5 F) SAA-E-P5. (H+E, 40X)

İzole edilen iGK-MKH'leri gruplarında geç dönemlerde bazı hücrelerin çeşitli uzunluklarda ve sayıda ince sitoplazmik uzantılara sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9).



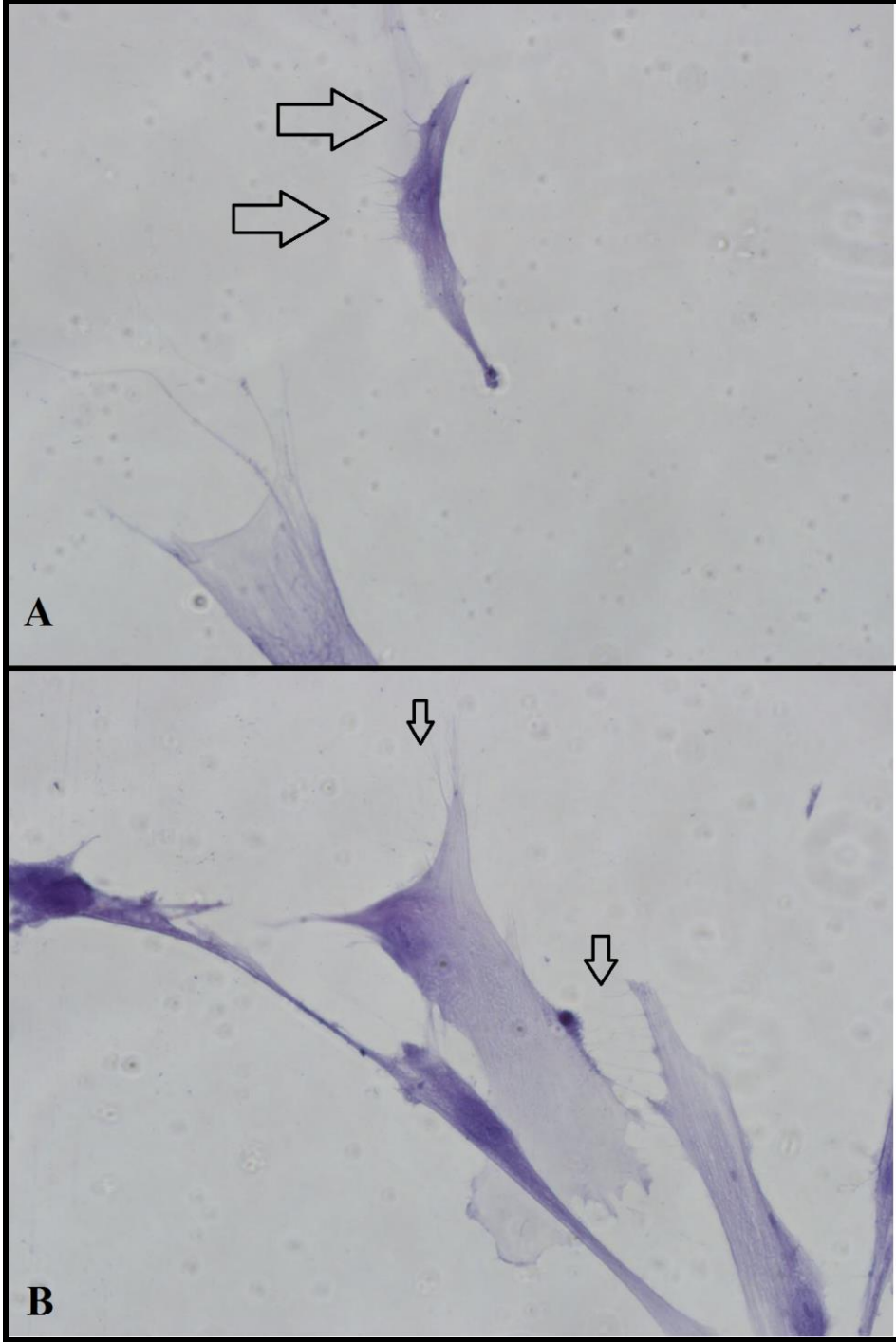
Şekil 4-7: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.

A) IVA-D-P5 ve B) IVA-E-P5. Oklar: hücrelerden çıkan sitoplazmik uzantılar (H+E, 40X).



Şekil 4-8: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.

A) PVA-D-P5 ve B) PVA-E-P5. Oklar: hücrelerden çıkan sitoplazmik uzantılar (H+E, 40X).

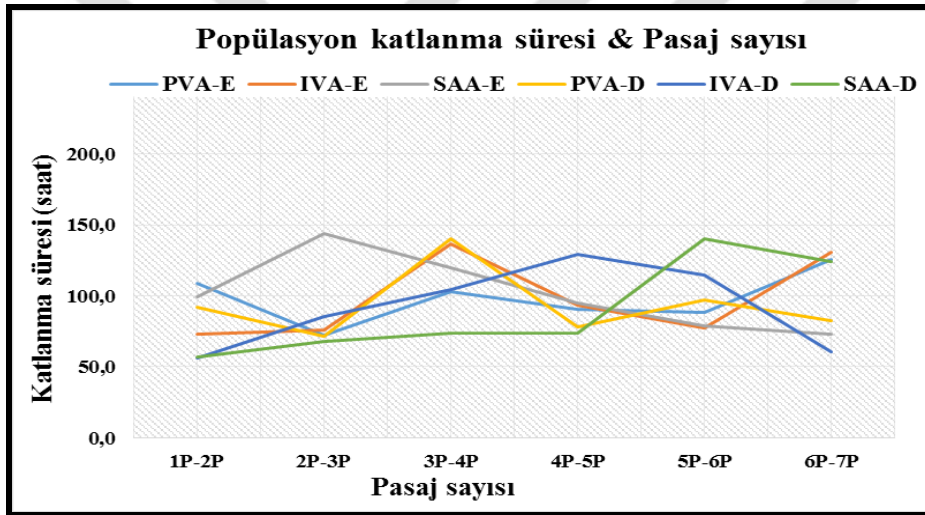


Şekil 4-9: İzole edilen iGK-MKH'lerinin morfolojileri.

A) SAA-D-P5 ve B) SAA-E-P5. Oklar: hücrelerden çıkan sitoplazmik uzantılar (H+E, 40X).

4.2. Proliferasyon Değerlendirmesi

İzole edilen iGK-MKH'lerinin proliferasyon hızları, iki pasaj arasındaki katlanma süresinin hesaplanması ile belirlenmiştir. Her bir iGK-MKH grubu için popülasyon katlanma süreleri (PKS'leri) ilerleyen pasajlarda inişli çıkışlı bir eğilim göstermekte olup, gruplar arasında belirgin bir orada farklılık izlenmemiştir (Şekil 4-10 ve Tablo 4-1). Ayrıca her bir grubun PKS'leri erken (P1-P2, P2-P3, P3-P4) ve geç (P4-P5, P5-P6, P6-P7) dönemler altında izlendiğinde; PVA-E, IVA-E, IVA-D ve SAA-D gruplarında erken dönem PKS'leri geç dönem PKS'den daha az iken, SAA-E ve PVA-D gruplarında ise geç dönem PKS'leri erken dönem PKS'den daha az olduğu gözlenmiştir (Tablo 4-2).



Şekil 4-10: Farklı iGK-MKH'lerin ilerleyen pasajlardaki katlanma süresindeki değişimi.

Tablo 4-1: Farklı iGK-MKH'lerin ilerleyen pasajlardaki katlanma süreleri (saat olarak).

	1P-2P	2P-3P	3P-4P	4P-5P	5P-6P	6P-7P
PVA-E	108,7*	72,5*	102,7*	90,5**	88,6**	125,5**
IVA-E	73,2*	75,8*	136,8*	93,4**	77,3**	130,8**
SAA-E	99,4*	143,5*	120,0***	95,0**	79,0**	73,0**
PVA-D	91,9*	71,3*	140,4*	78,0**	97,4**	82,8**
IVA-D	55,9*	85,2*	104,6***	129,6**	114,5**	60,7**
SAA-D	56,6*	67,9***	73,9***	73,9**	139,9**	124,3**

*** 4 farklı örnekten elde edilen analiz ortalaması.

** 3 farklı örnekten elde edilen analiz ortalaması.

* 2 farklı örnekten elde edilen analiz ortalaması.

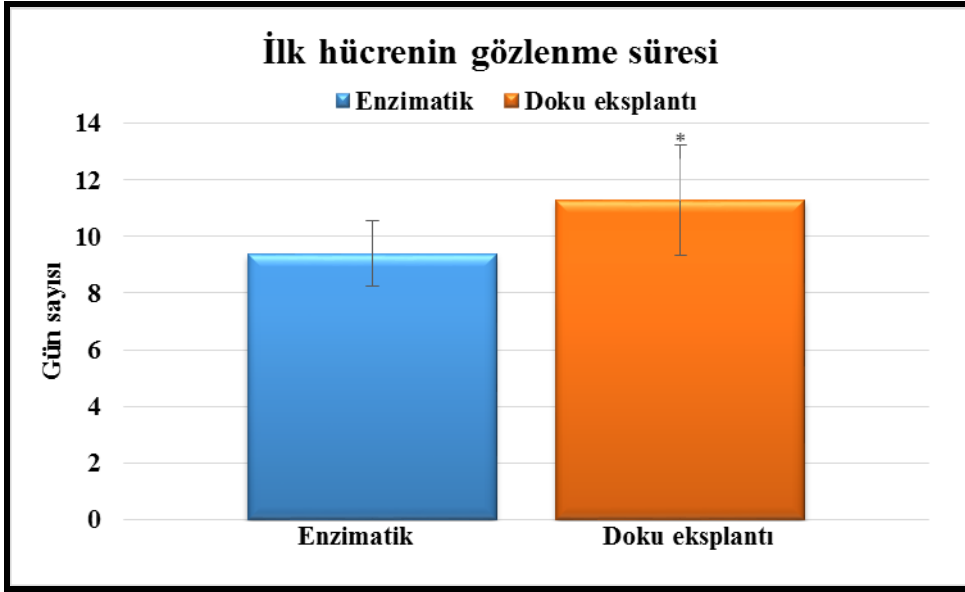
Tablo 4-2: Farklı iGK-MKH gruplarının erken (P1-P4) ve geç dönemdeki (P4-P7) ve genel (P1-P7) PKS'lerinin ortalamaları (saat olarak).

	Erken dönem ortalama PKS (s) ±Standart hata (s)	Geç dönem ortalama PKS (s) ± Standart hata (s)	Ortalama PKS (s) ± Standart hata (s)
PVA-E	94,6±11,2	101,5± 12,0	98,1±7,5
IVA-E	95,3±20,8	100,5±15,9	97,9±11,7
SAA-E	121,0±12,8	82,3±6,6	101,6±10,8
PVA-D	101,2±20,5	86,1±5,8	93,6±10,1
IVA-D	81,9±14,2	101,6±20,9	91,8±12,1
SAA-D	66,2±5,1	112,7±19,9	89,4±13,9

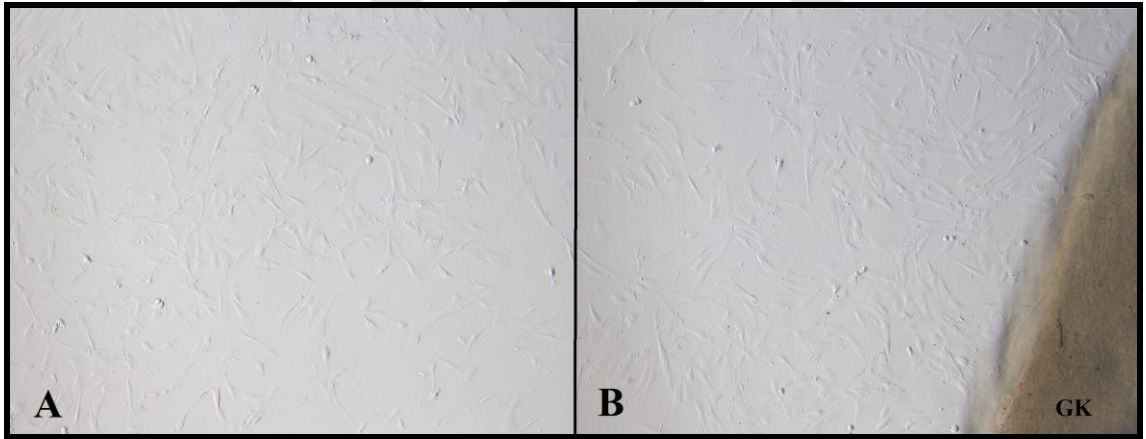
Enzimatik ve doku eksplantı yöntemlerinde ilk fibroblast benzeri morfolojide hücrelerin gözlenmesi için geçen süreler karşılaştırıldığında; enzimatik yöntemde hücrelerin daha erken gözlendiği tespit edilmiştir (Tablo 4-3 ve Şekil 4-12). Ancak aralarındaki fark istatistiksel anlamda önemli değildir (Şekil 4-11).

Tablo 4-3: Enzimatik ve doku eksplantı yöntemleriyle incelenen örneklerde ilk hücrelerin ortaya çıkma süresi (gün olarak).

	İlk hücrenin ortaya çıkma süresi (gün) ± Standart hata (gün)	IVA-D	İlk hücrenin ortaya çıkma süresi (gün) ± Standart hata (gün)
I-IVA-E	11	I-IVA-D	13
II-IVA-E	10	II-IVA-D	10
III-IVA-E	10	III-IVA-D	13
IV-IVA-E	6	IV-IVA-D	6
I-PVA-E	12	I-PVA-D	13
II-PVA-E	11	II-PVA-D	9
III-PVA-E	8	III-PVA-D	13
IV-PVA-E	6	IV-PVA-D	6
I-SAA-E	12	I-SAA-D	19
II-SAA-E	11	II-SAA-D	14
III-SAA-E	10	III-SAA-D	13
IV-SAA-E	6	IV-SAA-D	6
Ortalama	9,4±0,7	Ortalama	11,3± 1,1



Şekil 4-11: Enzimatik ve doku eksplantı yöntemleri ile ilk hücrelerin gözlenme sürelerinin ortalamaları ve standart sapmalarının grafiksel analizi (* $p > 0,05$).



Şekil 4-12: Enzimatik ve doku eksplantı yöntemleri ile elde edilen primer hücrelerin (P0) invert mikroskop ile çekilen görüntüleri.

A) Enzimatik yöntem, B) Doku eksplantı. GK: Göbek kordonu. (20x)

4.3. Flow Sitometrik Bulgular

IVA-D, PVA-D, SAA-D, IVA-E, PVA-E ve SAA-E gruplarında, izole edilen iGK-MKH'lerinde, CD34, CD45 hematopoetik kök hücre yüzey belirteçlerinin ve CD44, CD90 mezenkimal kök hücre belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri farklı pasajlarda (P3, P5, P7) flow sitometrik yöntemle belirlendi. Belirlenen yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri, nokta alan (dot blot) grafikleri (Şekil 4-13, Şekil 4-14 ve Şekil 4-15), sayısal olarak (Tablo 4-4) ve karşılaştırmalı grafikler (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**, Şekil 4-17, Şekil 4-18, Şekil 4-19, Şekil 4-20, Şekil 4-21, Şekil 4-22, Şekil 4-23 ve Şekil 4-24) ile gösterilmiştir.

