

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ADİPOZ DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (AD-SCs)
KÜLTÜRASYONUNDA VE ADİPOSİTLERE FARKLILAŞTIRILMASINDA
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN (PRP) ETKİNLİĞİ**

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Şükran Noyan SAVAŞ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN

İZMİR

2016

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ADİPOZ DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (AD-SCs)
KÜLTÜRASYONUNDA VE ADİPOİTLERE FARKLILAŞTIRILMASINDA
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN (PRP) ETKİNLİĞİ**

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Şükran Noyan SAVAŞ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN

İZMİR

2016

Önsöz

Yüksek lisans eğitimim süresinde bana her konuda özveri ile destek olan, bilimsel fikirleri ve deneyimleri ile yol gösteren, değerli hocam ve tez danışmanım

Sayın Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN'a

Yüksek lisans tezimin deneysel aşamalarında ya da materyal temininde benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım,

Sayın Doç. Dr. Yiğit Özer TİFTİKÇİOĞLU 'na, Sayın Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e ve Sayın Prof. Dr. Seda VATANSEVER'e

Deneysel çalışmalarında ve tezimin yazımında bana büyük yardımları olan, tezimin her aşamasında bana desteğini esirgemeyen

Doktora Öğrencisi Afrooz RASHNONEJAD'a

Yüksek lisans sürecinde fikirleriyle bana yol gösteren ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım;

Yüksek Lisans Öğrencisi Ayfer KARLITEPE 'ye, Yüksek Lisans Öğrencisi Özgün ÖZALP'e, Doktora Öğrencisi Navid Hosseini MANSOUB'a

Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim
Dalı'ndaki tüm değerli öğretim üyeleri hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen ve beni
akademik yolda cesaretlendiren; annem **Sultan SAVAŞ**'a, babam
Akın SAVAŞ'a ve sevgili kardeşim **Meriç SAVAŞ**'a sonsuz
teşekkür ederim.

Şükran Noyan SAVAŞ

İzmir, 28.06.2016

ÖZET

ADİPOZ DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (AD-SCs) KÜLTÜRASYONUNDA VE ADİPOİTLERE FARKLILAŞTIRILMASINDA TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN (PRP) ETKİNLİĞİ

PRP, tam kanın santrifüj edilmesi ile elde edilir. Büyüme faktörlerini yoğun içermesi nedeniyle son yıllarda birçok tedavi alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İnsanın otolog olarak kendi kanından alınıp elde edilebildiği için PRP uygulaması alerjik etkilerin oluşmasını da engellemektedir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) multipotent farklılaşma yeteneğine sahip olan kök hücrelerdir. Köken aldığı tabaka mezoderm tabakası olduğundan, *in vivo* ve *in vitro* şartlarda MKH kondroblast, osteoblast ve adiposit gibi mezoderm kökenli hücrelere kolayca dönüşebilme potansiyeline sahiptirler.

Çalışmamızda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniğine liposakşın işlemi için başvuran gönüllü vericilerden etik komiteden onay alınarak alınan lipoaspirat/lipektomi materyalinden adipoz doku kök hücreleri (AD-SCs) saflaştırılmıştır. Hücreler kültüre edildikten sonra adipositlere farklılaştırılmıştır. Ayrıca, aynı vericilerden alınan periferik kan örneklerinden PRP de elde edilmiştir. AD-SCs'in kültürasyonu ve adipositlere farklılaştırılması esnasında gereksinim duyduğu büyüme faktörlerinin temininde hayvansal kaynaklı *fetal bovine serum* (FBS) veya *fetal calf serum* (FCS) yerine insan vericilerden otolog olarak elde edilen PRP kullanılmıştır. Böylece hayvansal kaynaklı materyalden meydana gelebilecek immün red ya da alerjik reaksiyonun engellenmesi ya da azaltılması hedeflenmiştir. Ayrıca

AD-SCs'in adipositlere farklılaştırılması esnasında hayvansal FBS yerine PRP kullanılması farklılaşma sürecini yaklaşık iki kat kısaltmıştır. Aynı zamanda, kültürasyonunda PRP kullanılan ortamdaki hücre miktarının FBS kullanılan ortamdaki hücrelere göre yaklaşık 2 kat fazla olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin %20 PRP kullanılan kültürde *dt* (*doubling time*, ikilenme süresi, hücrelerin sayısal olarak ikiye katlanma süresi) 20.087 saat iken, %20 FBS kullanılan hücrelerde *dt* 35.99 saat olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak MKH'in kültürasyonunda FBS yerine PRP kullanılmasının daha etkin olduğu belirlenmiştir. Klinik çalışmalarda MKH'in kültürasyonu ya da diferansiyasyonu prosedürlerinde gereksinim duyulduğunda hayvan kaynaklı FBS ya da FCS yerine insan kaynaklı otolog PRP kullanımı immün reddi de önleyebileceğinden ya da azaltabileceğinden rahatlıkla önerilebilir.