Tablo 4-4: iGK-MKH'lerinin CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyonlarının flow sitometrik analizleri

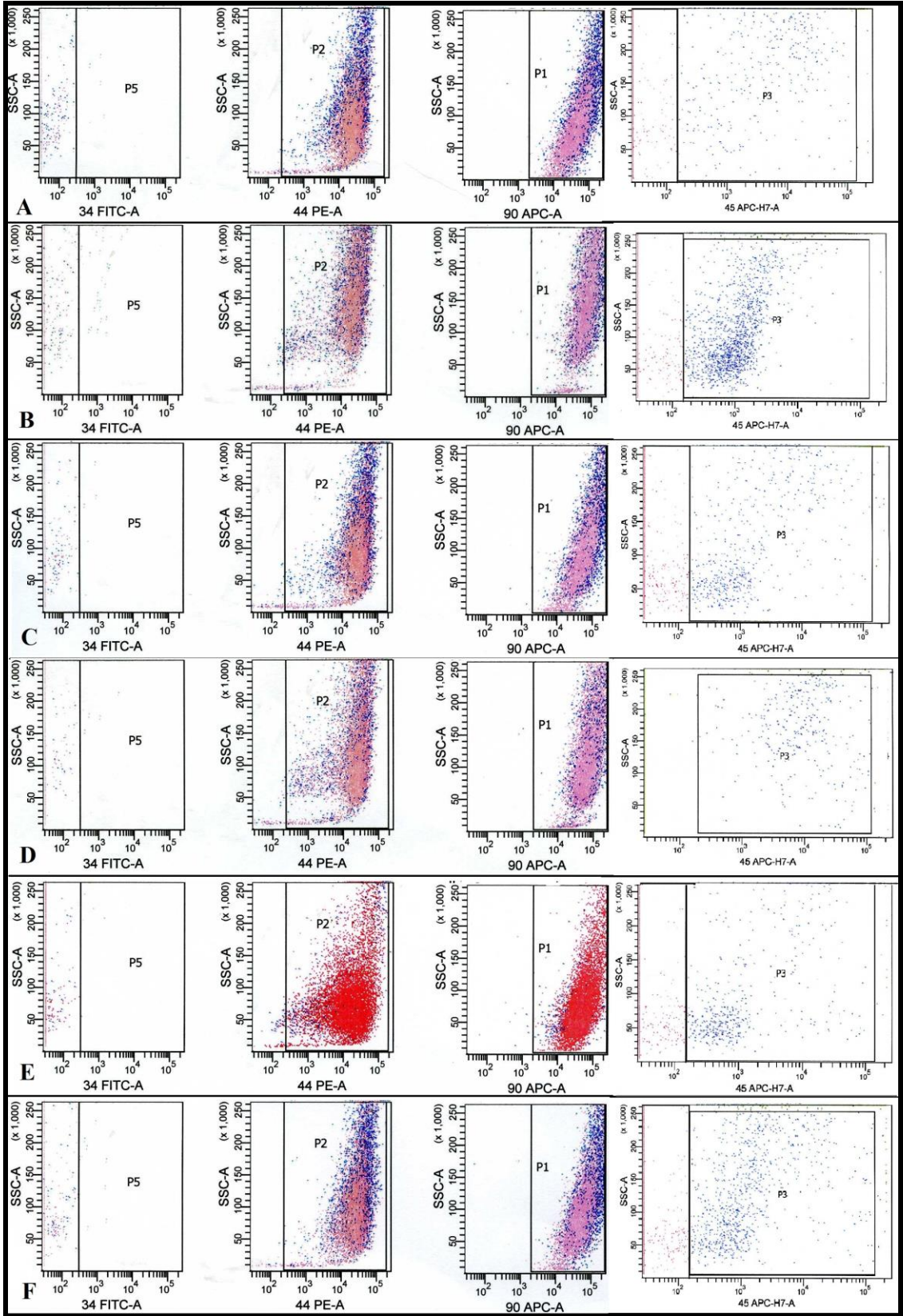
	CD34 %	CD45 %	CD44 %	CD90 %
IVA-E-P3	0,79***	10,23**	99,5***	97,23***
IVA-D-P3	1,85***	10,67**	98,05***	97,4***
PVA-E-P3	1,4***	7,10**	98,15***	98,23***
PVA-D-P3	1,7***	12,30**	97,0***	96,88***
SAA-E-P3	1,1***	20,47**	97,1***	99,63***
SAA-D-P3	0,98***	11,93**	98,73***	99,83***
IVA-E-P5	1,43**	11,47**	97,4**	99,67**
IVA-D-P5	1,25*	14,65*	97,6*	99,8*
PVA-E-P5	1,47**	13,97**	97,3**	99,7**
PVA-D-P5	3,25*	18,2*	93,5*	96,7*
SAA-E-P5	6,93*	15,25*	96,73*	99,67*
SAA-D-P5	2,80*	20,3*	91,95*	99,85*
IVA-E-P7	2,15*	11,8*	99,7*	99,8*
IVA-D-P7	0,1*	4,2*	99,85*	99,9*
PVA-E-P7	0,6*	4,6*	99,8*	99,9*
PVA-D-P7	2,3*	3,5*	99,8*	99,8*
SAA-E-P7	0,35*	2,45*	99,65*	99,85*
SAA-D-P7	3,35*	2,3*	99,75*	98,95*

*** 4 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

** 3 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

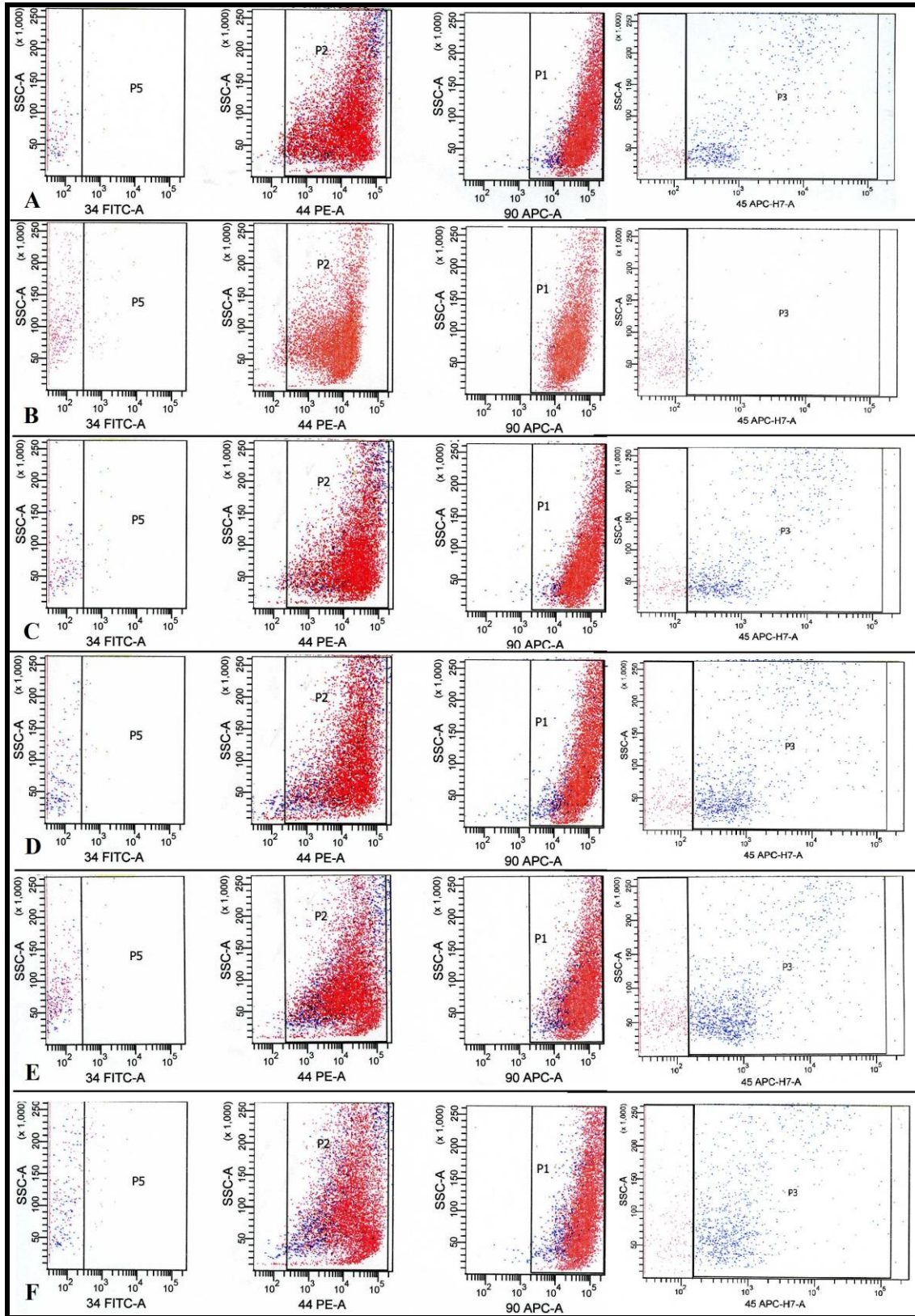
* 2 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

İzole edilen iGK-MKH'leri gruplarının her bir belirteç için farklı pasajlardaki [3. pasaj (Şekil 4-13), 5. pasaj (Şekil 4-14) ve 7. pasaj (Şekil 4-15)] flow sitometrik analizlerinin representatif nokta alan (dot blot) grafikleri ile gösterimi.



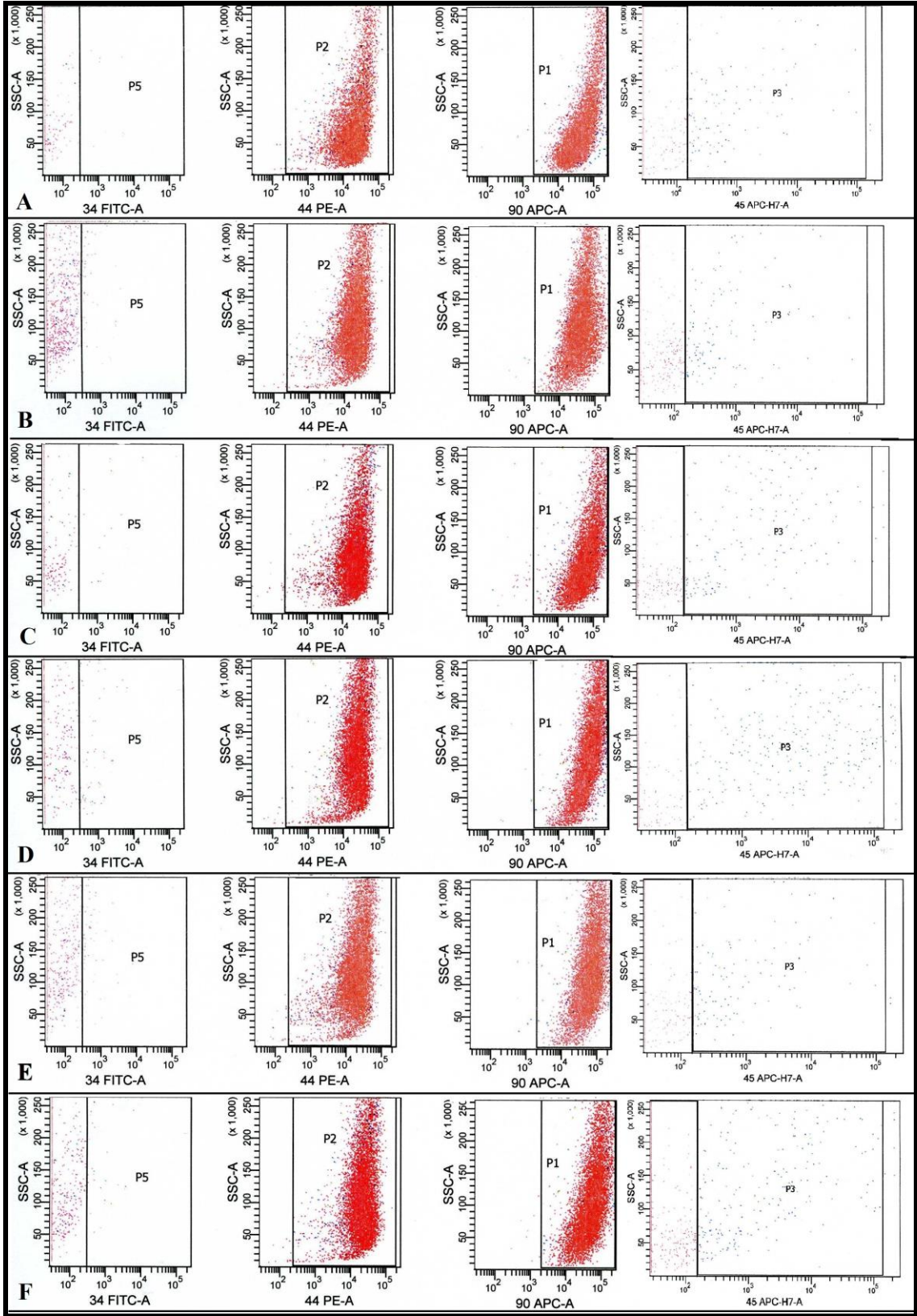
Şekil 4-13: Farklı iGK-MKH'leri gruplarının 3. pasajında yapılan flow analizlerinin nokta alan (dot blot) grafikleri.

A) IVA-D-P3, B) IVA-E-P3, C) PVA-D-P3, D) PVA-E-P3, E) SAA-D-P3, F) SAA-E-P3.



Şekil 4-14: Farklı iGK-MKH'leri gruplarının 5. pasajında yapılan flow analizlerinin nokta alan (dot blot) grafikleri.

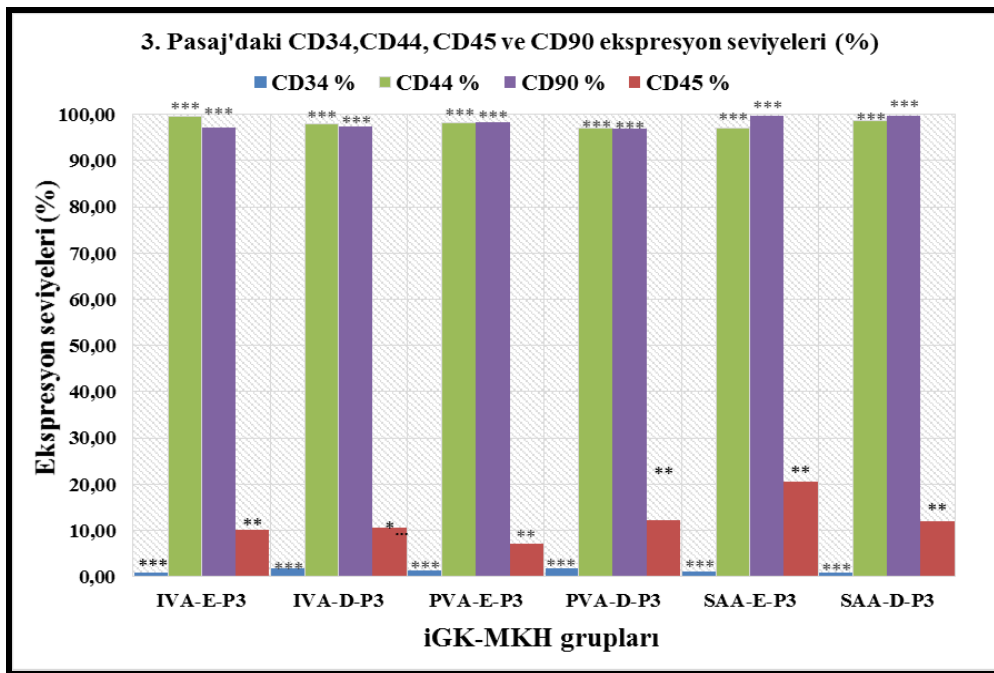
A) IVA-D-P5, B) IVA-E-P5, C) PVA-D-P5, D) PVA-E-P5, E) SAA-D-P5, F) SAA-E-P5.



Şekil 4-15: Farklı iGK-MKH'leri gruplarının 7. pasajında yapılan flow analizlerinin nokta alan (dot blot) grafikleri.

A) IVA-D-P7, B) IVA-E-P7, C) PVA-D-P7, D) PVA-E-P7, E) SAA-D-P7, F) SAA-E-P7.

İzole edilen farklı iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyonları, 3.P (Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.) 5.P (Şekil 4-17) ve 7.P'larda (Şekil 4-18) kendi arasında karşılaştırılmıştır. Görüleceği üzere CD34, CD44 ve CD90 ekspresyonları arasında belirgin bir fark olmayıp, CD34 ekspresyon seviyesi genel olarak % 3'ün altında, CD44 ve CD90 ekspresyon seviyesi ise genel olarak %97'nin üzerindedir. Diğer taraftan CD45 ekspresyon seviyeleri, gruplar ve pasajlar arasında değişkenlik göstermektedir.

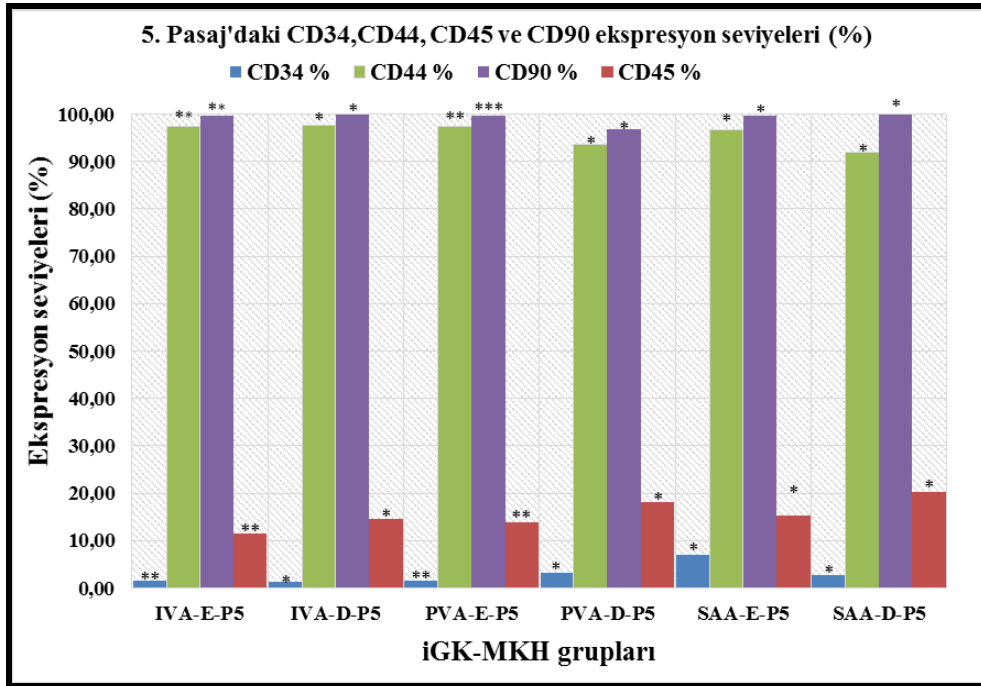


Şekil 4-16: 3. Pasajdaki farklı iGK-MKH gruplarının CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyeleri.

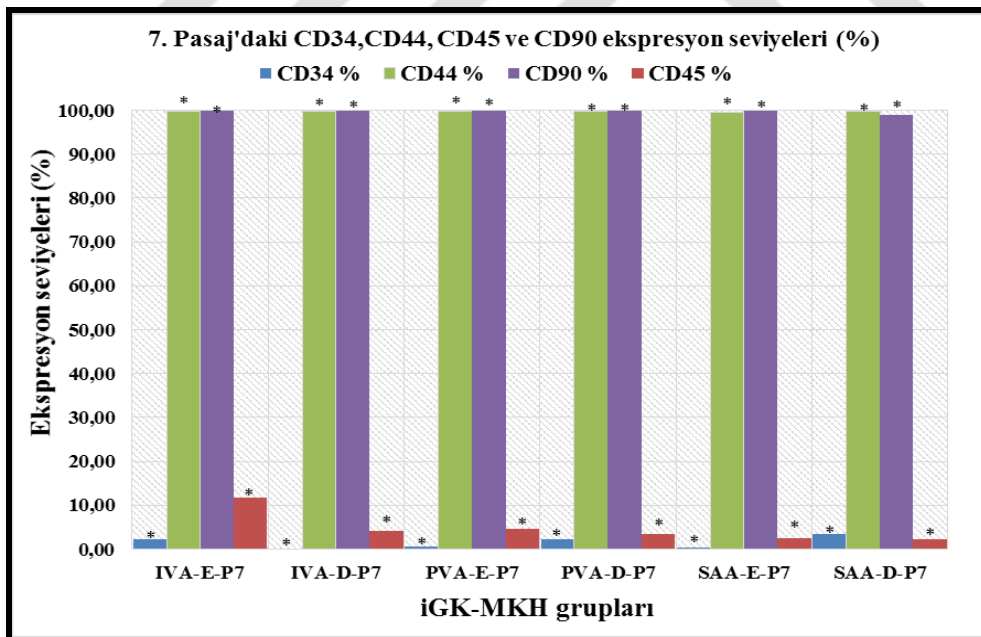
*** 4 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

** 3 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

* 2 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.



Şekil 4-17: 5. Pasajdaki farklı iGK-MKH gruplarının CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyeleri.



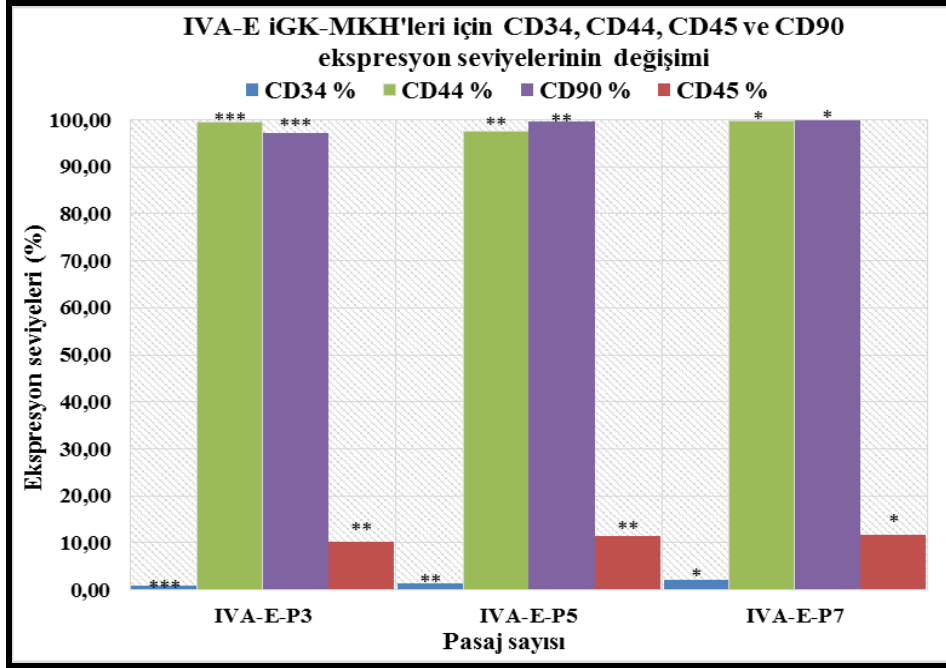
Şekil 4-18: 7. Pasajdaki farklı iGK-MKH gruplarının CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyeleri.

*** 4 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

** 3 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

* 2 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

İzole edilen her bir iGK-MKH grubunun [IVA-E (Şekil 4-19), IVA-D (Şekil 4-20), PVA-E (Şekil 4-21), PVA-D (Şekil 4-22), SAA-E (Şekil 4-23) ve SAA-D (Şekil 4-24)] CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin, ilerleyen pasajlar (P3-P5-P7) ile birlikte değişiminin grafiksel gösteriminden görüleceği üzere, artan pasaj sayısı ile birlikte belirgin bir fark gözlenmemiştir.

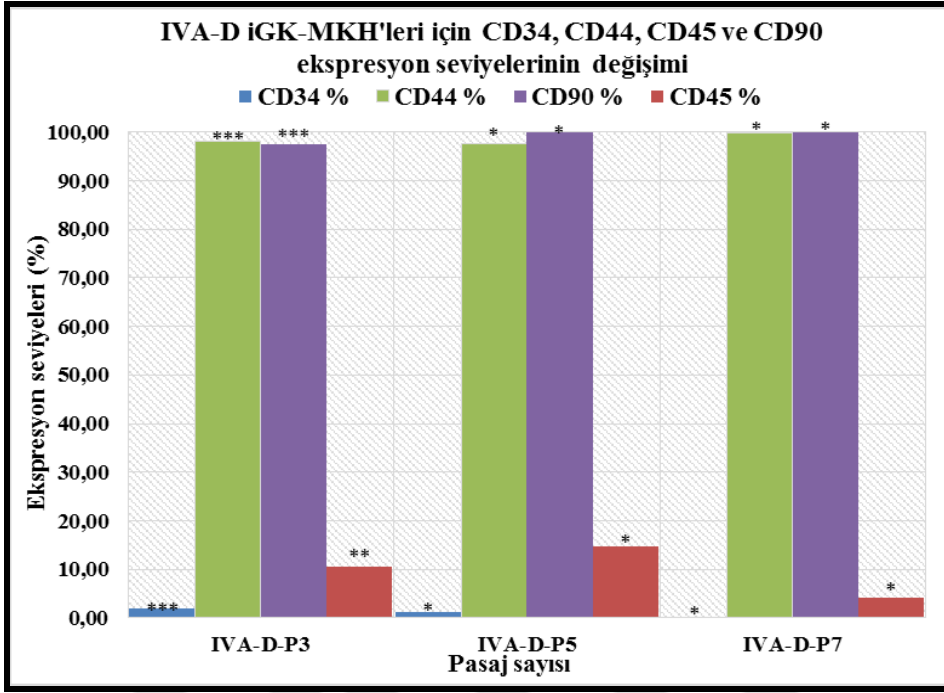


Şekil 4-19: IVA-E grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.

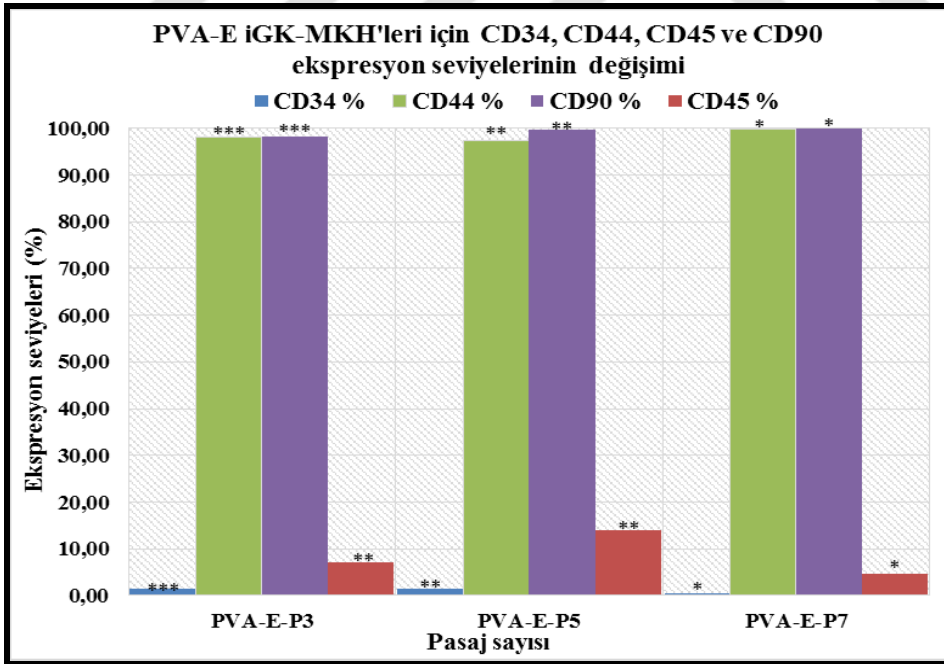
*** 4 farklı örnekten elde edilen analizlerin ortalaması.

** 3 farklı örnekten elde edilen analizlerin ortalaması.

* 2 farklı örnekten elde edilen analizlerin ortalaması.



şekil 4-20: IVA-D grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.

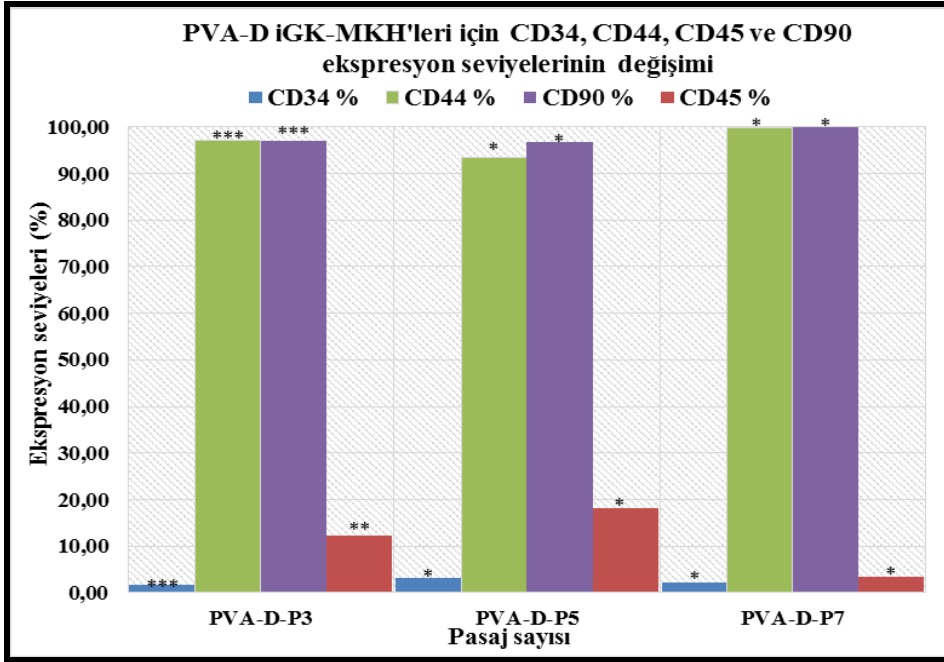


şekil 4-21: PVA-E grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.

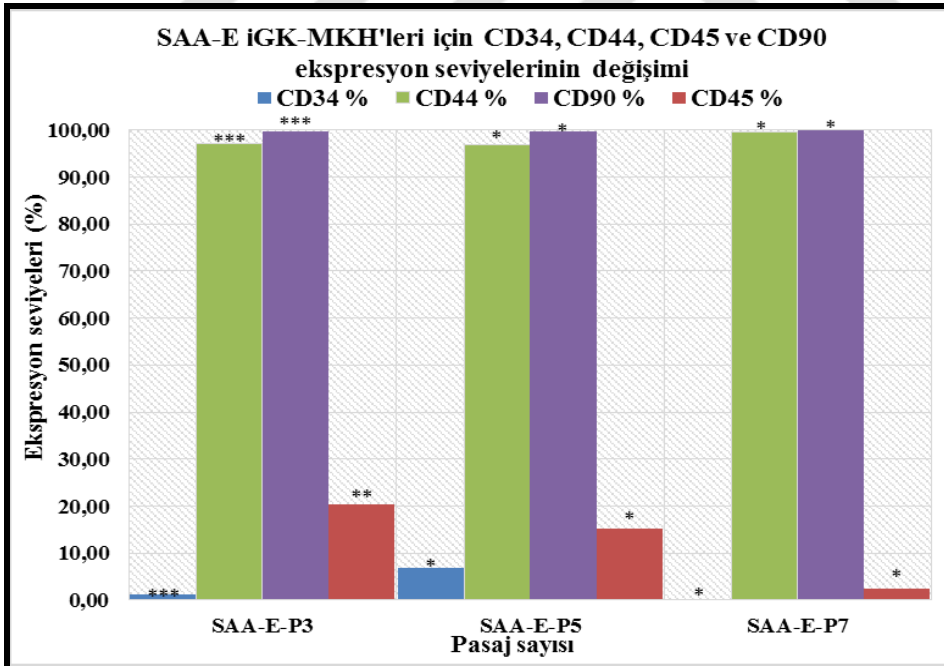
*** 4 farklı örnekten elde edilen analiznin ortalaması.