Anahtar kelimeler: Trombositten Zengin Plazma; PRP; Mezenkimal Kök hücreler; MKH; Kök Hücre; AD-SCs; Büyüme Faktörleri

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF PLATELET-RICH PLASMA (PRP) ON CULTIVATION AND DIFFERENTIATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (AD-SCs) INTO ADIPOCYTES

PRP is obtained by centrifuging whole blood. Because it contains growth factors intensively, it is used widely in many therapeutic areas in recent years. Since PRP is obtained autologously from individual's own blood, its application also prevents the formation of allergenic effects.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are stem cells having multipotent differentiation ability. since they are originated from mesoderm layer, they have the potential of transforming into mesoderm-derived cells such as chondroblast, osteoblast and adipocyte easily.

In our study, after getting ethical committee approval, AD-SCs were purified from lipoaspirate/lipectomy material taken from the voluntary donors who have applied to Ege University Faculty of Medicine, Plastic and Reconstructive Surgery for the liposuction procedure. After cultivation AD-SCs were differentiated into adipocytes. PRP was obtained by centrifuging the peripheral blood samples obtained from the same donors. During cultivation and differentiation of AD-SCs into adipocytes, PRP derived autologously from human donors were used in order to supply the growth factors required instead of using fetal bovine serum (FBS) or fetal calf serum (FCS) of animal origin. Thus, it was aimed to prevent or reduce immun rejection or allergenic reactions that may occur because of animal-derived material.

During the differentiation process of AD-SCs into adipocytes, the use of PRP instead of animal serum shortened the differentiation period approximately two-fold. At the same time, it was observed that the amount of cells in the culture medium with PRP was nearly two times greater than the cells in the medium with animal serum. For example, it was determined that dt (doubling time) was 20.087 hours in 20% PRP used culture medium, while dt was 35.99 hours in the 20% FBS used one.

In conclusion, it was determined that using PRP instead of FBS in culturing of MSCs was more effective. Since immun rejection can be prevented or lessened by using autolog human material instead of animal derived material, in requirement of FBS or FCS for culturing or differentiation procedures of MSCs in clinical trials the use of autolog PRP can be conveniently recommended.

Keywords: Platelet Rich Plasma; PRP; Mesenchymal Stem Cells; MSCs; Stem Cell; AD-SCs; Growth Factors

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kök Hücre.....	3
2.1.1. Kök Hücrenin Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.1.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	5
2.1.2.1. Totipotent Hücreler.....	5
2.1.2.2. Pluripotent Hücreler.....	5
2.1.2.3. Multipotent Hücreler.....	6
2.1.2.4 Oligopotent Hücreler.....	6
2.1.2.5. Unipotent Hücreler.....	6
2.1.3. Kaynaklarına Göre Kök Hücreler.....	7
2.1.3.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH).....	7
2.1.3.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler.....	8
2.1.3.2.1.Mezenkimal Kök Hücreler.....	9
2.1.3.2.1.1 Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler.....	9
2.2. Trombositten Zengin Plazma (PRP).....	16
2.2.1. PRP Uygulama Alanları.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. MKH'lerin Adipoz Dokudan İzolasyonu.....	23
3.2. PRP Hazırlama Yöntemi.....	28
3.3. Kök Hücrelere PRP Muamelesi.....	29
3.4. AD-SCs'in Adipositlere Farklılaştırılması.....	33

3.5. Oil Red Boyama.....	34
3.6. İkilenme Süresinin (<i>Doubling Time</i> = <i>dt</i>) Hesaplanması.....	34
3.7. Flow sitometri Yöntemi.....	35
3.8. Hücre Sayımı.....	36
3.9. İkilenme Süresi Formülü.....	37
3.10. Trypan Blue ile Canlılık Testi.....	37
3.11. İstatiksel Veri Analizi.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. PRP ve FBS İçin İkilenme Süreleri.....	39
4.2. Oil Red Boyama Sonuçları.....	40
4.3. Flow Sitometri Sonuçları.....	42
4.4 Trypan Blue Canlılık Testi Sonuçları	43
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
7. KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	54

Kısaltmalar Listesi

AD-SCs	: Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
PRP	: Trombositten Zengin Plazma
FBS	: Fetal Bovine Serum
FCS	: Fetal Calf Serum
EKH	: Embriyonik Kök Hücreler
İEKH	: İnsan Embriyonik Kök Hücreleri
İPKH	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
MKH (MSCs)	: Mezenkimal Kök Hücreler
BMSC	: Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
SVF	: Stromal Vasküler Fraksiyon
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media
PBS	: Buffered Saline
IFATS	: International Federation for Adipose Therapeutics and Science
WAT	: Beyaz Yağ Dokusu (White Adipose Tissue)
GMP	: İyi Üretim Uygulamaları
FDA	: Food and Drug Administration
PDGF	: Platelet Büyüme Faktörü
PDGF-$\alpha\alpha$	: Platelet Büyüme Faktörü- $\alpha\alpha$
PDGF-$\alpha\beta$	: Platelet Büyüme Faktörü- $\alpha\beta$
PDGF-$\beta\beta$	: Platelet Büyüme Faktörü- $\beta\beta$
TGF	: Transforming Büyüme Faktörü