** 3 farklı örnekten elde edilen analiznin ortalaması.

* 2 farklı örnekten elde edilen analiznin ortalaması.



şekil 4-22: PVA-D grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.

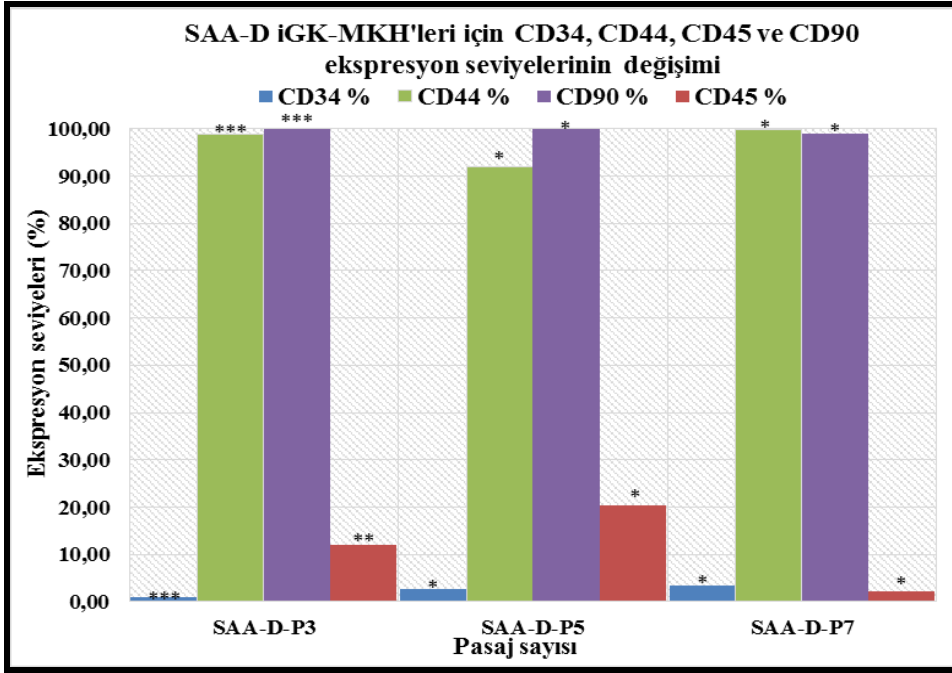


şekil 4-23: SAA-E grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.

*** 4 farklı örnekten elde edilen analiznin ortalaması.

** 3 farklı örnekten elde edilen analiznin ortalaması.

* 2 farklı örnekten elde edilen analiznin ortalaması.



şekil 4-24: SAA-D grubu iGK-MKH'lerindeki CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyelerinin P3, P5 ve P7 pasajlarında değişimleri.

*** 4 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

** 3 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

* 2 farklı örnekten elde edilen analizin ortalaması.

4.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları

İzole edilen iGK-MKH'leri gruplarından, IVA, PVA ve SAA alanlardan izole edilen iGK-MKH'lerinin 3. ve 5. pasajlarındaki ultrastrüktürel morfolojileri genel olarak değerlendirildiğinde; lobüler yapıdaki nukleusun ökromatik karakterde olup bir ya da iki nukleolus içerdiği, derin invajinasyonlar yapan nukleus membranının altında aralıklı yerleşim gösteren ince heterokromatik materyal ayırt edildi. Ayrıca, her hücrede farklı boylarda ve yoğunluklarda mikrovillus benzeri uzantılar (MU) ve filopodyum uzantıları (FU), oval ya da uzun morfolojide mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum (GER) yapıları izlendi (Şekil 4-25).

Diğer taraftan, bazı iGK-MKH'leri grupları ve pasajları arasında, değişen sayılarda, otofajik ve endositotik vezikül (OEV) yapıları, vakuol yapıları (VY), glikojen granülleri (GG), genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gGER) yapıları, mikrovillus benzeri yapılar içeren intrasitoplazmik luminal alanlar (MISL) ve lipit damlacıkları (LD) ayırt edilmiştir. Bu yapıların miktarları, semi-kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4-5).

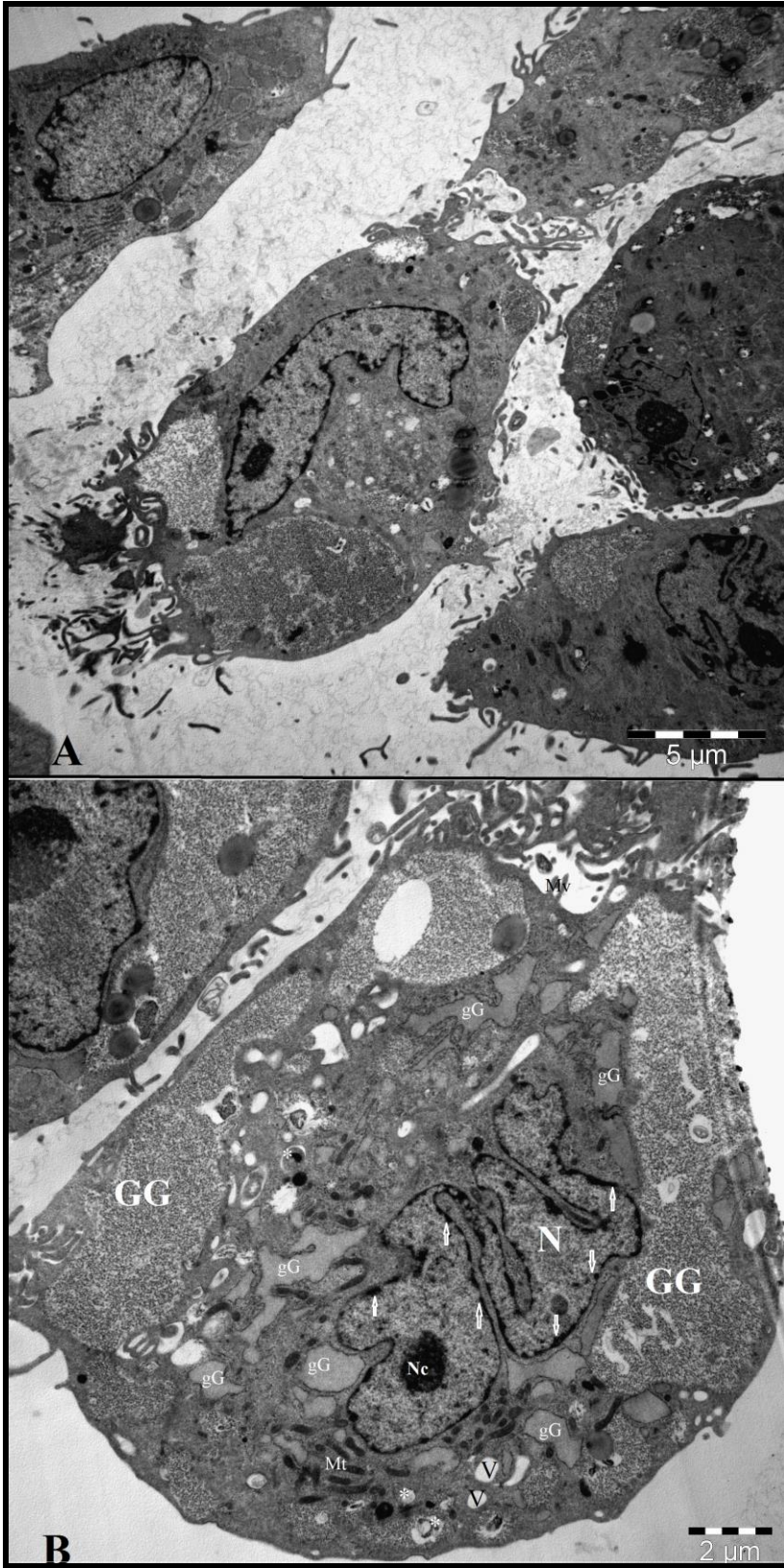
Tablo 4-5: İzole edilen iGK-MKH'lerinde ayırt edilen yapıların miktarlarının semi-kantitatif olarak değerlendirilmesi.

	MU	FU	OEV	GG	MISL	LD	VY	gGER
IVA-3	+	-	+	++	++	+	++	+++
PVA-3	++	+	+++	++	-	+	++	+
SAA-3	+	+	++	+	-	-	++	++
IVA-5	+	+	+	++	-	+	+	++
PVA-5	+	+	++	+	-	+	+	++
SAA-5	+	+	++	++	-	+	+	+

+++ Çok yoğun

++ Orta yoğun

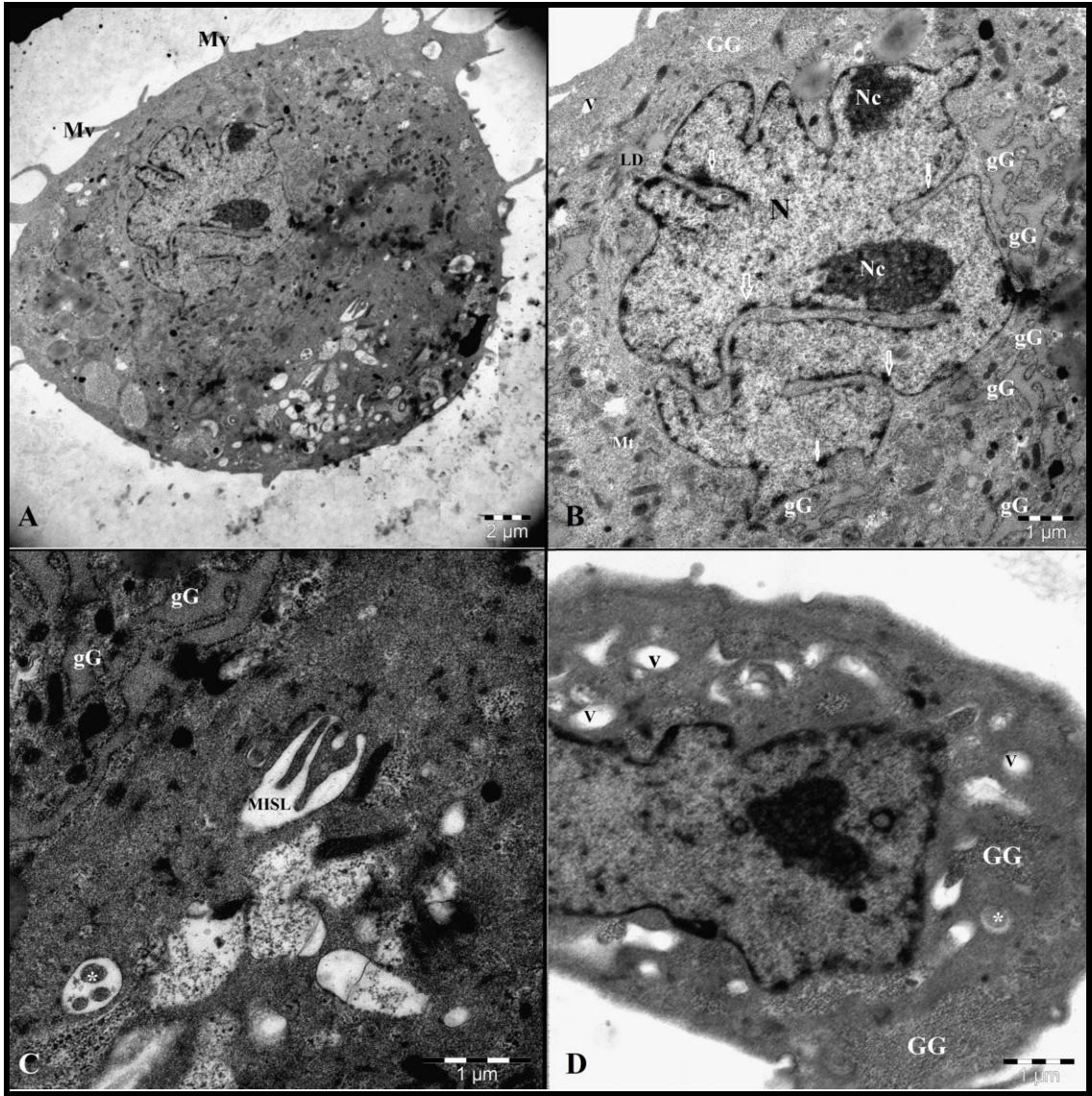
+ Az yoğun



Şekil 4-25: İzole edilen iGK-MKH'lerinin genel morfolojisi.

A) Genel görünüm, 5000x, B) iGK-MKH'lerinde ayırt edilen ortak yapılar; önkromatik nükleus (N), nükleolus (Nc), membran altı heterokromatik materyal (oklar) genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gG), mitokondriyon (Mt), mikrovillus benzeri uzantı (Mv), vakuol (V), otofajik ve endositotik veziküller (*) ve glikojen granülleri (GG) 7500x.

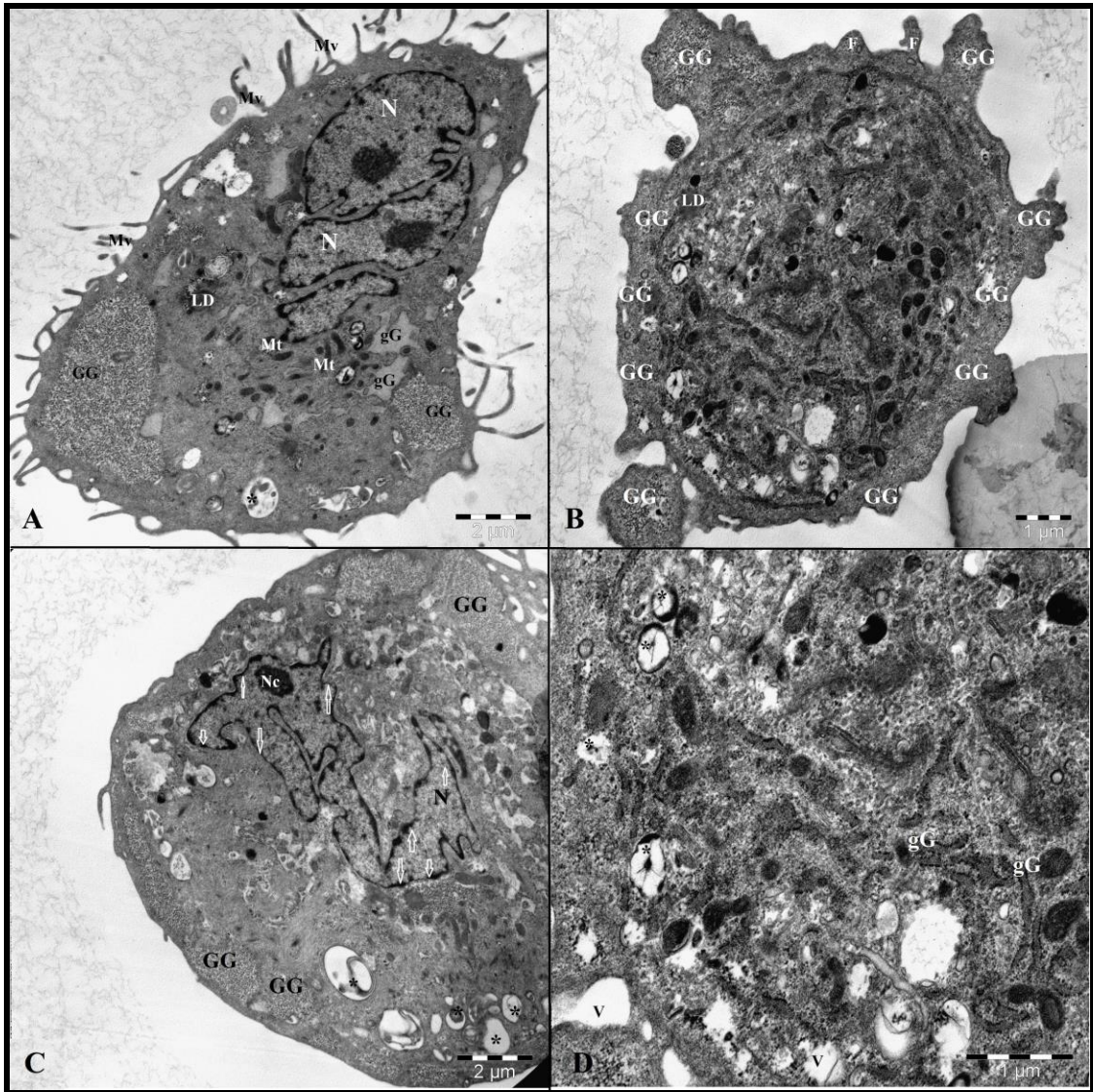
IVA'dan izole MKH'lerin 3. pasaj ultrastrüktürel morfolojisi incelendiğinde, yukarıda belirtilen genel özelliklerin yanında, mikrovillus benzeri yapılar içeren intrasitoplazmik luminal alanlar, çok sayıda genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum yapıları, orta seviyede glikojen granülleri ve lipit damlacıkları, az sayıda mikrovillus benzeri uzantılar ve otofajik ve endositotik veziküller, çok az sayıda filopodyum uzantıları gözlenmiştir (Tablo 4-5, Şekil 4-26).



Şekil 4-26: 3. Pasaj IVA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.

Ökromatik nükleus (N), nükleolus (Nc), membran altı heterokromatik materyal (oklar), genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gG), mitokondriyon (Mt), mikrovillus benzeri uzantı (Mv), vakuol yapıları (V), otofajik ve endositotik veziküller (*), mikrovillus benzeri yapılar içeren intrasitoplazmik luminal alanlar (MISL), lipit damlacıkları (LD) ve glikojen granülleri (GG). A) Genel görünüm, 5000x, B) 15000x, C) 30000x, D) 20000x.

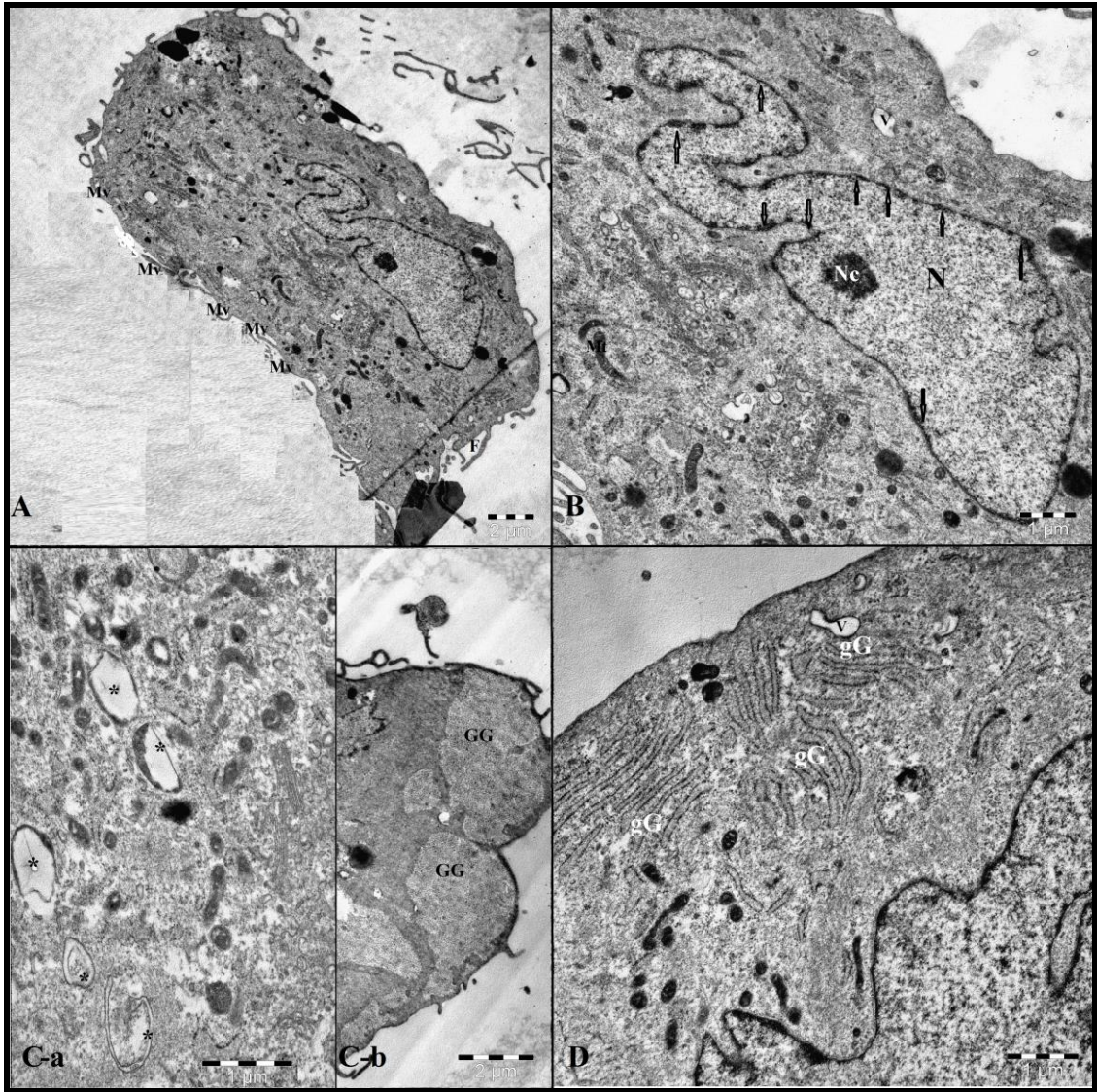
PVA'dan izole MKH'lerin 3.pasaj ultrastrüktürel morfolojisi incelendiğinde, yukarıda belirtilen genel özelliklerin yanında, çok sayıda otofajik ve endositotik veziküller, orta seviyede glikojen granülleri ve mikrovillus benzeri uzantılar, az sayıda genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum yapıları, lipit damlacığı, vakuol yapıları ve filopodyum uzantıları ayırt edilmiştir. Mikrovillus benzeri yapılar içeren intrasitoplazmik luminal alan izlenmemiştir. Ayrıca bu grupta otofajik ve endositotik veziküllerin lizozomlar ile birleştikleri evreye (Şekil-27-D) ait yapılar daha belirgin olarak gözlenmiştir (Tablo 4-5, Şekil 4-27).



Şekil 4-27: 3. Pasaj PVA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.

Ökromatik nükleus (N), nükleolus (Nc), membran altı heterokromatik materyal (oklar) genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gG), mitokondriyon (Mt), mikrovillus benzeri uzantı (Mv), vakuol yapıları (V), otofajik ve endositotik veziküller (*), lipit damlacıkları (LD), filopodyum (F) glikojen granülleri (GG). A) Genel görünüm, 10000x, B) 15000x, C) 10000x, D) 30000x.

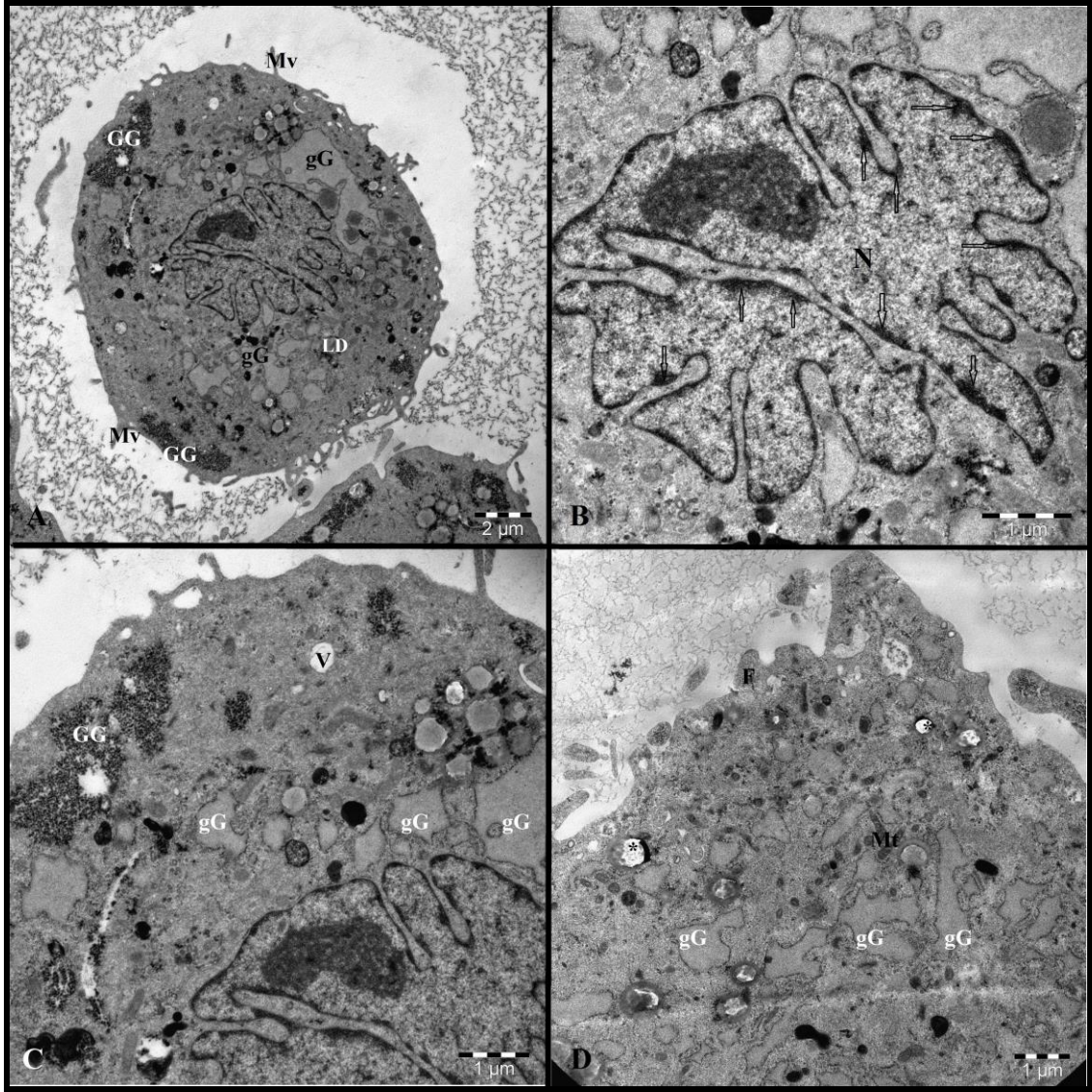
SAA'dan izole MKH'lerin 3. pasaj ultrastrüktürel morfolojisi incelendiğinde, daha önce belirtilen genel özelliklerin yanında, orta seviyede vakuol yapıları, otofajik ve endositotik veziküller ve genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum, az sayıda mikrovillus benzeri uzantılar, filopodyum uzantıları ve glikojen granülleri ayırt edilmiştir. Mikrovillus benzeri yapılar içeren intrasitoplazmik luminal alanlar ve lipid damlacıkları izlenmemiştir (Tablo 4-5, Şekil 4-28).



Şekil 4-28: 3. Pasaj SAA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.

Ökromatik nükleus (N), nükleolus (Nc), membran altı heterokromatik materyal (oklar) genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gG), mitokondriyon (Mt), mikrovillus benzeri uzantı (Mv), filopodyum (F), vakuol yapıları (V), otofajik ve endositotik veziküller (*) ve glikojen granülleri (GG). A) Genel görünüm, 6000x, B) 15000x, C-a) 25000x C-b) 10000x, D) 20000x.

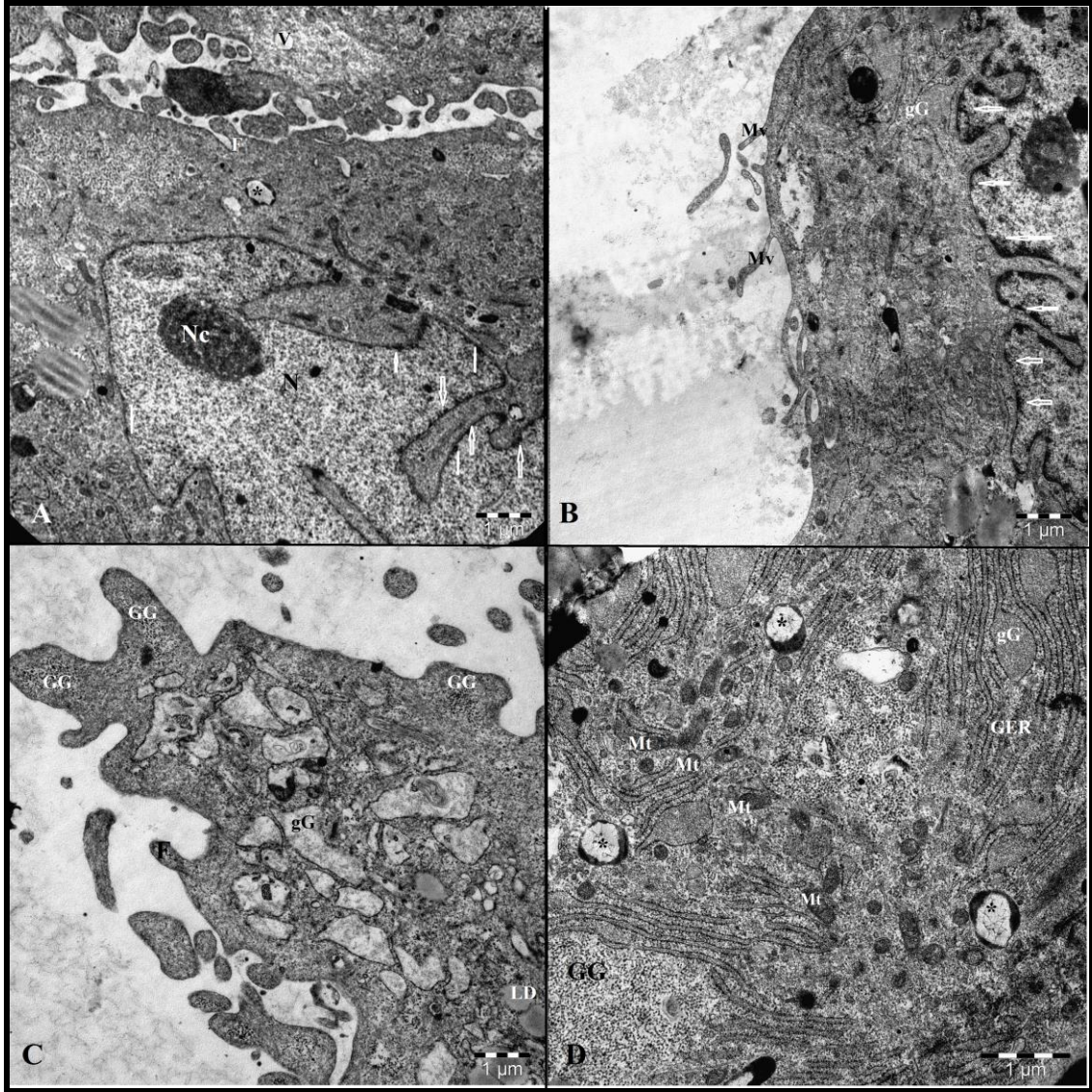
IVA'dan izole MKH'lerin 5. pasaj ultrastrüktürel morfolojisi incelendiğinde, yukarıda belirtilen genel özelliklerin yanında, orta seviyede genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum yapısı, glikojen granülleri ve vakuol yapıları, az miktarda mikrovillus benzeri uzantılar, filopodyum uzantıları, otofajik ve endositotik veziküller ve lipit damlacıkları ayırt edilmiştir (Tablo 4-5, Şekil 4-29).



Şekil 4-29: 5. Pasaj IVA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.

Ökromatik nukleus (N), nukleolus (Nc), membran altı heterokromatik materyal (oklar) genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gG), mitokondriyon (Mt), mikrovillus benzeri uzantı (Mv), filopodyum (F), vakuol yapıları (V), otofajik ve endositotik veziküller (*), lipit damlacıkları (LD) ve glikojen granülleri (GG). A) Genel görünüm, 75000x, B) 25000x, C) 20000x, D) 15000x.

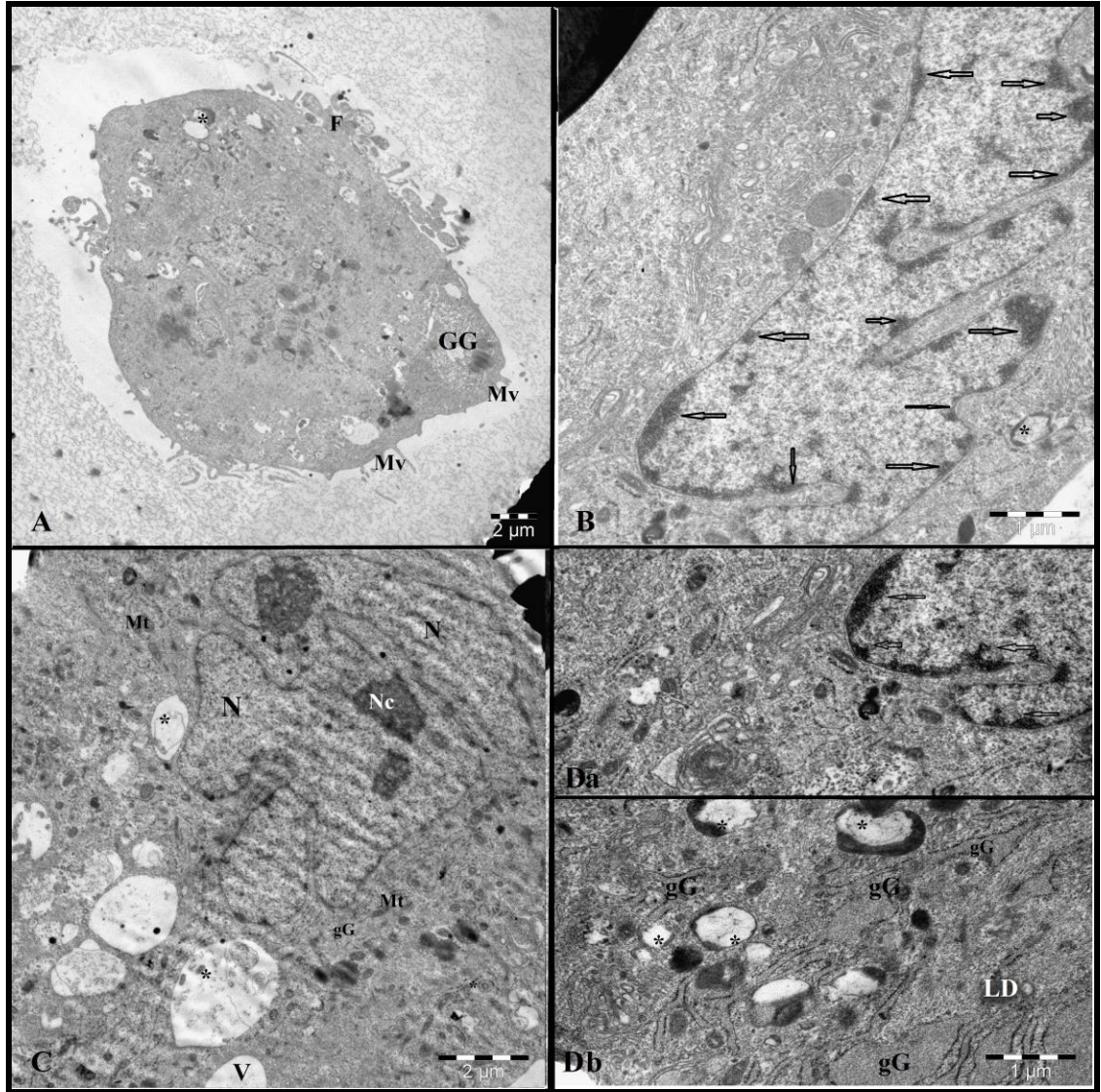
PVA'dan izole MKH'lerin 5. pasaj ultrastrüktürel morfolojisi incelendiğinde, yukarıda belirtilen genel özelliklerin yanında, orta seviyede genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum yapısı, otofajik ve endositotik veziküller ve vakuol yapıları, az miktarda mikrovillus benzeri uzantılar, filopodyum uzantıları, glikojen granülleri ve lipit damlacıkları ayırt edilmiştir (Tablo 4-5, Şekil 4-30).



Şekil 4-30: 5. Pasaj PVA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.

Ökromatik nukleus (N), nukleolus (Nc), membran altı heterokromatik materyal (oklar) genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gG), mitokondriyon (Mt), mikrovillus (Mv), filopodyum (F), vakuol yapıları (V), otofajik ve endositotik veziküller (*), lipit damlacıkları (LD) ve glikojen granülleri (GG). A) Genel görünüm, 15000x, B) 15000x, C) 15000x, D) 25000x.

SAA'dan izole MKH'lerin 5. pasaj ultrastrüktürel morfolojisi incelendiğinde, yukarıda belirtilen genel özelliklerin yanında, orta seviyede glikojen granülleri ve otofajik ve endositotik veziküller, az miktarda mikrovillus benzeri uzantılar, filopodyum uzantıları, genişlemiş GER yapısı, lipid damlacıkları ve vakuol yapıları izlenmiştir (Tablo 4-5, Şekil 4-31).



Şekil 4-31: 5. Pasaj SAA-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi.

Ökromatik nukleus (N), nukleolus (Nc), membran altı heterokromatik materyal (oklar) genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gG), mitokondriyon (Mt), mikrovillus benzeri uzantı (Mv), filopodyum (F), vakuol yapıları (V), otofajik ve endositotik veziküller (*), lipid damlacıkları (LD) ve glikojen granülleri (GG). A) Genel görünüm, 6000x, B) 25000x, C) 12000x, Da) 25000x Db) 25000x.

5. TARTIŞMA

GK diğer MKH kaynakları ile karşılaştırıldığında, izole edilen MKH'lerinin yüksek proliferasyon ve farklılaşma kabiliyeti, GK'nun atılan biyolojik bir doku olması ve invaziv yöntem gerektirmemesi gibi özellikleriyle oldukça avantajlı bir kaynaktır (Baksh ve ark. 2007; Venugopal ve ark. 2011). Bu çalışmada iGK'nun üç farklı bölgesinden, -PVA, IVA ve SAA- iki farklı yöntem kullanılarak –enzimatik (E) ve doku eksplantı (D)- izole edilen hücrelerin karşılaştırmalı karakterizasyonu ile GK'nun MKH kaynağı bakımından en uygun bölgesinin ve izolasyon yönteminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, flow sitometrik analiz, ışık ve elektron mikroskopik inceleme ve proliferasyon değerlendirmelerinden faydalanılmıştır.

İzole edilen hücrelerin hematoksilin ve eozin (H+E) ile boyanması sonrasında çekilen fotoğraflarda görüleceği üzere, genel itibariyle üç farklı hücre tipi karakterize edilmiştir, bunlar aktif fibroblast benzeri (yıldızsı –stellat- hücre morfolojisi), fuziform (iğsi) şekilli ve oval (yuvarlak) hücre morfolojileridir. İzole edilen iGK-MKH'lerinin erken dönemdeki (P1, P2 ve P3) morfolojisi fibroblast benzeri hücre morfolojisi olup MKH'lerinin tanımlayıcı karakteristiklerinin birisi olan plastik flask üzerine adezyon kabiliyeti göstermektedirler. Geç dönemde ise hücrelerin genel itibariyle fuziform morfoloji kazandıkları gözlenmiştir. Bu durum hücrelerin erken dönemde aktif fibroblast morfolojisi ile uyumlu, geç dönem de ise inaktif fibroblast karakteri ile uyumlu morfolojiye sahip olduğunu göstermektedir (Ravikanth ve ark. 2011).

Prockop ve grubu tarafından yapılan araştırmalarda, Kİ'nden izole edilen MKH'lerinde en az iki farklı hücre morfolojisi – hızlı proliferasyon olan küçük yuvarlak ya da iğsi hücre morfolojisi (RS) ve yavaş proliferasyon olan geniş kübik ya da yassı hücre morfolojisi (FC) tanımlanmıştır. Bu bağlamda, tanımladığımız, dallanmış fibroblast benzeri ve fuziform (iğsi) hücre morfolojileri, Prockop ve grubu tarafından tanımlanan RS-MKH morfolojisi ile oval-yuvarlak hücre morfolojisi ise FC-MKH ile oldukça benzerlik göstermektedir (Colter ve ark. 2001; Sekiya ve ark. 2002).

İzole edilen iGK-MKH'leri gruplarında geç dönemlerde bazı hücrelerin çeşitli boyutlarda ve sayıda sitoplazmik uzantılara sahip olduğu gözlenmiştir. Bu sitoplazmik uzantıların düşük yoğunlukta hücreler arası etkileşimde rolü olduğu düşünülmektedir.

Hendijani ve ark. tarafından yapılan araştırmada, doku eksplanti yöntemi ile Wharton jelinden ve tüm GK'ndan izole edilen MKH'lerin düşük yoğunlukta, sitoplazmik uzantılar yaptıkları gözlemlenirken, yüksek yoğunlukta ise birbirlerine paralel uzanacak şekilde düzenlendikleri gözlenmiştir (Hendijani ve ark. 2014).

Hücrelerin %90 gibi yüksek yoğunluğa erişmesini takiben sayılması sonrasında, hücre sayısının ilerleyen pasajlarda, ilk pasajlara göre oldukça düşük olduğu gözlenmiştir; bu durum hücrelerin boyutlarının artması ile ilişkilendirilebilir. Mediana ve ark. tarafından yapılan araştırmada, iGK-MKH'lerinin boyutlarındaki artış, hücrelerin yaşlanmaya (B-galaktosidaz ile pozitif reaksiyon vermesi) başlamasıyla ilişkilendirilmiştir (Mediana ve ark. 2015). Bu değişiklikler 10. ve 17. pasajlar arasında tanımlanmıştır. Ancak çalışmamızda, 1. ve 7. pasajlar, erken (1-3. pasajlar) ve geç (4-7.pasajlar) dönemler altında tanımlanmıştır ve ayrıca hücrelerin fuziform (iğsi) hücre morfolojisi kazanması da göz önünde bulundurulduğunda, gözlemlenen boyut artışı yaşlanma ile ilişkilendirilmemiştir.

İzole edilen iGK-MKH'lerinin proliferasyon hızları, iki pasaj arasındaki popülasyon katlanma süresinin (PKS'nin) hesaplanması ile değerlendirilmiştir. Her bir iGK-MKH grubu için PKS'leri ilerleyen pasajlarda inişli çıkışlı bir eğilim göstermekte olup, gruplar arasında belirgin oranda fark görülmemiştir. Ayrıca her bir grubun PKS'leri erken (P1-P2, P2-P3, P3-P4) ve geç (P4-P5, P5-P6, P6-P7) dönemler altında izlendiğinde; PVA-E, IVA-E, IVA-D ve SAA-D gruplarında erken dönem PKS'leri geç dönem PKS'lerinden daha az iken, SAA-E ve PVA-D gruplarında geç dönem PKS'leri erken dönem PKS'lerinden daha az olduğu gözlenmiştir. Mediana ve ark. tarafından yapılan çalışmada da, a-MEM-%10'luk plateletten zengin plazma (PRP) içinde kültürlenen iGK-MKH'leri 17. pasaja kadar takip edilmiştir ve ilerleyen pasajlarla birlikte PKS'lerinin arttığı yani proliferasyon kapasitelerinin azaldığı gözlenmiştir (Mediana ve ark. 2015). Subramanian ve ark. tarafından yapılan çalışmada, Wharton jelinden izole elde edilen MKH'lerin, amniyon membranından, SAA'dan ve PVA'dan izole edilen MKH'lere oranla daha yüksek proliferasyon hızına sahip olduğu gösterilmiştir (Subramanian ve ark. 2015). Bu noktada pasaj sayısının artırılması, proliferasyon hızlarının karşılaştırılmasında daha isabetli sonuç elde edilmesi açısından önemlidir.

Nanaev ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda, amniyotik ve IVA'dan izole edilen MKH'lerin PVA'dan izole edilen MKH'lerden daha immatür hücreler olduğunu ve proliferasyon kabiliyetlerini daha uzun süre koruyabildiklerini ve PVA-MKH'lerinin yüksek oranda farklılaşmış miyofibroblastlardan oluştuğunu ileri sürmüştür (Nanaev ve ark. 1997). Ancak yapmış olduğumuz bu çalışmada; GK'nun üç farklı bölgesinden izole edilen MKH'lerin proliferasyon kabiliyeti açısından belirgin farklılıklarının olmadığı gözlenmiştir.

Hücrelerin proliferasyon hızı, izolasyonunda kullanılan enzim çeşidine, kültür medyumuna, ekim ve pasaj süreleri arasında geçen zamana ve başlangıçta ekilen hücre yoğunluğuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Literatürdeki çalışmalardaki aynı dokudan izole edilen MKH'lerin farklı proliferasyon karakterleri göstermesi bu faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan değişkenliklerdir (Mediana ve ark. 2015). Aynı şekilde bahsi geçen faktörlerden hücrelerin morfolojileri de etkilenmektedir; Fong ve ark. tarafından yapılan çalışmada, iEKH medyumunu içeren ortamda Wharton jelinden izole edilen kök hücrelerin epiteloid hücre morfolojisindeyken, GK-MKH medyumunda içerisinde kısa fibroblast benzeri hücre morfolojisinde olduğu gösterilmiştir (Fong ve ark. 2007).

Enzimatik ve doku eksplantı yöntemlerinde ilk fibroblast benzeri morfolojide hücrelerin gözlenmesi için geçen süreler karşılaştırıldığında; enzimatik yöntemde hücrelerin daha erken gözlendiği tespit edilmiştir ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. Gruplar arasında PKS'lerinin de arasında da belirgin bir fark göstermediği düşünüldüğünde, iGK-MKH'lerinin izolasyonunda doku eksplantı yönteminin kullanılması, hücre membranına zarar verme riski taşıyan enzimatik yöntemden daha avantajlı görülmektedir. Diğer taraftan, Han ve ark.'nın yaptığı çalışmada, enzimatik yöntem (%0,1 kolajenaz IV+tripsin) ile iGK-MKH'lerinin izolasyonu için gerekli zamanın doku eksplantından daha kısa olduğu ancak doku eksplantı ile elde edilen iGK-MKH'lerinin PKS'lerinin daha kısa olduğu gösterilmiştir (Han ve ark. 2013).

Her bir örnek tek tek incelendiğinde, hücrelerin ilk gözlenme süreleri, GK örnekleri arasında farklılık göstermektedir, bu bağlamda gözlemlenen farklılıkların, izolasyon için kullanılan protokolün yanı sıra, kalıtsal farklılıklardan da kaynaklanma olasılığını düşündürmektedir (Paladino ve ark. 2015).

Üçüncü olarak flow sitometrik analiz ile GK'nunun farklı bölgelerinden iki farklı yöntem ile izole edilen iGK-MKH'lerinin CD34, CD44, CD45 ve CD90 yüzey belirteç ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. CD34 HKH belirteci olup hücre adezyonunu engellediği ve hücrelerin yuvarlaklaşmasını ve mikrovillus oluşturmalarını indüklediği gösterilmiştir (Ohnishi ve ark. 2013). İGK-MKH'leri gruplarındaki CD34 ekspresyon seviyeleri, SAA-E-P5 haricinde ilerleyen pasajlar da dahil %3 seviyesinin altında kalmıştır. Bu bulgu izole edilen hücrelerdeki HKH oranının oldukça düşük seviyede olduğunu göstermektedir.

Flow sitometrik analiz ile ekspresyon seviyesine bakılan bir diğer belirteç ise CD45 (tirozin fosfotaz) transmembran proteindir. CD45 de HKH belirtecidir ve lenfosit aktivasyonunu ve proliferasyonunu kontrol etmektedir (Maleki ve ark. 2014). CD45 ekspresyonu gruplar arasında ve pasajlar arasında değişkenlik göstermektedir ve genel olarak %2 ile %21 arasında değişmektedir. CD45 ekspresyonundaki bu yüksek oran, izole edilen MKH'lerin HKH'leri de içerdiğini göstermektedir. Maleki ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, testis biyopsilerinde, ovaryumdan, kıl foliküllerinden ve Wharton jelinden izole edilen MKH'lerinin %8 ile %26 arasında değişen CD45 ekspresyon seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Maleki ve ark. 2014). Ayrıca, Yeh ve ark. tarafından yapılan çalışmada, hematolojik anamolileri olan hastaların kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin ilk pasajlarda CD45 pozitif oldukları, flow sitometrik ve immünohistokimyasal analizler ile gösterilmiş olup, CD45 negatif MKH'lerin morfolojisine ve farklılaşma kabiliyetine sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak ilerleyen pasajlar ile birlikte CD45 pozitifliğin kaybolduğu gözlenmiştir (Yeh ve ark. 2005).

CD90 hücre yüzey glikoproteindir ve insan MKH belirteçlerinden birisidir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi yani sıra hücre motilitesinde rol aldığı gösterilmiştir. CD44 belirteci de MKH'ler tarafından eksprese edilen, hiyalürinat reseptörü olarak da bilinen hücre yüzey proteindir ve hücre adezyonunda, göçünde, proliferasyonunda, apoptozunda ve kök hücre karakterinin korunmasında rol almaktadır (Maleki ve ark. 2014). Çalışma gruplarımızdaki iGK-MKH'lerinde CD44 ve CD90 ekspresyonları, %92 üzerinde olup genellikle %99 seviyesindedir. Bu bulgular izole edilen hücrelerin MKH karakterine sahip olduğunu göstermektedir.

İGK-MKH'lerinin CD34, CD44, CD45 ve CD90 ekspresyon seviyeleri 3. P, 5. P, ve 7. P'larda karşılaştırıldığında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Diğer taraftan, her

iGK-MKH grubunda CD34, CD44 ve CD90 ekspresyon seviyeleri ilerleyen pasajlarda belirgin bir değişim göstermemektedir. Ancak CD45 ekspresyonu her grupta aynı pasajda genel itibariyle yakın seviyede iken 7. pasajdaki gruplarda IVA-E haricinde CD45 ekspresyonunda belirgin bir azalma söz konusudur. Subramanian ve ark. tarafından yapılan çalışmada da insan göbek kordonunun farklı bölgelerinden izole edilen MKH'lerde MKH belirteçleri olan CD29, CD44, CD73, CD90 ve HLA-ABC ve MKH'ler için negatif belirteçler olan CD14, CD19, CD34, CD45, CD117 ekspresyonlarında belirgin bir fark olmadığı gösterilmiştir (Subramanian ve ark. 2015).

Flow sitometrik analiz için hücrelerin hazırlanması esnasında, santrifüj sonrasında pellet halinde elde edilen hücrelerin, üzerlerine antikorların eklenmesi sonrasında, yeniden süspansiyon edilmesi sırasında vortek kullanılmasının pozitif belirteçler için antikor-antijen çözülmesine, negatif belirteçler için ise spesifik olmayan bağlanmalara sebep olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda, flow sitometrik analiz için örnek hazırlanması sırasında, örneklerin vortekslenmeden, nazikçe pipetlenerek süspansiyon edilmesinin daha uygun olduğu görülmüştür.

İzole edilen iGK-MKH'lerinin elektron mikroskopik bulguları genel olarak değerlendirildiğinde her grupta, lobüler yapıya ökromatik karakterdeki nükleus, nükleus membranının altında aralıklı olarak devam eden ince heterokromatik alanlar, bir ya da iki nükleolus ayırt edilmiştir. Ayrıca gruplar arasında değişen miktarlarda, mikrovillus benzeri uzantılar, filopodium uzantıları, genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum (gGER) yapıları ve oval ya da uzun morfolojide mitokondri, otofajik ve endositotik veziküller, glikojen granülleri, lipit damlacıkları, mikrovillus benzeri yapılar içeren intrasitoplazmik luminal alanlar ve vakuol yapıları ayırt edilmiştir.

Hücrelerin genel ultrastrüktürel morfolojileri, klasik kök hücre morfolojisi ile ve Pasquinelli ve ark. tarafından izole edilen ve "altın standart" olarak kabul edilen Kİ-MKH'lerinin ultrastrüktürel morfolojisi ile uyum göstermektedir. Bu bağlamda geniş ökromatik nükleus, belirgin nükleolus, genişlemiş GER yapıları yoğun protein sentezi proliferatif işaret etmektedir. Benzer ultrastrüktürel morfoloji, Ryu ve ark. tarafından yapılan çalışmada, insan adipoz dokusundan izole edilen MKH'lerinde de izlenmiştir (Ryu ve ark. 2013).

SAA-3P ve PVA-3P haricindeki gruplarda orta seviyede özellikle periferel alanlarda yoğunlaşmış glikojen granülleri birikintileri izlenmiştir. Bu noktada Pasquinelli ve ark. yaptığı araştırmada, koryon membranından izole ettikleri MKH'lerinde genişlemiş GER yapılarının azlığına eşlik eden glikojen granüllerinin bolluğu olgunlaşmamış (primitif) MKH karakteri ile ilişkilendirilmiştir (Pasquinelli ve ark. 2007). Bu görüş doğrultusunda, PVA-3P ve SAA-5P gruplarında az sayıda, SAA-3P, IVA-3P ve PVA-5P gruplarında orta seviyede, IVA-3P grubunda çok sayıda genişlemiş GER yapılarının ayırt edilmesi, izole ettiğimiz iGK-MKH'lerin olgunlaşmamış hücrelerden ziyade olgun haldeki MKH'ler olduğunu düşündürmektedir.

Otofajik veziküller, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması ile ilişkilendirilmiştir (Ozen ve ark. 2013). Çalışmamızda otofajik ve endositotik veziküllerin sayıları kıyaslandığında, PVA-3P grubunda çok sayıda, SAA-3P, PVA-5P ve SAA-5P gruplarında orta seviyede ve IVA-3P ve IVA-5P gruplarında az sayıda izlenmiştir.

iGK-MKH grupları mikrovillus benzeri uzantıların sayıları bakımından değerlendirildiğinde, PVA-3P grubu hücrelerinde diğer gruplara kıyasla daha fazla miktarda mikrovillus benzeri uzantılar tespit edilmiştir. Zhu ve ark. yaptıkları çalışmada, insan plasentasından elde edilen MKH'lerinin (iP-MKH'lerinin), iGK-MKH'lerine göre daha çok miktarda mikrovillus benzeri uzantılara sahip olmalarını, iP-MKH'lerinin adezyon kabiliyetlerinin iGK-MKH'lerinden daha fazla olması ile ilişkilendirilmiştir (Zhu ve ark. 2013). Bu bağlamda, mikrovillusların çok sayıda olduğu PVA-3P hücrelerinin adezyon kabiliyetlerinin daha fazla olduğu düşünülebilir.

Filopodyum uzantılarının sayıları karşılaştırıldığında ise, IVA-3P harindeki her grupta yakın sayıda filopodyum uzantıları ayırt edilmiştir. Mikrovillus benzeri uzantılarda olduğu gibi, FU'ları da hücrelerin adezyon ve ayrıca migrasyon kabiliyeti ile ilişkilendirilmiştir (Mantovani ve ark. 2012).

Bütün gruplarda az sayıda lipit damlacıkları (özellikle SAA 3P hücrelerinde çok az miktarda) ayırt edilmiştir. Mantovani ve ark. tarafından yapılan araştırmada, yaşlı sıçanların adipoz dokusundan izole edilen MKH'lerin genç olanlardakine kıyasla daha fazla miktarda lipit damlacıkları içerdikleri gösterilmiştir. Bu bağlamda az miktardaki

lipit damlacıklarının varlığı elde edilen iGK-MKH'lerinin olgunlaşmamış hücreler olduğunu işaret etmektedir (Mantovani ve ark. 2012).

Varga ve ark. tarafından yapılan çalışmada, insan adipoz dokusundan izole edilen MKH'lerin erken (10. pasaj öncesi) ve geç (30. pasaj sonrası) dönem ultrastrüktürel morfolojileri değerlendirilmiştir. Erken dönemde, yüksek protein sentezi aktivitesini gösteren ultrastrüktürel morfoloji ile ilgili olarak geniş polimorfik ökromatik nukleusta derin invajinasyonlar, nukleus zarına yakın konumlanmış iyi gelişmiş GER, Golgi sisternaları, çok sayıda lipit damlacıkları ve elektron yoğun lameller bodiler (miyelin figür benzeri) ayırt edilmiştir. Diğer taraftan, geç dönemde adipoz dokusu MKH'lerinde çok sayıda, büyüklükleri 1µm kadar çıkan, miyelin figür benzeri lameller elektron yoğun cisimler neredeyse tüm sitoplazmaya yayıldığı ve hücre membranından uzanan çok sayıda dallanmış filopodyum benzeri yapı ayırt edilmiştir (Varga ve ark. 2015). Bu bağlamda izole ettiğimiz tüm iGK-MKH'lerinde çok nadir miyelin figür benzeri cisim izlenmiştir, bu durum elde edilen iGK-MKH'lerin yaşlanma sürecine girmediğini göstermektedir.

İzole edilen iGK-MKH'leri gruplarının ultrastrüktürel analizleri, PVA-3P hücrelerinin otofajik ve endositotik vezikül sayıları ve IVA-3P hücrelerinin genişlemiş GER yapılarının sayıları bakımından diğer gruplarından ayrılması haricinde, bu hücrelerin genel olarak benzer morfolojilere sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, ışık ve elektron mikroskopik incelemeler, proliferasyon hızlarının değerlendirilmesi ve flow sitometrik analizler, GK'nun tamamının total olarak kullanılmasının, spesifik bir bölgeden izolasyona göre, zaman ve sarf edilen efor bakımından daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan, izolasyon sırasında intervasküler ve perivasküler alanların aynı şekilde intervasküler ve subamniyotik alanların birbiri ile çapraz kontaminasyonu, elde edilen hücrelerin belirli bir alana özgü olmasına dolayısı ile eğer aralarında belirgin bir karakteristik fark var ise bunun ortaya çıkmasına engel olabilir. Bu bağlamda, bu bölgelerin daha kesin ve belirgin olarak ayrıştırılması sağlayacak tekniğin geliştirilmesi bölgelerden izole edilen MKH'lerin karşılaştırmalarının daha isabetli yapılabilmesini sağlayabilir. Ayrıca enzimatik ve doku eksplantı yöntemleri ile izole edilen iGK-MKH'lerinin kendi aralarındaki karşılaştırmalı analizleri de, iki yöntem arasında belirgin bir fark olmadığını göstermiştir. Bu noktada enzimatik yöntemde kullanılan enzimlerin hücre membranına ve ilişkili yüzey

proteinlerine vereceği muhtemel hasar göz önünde bulundurulduğunda, doku parçalarının kültür tabağına eklenen medyum ile kalkmasını engelleyecek uygun bir teknik geliştirildiğinde, doku eksplantı yönteminin daha pratik bir yöntem olduğunu söylenebiliriz.



KAYNAKLAR

Ayuzawa, R., Doi, C., Rachakatla, R. S., Pyle, M. M., Maurya, D. K., Troyer, D. ve Tamura, M. (2009). Naive human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett*, **280(1)**, 31-37.

Baghaban Eslaminejad, M. ve Malakooty Poor, E. (2014). Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World J Stem Cells*, **6(3)**, 344-354.

Baksh, D., Yao, R. ve Tuan, R. S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, **25(6)**, 1384-1392.

Bissell, M. J. ve Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, **1(1)**, 46-54.

Blum, B. ve Benvenisty, N. (2008). The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res*, **100**, 133-158.

Burra, P., Arcidiacono, D., Bizzaro, D., Chioato, T., Di Liddo, R., Banerjee, A. ve ark. (2012). Systemic administration of a novel human umbilical cord mesenchymal stem cells population accelerates the resolution of acute liver injury. *BMC Gastroenterol*, **12**, 88.

Can, A. ve Balci, D. (2011). Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, **698**, 51-62.

Can, A. ve Karahuseyinoglu, S. (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*, **25(11)**, 2886-2895.

Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, **9(5)**, 641-650.

Colter, D. C., Sekiya, I. ve Prockop, D. J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98(14)**, 7841-7845.

Conconi, M. T., Di Liddo, R., Tommasini, M., Calore, C. ve Parnigotto, P. P. (2011). Phenotype and differentiation potential of stromal populations obtained from

various zones of human umbilical cord: An overview. *The Open Tissue Eng Regen Med J*, **4**, 6-20.

Deans, R. J. ve Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, **28(8)**, 875-884.

Di Naro, E., Ghezzi, F., Raio, L., Franchi, M. ve D'Addario, V. (2001). Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *European Journal of Obstetrics ve Gynecology and Reproductive Biology*, **96(2)**, 150-157.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P. ve ark. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, **99(10)**, 3838-3843.

Ding, Y., Yang, H., Feng, J. B., Qiu, Y., Li, D. S. ve Zeng, Y. (2013). Human umbilical cord-derived MSC culture: the replacement of animal sera with human cord blood plasma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **49(10)**, 771-777.

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

Fong, C. Y., Richards, M., Manasi, N., Biswas, A. ve Bongso, A. (2007). Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod Biomed Online*, **15(6)**, 708-718.

Fox, J. M., Chamberlain, G., Ashton, B. A. ve Middleton, J. (2007). Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British Journal of Haematology*, **137(6)**, 491-502.

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F. ve Keiliss-Borok, I. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, **17(4)**, 331-340.

Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. ve Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, **6(2)**, 230-247.

Ganta, C., Chiyo, D., Ayuzawa, R., Rachakatla, R., Pyle, M., Andrews, G. ve ark. (2009). Rat umbilical cord stem cells completely abolish rat mammary carcinomas

with no evidence of metastasis or recurrence 100 days post-tumor cell inoculation. *Cancer Res*, **69(5)**, 1815-1820.

Han, Y. F., Tao, R., Sun, T. J., Chai, J. K., Xu, G. ve Liu, J. (2013). Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. *Cytotechnology*, **65(5)**, 819-827.

Hendijani, F., Sadeghi-Aliabadi, H. ve Haghjooy Javanmard, S. (2014). Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell Tissue Bank*, **15(4)**, 555-565.

Im, G. I., Kim, D. Y., Shin, J. H., Hyun, C. W. ve Cho, W. H. (2001). Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Bone Joint Surg Br*, **83(2)**, 289-294.

Ito, T., Suzuki, A., Imai, E., Okabe, M. ve Hori, M. (2001). Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol*, **12(12)**, 2625-2635.

Jiang, X. X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S. X., Wu, Y., Yu, X. D. ve Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, **105(10)**, 4120-4126,

Joyce, N., Annett, G., Wirthlin, L., Olson, S., Bauer, G. ve Nolte, J. A. (2010). Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*, **5(6)**, 933-946.

Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. O. ve ark. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, **25(2)**, 319-331.

Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W. ve ark. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, **449(7162)**, 557-563.

Kasper, M., Stosiek, P. ve Karsten, U. (1988). Coexpression of cytokeratins and vimentin in hyaluronic acid-rich tissues. *Acta Histochem*, **84(1)**, 107-108.

Khakoo, A. Y., Pati, S., Anderson, S. A., Reid, W., Elshal, M. F., Rovira, II. ve ark. (2006). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*, **203(5)**, 1235-1247.

Kim, D. W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S. D. ve Borlongan, C. V. (2013). Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells:

Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int J Mol Sci*, **14(6)**, 11692-11712.

Kim, N. ve Cho, S. G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med*, **28(4)**, 387-402.

Kobayashi, K., Kubota, T. ve Aso, T. (1998). Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly. *Early Hum Dev*, **51(3)**, 223-233.

Kode, J. A., Mukherjee, S., Joglekar, M. V. ve Hardikar, A. A. (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, **11(4)**, 377-391.

Kreis, T. ve Vale, R. (1999). *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins* (2nd ed.). Oxford: Oxford University Press, p. 297-299, 324-326.

Liang, X. J., Chen, X. J., Yang, D. H., Huang, S. M., Sun, G. D. ve Chen, Y. P. (2012). Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells by hTERT gene transfection in vitro. *Cell Biol Int*, **36(2)**, 215-221.

Low, C. B., Liou, Y. C. ve Tang, B. L. (2008). Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. *J Neurosci Res*, **86(8)**, 1670-1679.

Maccario, R., Podesta, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D. ve ark. (2005). Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, **90(4)**, 516-525.

Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B. ve Statkov, P. R. (1971). Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science*, **173(3996)**, 548-550.

Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J. ve ark. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, **103(5)**, 697-705.

Maleki, M., Ghanbarvand, F., Reza Behvarz, M., Ejtemaei, M. ve Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells*, **7(2)**, 118-126.

Mantovani, C., Raimondo, S., Haneef, M. S., Geuna, S., Terenghi, G., Shawcross, S. G. ve Wiberg, M. (2012). Morphological, molecular and functional

differences of adult bone marrow- and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages. *Exp Cell Res*, **318(16)**, 2034-2048.

Matsuzuka, T., Rachakatla, R. S., Doi, C., Maurya, D. K., Ohta, N., Kawabata, A. ve ark. (2010). Human umbilical cord matrix-derived stem cells expressing interferon-beta gene significantly attenuate bronchioloalveolar carcinoma xenografts in SCID mice. *Lung Cancer*, **70(1)**, 28-36.

Mediana, D., Liem, I. K., Pawitan, J. A. ve Goei, N. (2015). Passage Effect on Aging of Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cell. *OnLine Journal of Biological Sciences*, **15(3)**, 170-177.

Mennan, C., Wright, K., Bhattacharjee, A., Balain, B., Richardson, J. ve Roberts, S. (2013). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int*, **2013**, 916136.

Montanucci, P., Basta, G., Pescara, T., Pennoni, I., Di Giovanni, F. ve Calafiore, R. (2011). New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. *Tissue Eng Part A*, **17(21-22)**, 2651-2661.

Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol*, **2(12)**, 957-964.

Morigi, M., Imberti, B., Zoja, C., Corna, D., Tomasoni, S., Abbate, M. ve ark. (2004). Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, **15(7)**, 1794-1804.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E. ve ark. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, **410(6824)**, 50-56.

Murphy, J. M., Fink, D. J., Hunziker, E. B. ve Barry, F. P. (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, **48(12)**, 3464-3474.

Nagamura-Inoue, T. ve He, H. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells*, **6(2)**, 195-202.

Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y. ve ark. (2005). Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **112(8)**, 1128-1135.

Nanaev, A. K., Kohnen, G., Milovanov, A. P., Domogatsky, S. P. ve Kaufmann, P. (1997). Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*, **18(1)**, 53-64.

Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R. ve Fibbe, W. E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, **177(4)**, 2080-2087.

Nazari-Shafti, T. Z., Bruno, I. G., Martinez, R. F., Coleman, M. E., Alt, E. U. ve McClure, S. R. (2015). High yield recovery of equine mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix/Wharton's jelly using a semi-automated process. *Methods Mol Biol*, **1235**, 131-146.

Ohnishi, H., Sasaki, H., Nakamura, Y., Kato, S., Ando, K., Narimatsu, H. ve Tachibana, K. (2013). Regulation of cell shape and adhesion by CD34. *Cell Adh Migr*, **7(5)**, 426-433.

Ozen, A., Sancak, I. G., Rechenberg, B. V. ve Koch, S. (2013). Ultrastructural Characteristics of Sheep and Horse Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Microscopy Research*, **1**, 17-23.

Paladino, F. V., Peixoto-Cruz, J. S., Santacruz-Perez, C. ve Goldberg, A. C. (2015). Comparison between isolation protocols highlights intrinsic variability of human umbilical cord mesenchymal cells. *Cell Tissue Bank*, 1-14 .

Parry, E. W. (1970). Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord. *J Anat*, **107(Pt 3)**, 505-518.

Pasquinelli, G., Tazzari, P., Ricci, F., Vaselli, C., Buzzi, M., Conte, R. ve ark. (2007). Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastruct Pathol*, **31(1)**, 23-31.

Peng, X., Xu, H., Zhou, Y., Wang, B., Yan, Y., Zhang, X. ve ark. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate cisplatin-induced acute and chronic renal injury. *Exp Biol Med (Maywood)*, **238(8)**, 960-970.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D. ve ark. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284(5411)**, 143-147.

Porcellini, A. (2009). Regenerative medicine: a review. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **31**, 63-66.

Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, **276(5309)**, 71-74.

Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F. ve ark. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*, **26(1)**, 151-162.

Raio, L., Cromi, A., Ghezzi, F., Passi, A., Karousou, E., Viola, M. ve ark. (2005). Hyaluronan content of Wharton's jelly in healthy and Down syndrome fetuses. *Matrix Biol*, **24(2)**, 166-174.

Ravikanth, M., Soujanya, P., Manjunath, K., Saraswathi, T. R. ve Ramachandran, C. R. (2011). Heterogeneity of fibroblasts. *J Oral Maxillofac Pathol*, **15(2)**, 247-250.

Rich, I. N. (2015). Short primer in stem cell biology. *Methods Mol Biol*, **1235**, 1-6.

Ryu, Y. J., Cho, T. J., Lee, D. S., Choi, J. Y. ve Cho, J. (2013). Phenotypic characterization and in vivo localization of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cells*, **35(6)**, 557-564.

Salehinejad, P., Alitheen, N. B., Ali, A. M., Omar, A. R., Mohit, M., Janzamin, E. ve ark. (2012). Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **48(2)**, 75-83.

Salem, H. K. ve Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*, **28(3)**, 585-596.

Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M. ve Davies, J. E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, **23(2)**, 220-229.

Schugar, R. C., Chirieleison, S. M., Wescoe, K. E., Schmidt, B. T., Askew, Y., Nance, J. J. ve ark. (2009). High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol*, **2009**, 789526.

Sekiya, I., Larson, B. L., Smith, J. R., Pochampally, R., Cui, J. G. ve Prockop, D. J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma:

conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, **20(6)**, 530-541.

Shake, J. G., Gruber, P. J., Baumgartner, W. A., Senechal, G., Meyers, J., Redmond, J. M. ve ark. (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*, **73(6)**, 1919-1925.

Sobolewski, K., Bankowski, E., Chyczewski, L. ve Jaworski, S. (1997). Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol Neonate*, **71(1)**, 11-21.

Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C. ve Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, **107(4)**, 1484-1490.

Subramanian, A., Fong, C. Y., Biswas, A. ve Bongso, A. (2015). Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*, **10(6)**, e0127992.

Sun, X. Y., Nong, J., Qin, K., Warnock, G. L. ve Dai, L. J. (2011). Mesenchymal stem cell-mediated cancer therapy: A dual-targeted strategy of personalized medicine. *World J Stem Cells*, **3(11)**, 96-103.

Szczyпка, M. S., Westover, A. J., Clouthier, S. G., Ferrara, J. L. ve Humes, H. D. (2005). Rare incorporation of bone marrow-derived cells into kidney after folic acid-induced injury. *Stem Cells*, **23(1)**, 44-54.

Takahashi, K. ve Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126(4)**, 663-676.

Takechi, K., Kuwabara, Y. ve Mizuno, M. (1993). Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta*, **14(2)**, 235-245.

Tamura, M., Kawabata, A., Ohta, N., Uppalapati, L., Becker, K. G. ve Troyer, D. (2011). Wharton's jelly stem cells as agents for cancer therapy. *Open Tissue Eng Regen Med J*, **4**, 39-47.

Taran, R., Mamidi, M. K., Singh, G., Dutta, S., Parhar, I. S., John, J. P. ve ark. (2014). In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci*, **39(1)**, 157-169.

Thomas, E. D. ve Blume, K. G. (1999). Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, **5(6)**, 341-346.

Togel, F., Hu, Z., Weiss, K., Isaac, J., Lange, C. ve Westenfelder, C. (2005). Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, **289(1)**, F31-42.

Uccelli, A., Moretta, L. ve Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, **8(9)**, 726-736.

Varga, I., Miko, M., Oravcova, L., Backayova, T., Koller, J. ve Danisovic, L. (2015). Ultra-structural morphology of long-term cultivated white adipose tissue-derived stem cells. *Cell Tissue Bank*, 1-9.

Venugopal, P., Balasubramanian, S., Majumdar, A. S. ve Ta, M. (2011). Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem Cells Cloning*, **4**, 39-50.

Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I. ve Goldberg, V. M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, **76(4)**, 579-592.

Wang, L., Zhao, L. ve Detamore, M. S. (2011). Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, **5(9)**, 712-721.

Wu, X. B. ve Tao, R. (2012). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **11(4)**, 360-371.

Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J. ve ark. (2004). Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229(7)**, 623-631.

Yeh, S. P., Chang, J. G., Lin, C. L., Lo, W. J., Lee, C. C., Lin, C. Y. ve ark. (2005). Mesenchymal stem cells can be easily isolated from bone marrow of patients

with various haematological malignancies but the surface antigens expression may be changed after prolonged ex vivo culture. *Leukemia*, **19(8)**, 1505-1507.

Zeddou, M., Briquet, A., Relic, B., Josse, C., Malaise, M. G., Gothot, A. ve ark. (2010). The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int*, **34(7)**, 693-701.

Zhang, H., Zhang, B., Tao, Y., Cheng, M., Hu, J., Xu, M. ve Chen, H. (2012). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from whole human umbilical cord applying a single enzyme approach. *Cell Biochem Funct*, **30(8)**, 643-649.

Zhang, W., Liu, X. C., Yang, L., Zhu, D. L., Zhang, Y. D., Chen, Y. ve Zhang, H. Y. (2013). Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis*, **24(7)**, 549-558.

Zhu, S. F., Zhong, Z. N., Fu, X. F., Peng, D. X., Lu, G. H., Li, W. H. ve ark. (2013). Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett*, **541**, 77-82.

Zickri, M. B., El Aziz, D. H. ve Metwally, H. G. (2013). Histological experimental study on the effect of stem cell therapy on adriamycin induced chemobrain. *Int J Stem Cells*, **6(2)**, 104-112.

FORMLAR

 <p>T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu</p>	ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 18.04.2013
		Sayfa No: 1/2
		Onaylayan: Daire Başkanı

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Meral Koyutürk danışmanlığında yapacak olduğum “İnsan göbek kordonundan mezenkimal kök hücre izolasyonu ve karakterizasyonu” adlı yüksek lisans tez çalışmamda, sezeryan ile doğum yapacak olan gönüllülerden alınacak, tıbbi biyolojik atık materyal olan, göbek kordonları örnekleri kullanılacaktır.

Gönüllü vericilerden alınacak göbek kordonu örneklerinin, mikroskopik ve histolojik analizler ile incelenmesi, göbek kordonu stromal hücrelerinin mezenkimal kök hücre karakterizasyonunun yapılması ve in-vitro ve in-vivo koşullarda farklılaşma yeteneklerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Çalışma tamamen etik kurallar çerçevesinde yürütülecek olup, başka amaçlar için kullanılmayacaktır.

Araştırmada herhangi bir tedavi edici bir yöntem uygulanmayacaktır.

Araştırma sırasında herhangi bir invazif yöntem uygulanmayacaktır.

Gönüllü vericiler izin belgesini imzalamış olsalar dahi, çalışmanın herhangi bir evresinde izinlerini iptal etme hakkına sahiptirler.

Araştırmada elektron ve ışık mikroskopik analizler, immunohistokimyasal teknikler ve hücre kültürü yöntemi kullanılacaktır.

Göbek kordonu örnekleri alınırken, vericilere hiçbir şekilde farklı bir cerrahi müdahalede bulunulmayacaktır. Bu nedenle çalışmamızın neden olacağı herhangi bir hastalık riski veya hayati tehlike bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, göbek kordonu ve bu dokudan izole edilecek olan mezenkimal kök hücrelerin histolojik ve immunohistokimyasal olarak karakterizasyonu ve farklılaşma potansiyelleri değerlendirilmesi klinik araştırmalar için oldukça önem arz etmektedir.

Gönüllüye herhangi bir alternatif yöntem veya tedavi uygulanmayacaktır.


Gönüllüye herhangi bir ücret ödenmeyecektir.

Gönüllünün bağlı olduğu sağlık güvenlik kurumundan (SGK) herhangi bir ücret alınmayacaktır.

Gönüllüye herhangi bir yol yardımı ya da yemek yardımı yapılmayacaktır.

Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlı olup ve gönüllü istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilir.

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri bulunabilecektir, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayan gönüllü veya yasal temsilcisi söz konusu erişime izin vermiş olacaktır.

 <p>T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu</p>	ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 18.04.2013
		Sayfa No: 2/2
		Onaylayan: Daire Başkanı

İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacaktır, kamuoyuna açıklanamayacaktır; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllü veya yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.

Gönüllüler **+90 542 322 25 33** telefon numarasından, araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında günün 24 saatinde temasa geçme hakkına sahiptir.

Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı 20 kişidir.

Gönüllülerden elde edilecek göbek kordonu örneklerinin, mikroskopik ve histolojik analizler ile incelenmesi, göbek kordonu stromal hücrelerinin mezenkimal kök hücre karakterizasyonunun yapılması ve in-vitro ve in-vivo koşullarda farklılaşma yeteneklerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Biyolojik materyallerin analizleri yurtdışında yapılmayacaktır.

Gönüllülerden elde edilen biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılmayacaktır.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Araştırmacının Adı-Soyadı: Yük.Lis.Öğr. Serbay ÖZKAN

İmzası:

Tarih:

Sorumlu Tez Danışmanının Adı-Soyadı: Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK

İmzası:

Tarih:

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 83045809/604 / 88248
Konu:

İstanbul/...../.....

12 Haziran 2014

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İlgi: 25.04.2014 tarih, 76624604/302.04-647 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Meral KOYUTÜRK**'ün danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi **Bio.Serbay ÖZKAN**'ın yürütücülüğünde "**İnsan Göbek Kordonundan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu**" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **04 Haziran 2014** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; İ.Ü. Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim

Prof.Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Klinik Araştırmalar Etik
Kurul Başkanı

Eki:
1 dosya