TGF-α	: Transforming Büyüme Faktörü Alfa
TGF-β1	: Transforming Büyüme Faktörü Beta 1
TGF-β2	: Transforming Büyüme Faktörü Beta 2
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
FGF-7	: Fibroblast Büyüme Faktörü-7
aFGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü ;asidik
FGF-1	: Fibroblast Büyüme Faktörü-1
bFGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü; bazik
FGF-2	: Fibroblast Büyüme Faktörü-2
CTGF	: Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
GM-CSF	: Granülosit/Makrofaj Koloni-Uyarıcı Faktörü
CSF-α	: Granülosit/Makrofaj Koloni-Uyarıcı Faktörü
IGF	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktörü-Alfa
IL-1 β	: İnterlökin-1 β
IL-8	: İnterlökin-8
mRNA	: Mesajcı RNA
BMP	: Kemik Morfojenik Proteini
CJD	: Creutzfeldt-Jakob Hastalığı
cm	: Santimetre
°C	: Santigrat

ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
µm	: Mikrometre
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü, bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden bir ölçü birimidir)
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü)
α- MEM	: Minimum Essential Medium
DMEM-F12	: Dulbecco's Modified Eagles Media F12
DMEM-1x	: Dulbecco's Modified Eagles Media 1x
Pen-Strep	: Penisilin-Streptomisin
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
IBMX	: 3-İzobutil-1-Metilksantin
cm²	: Santimetrekare
log	: Logaritma
α	: Alfa
dt	: İkilenme süresi (doubling time)
T3	: Triiodo-L-Thyronine
g	: Yer çekimi

Tablo Dizini

Tablo 1	: Farklılaştıkları hücre tipi ve yönüne göre kök hücreler.....	9
Tablo 2	: PRP büyüme faktörleri ve kısaltmaları.....	20
Tablo 3	: Kullanılan malzemeler.....	23
Tablo 4	: PRP ve FBS için hücre sayıları ve ikilenme süresi.....	38

Şekil Dizini

Şekil 1	: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaştığı diğer hücreler.....	3
Şekil 2	: Kök hücrelerin plastisite potansiyelleri.....	4
Şekil 3	: Totipotent kök hücrelerin yeni bir organizmaya dönüşmesi.....	5
Şekil 4	: Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler.....	6
Şekil 5	: Embriyonik kök hücrelerin gelişim süreci.....	7
Şekil 6	: Vücutta adipoz doku lokalizasyonu.....	10
Şekil 7	: Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre izolasyonu.....	13
Şekil 8	: Plaklara farklı oranlarda PRP eklenmesi.....	32
Şekil 9	: Plaklara farklı oranlarda FBS eklenmesi.....	32

Resim Dizini

Resim 1	: Lipoaspirattaki yağ hücrelerinin ayrıştırılması.....	24
Resim 2	: Yağ hücrelerinin yıkama işlemlerinden sonra 2 flaska ayrılması....	25
Resim 3	: Kollajenaz eklenen hücrelerin inkübasyonu.....	26
Resim 4	: İnkübasyona bırakılacak olan hücreler.....	27
Resim 5	: Gönüllülerden alınan kan örnekleri.....	28
Resim 6	: Hücrelere besi ortamı muamelesi.....	30
Resim 7	: Plaklara ekim yapılması.....	31
Resim 8	: Hücre sayımı.....	33
Resim 9	: Flow sitometri cihazı.....	36
Resim 10	: Oil Red boyama sonucu PRP ve FBS'li hücrelerin yoğunluğu.....	40
Resim 11	: Flow sitometri sonuçları.....	42

Grafik Dizini

Grafik 1	: PRP ve FBS için hücrelerin ikilenme süreleri (<i>dt</i>).....	39
Grafik 2	: Trypan Blue Canlılık Testi Sonuçları.....	43

1. GİRİŞ

Trombositten zengin plazma (*Platelet rich plasma*; PRP), tam kanın santrifüj edilmesiyle elde edilen hücre plazma komponentidir.

PRP, göreceli olarak tam kandan daha yüksek miktarda trombosit konsantrasyonuna sahiptir. Bazı yazarlar PRP'deki trombosit içeriğinin tam kandan yaklaşık 5 kat daha fazla olduğunu savunmaktadırlar. Tam kandaki trombosit sayısının 150 000 -350 000/ μ l kadar, 5 ml plazmada ise 1 000 000/ μ l'nin üzerinde olduğu bilinmektedir. PRP, sahip olduğu yüksek orandaki büyüme faktörleri nedeniyle tıpta bir çok alanda tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

PRP, doku iyileşmesindeki olumlu etkileri sayesinde başta maksillofasiyal ve kardiyovasküler cerrahi olmak üzere yaklaşık 20 senedir tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Son dönemlerde ise kas iskelet sistemi yaralanmaları tedavisinde de uygulanmaya başlanan bir yöntem haline gelmiştir. Trombositlerin içerdiği büyüme faktörleri iyileşme sürecinde önemli role sahiptirler. Yüksek konsantrasyonlu otolog trombosit enjeksiyonları ile kronik, iyileşmeyen kemik ve yumuşak doku yaralanmalarında iyileşme sürecinin kısaltılması ve iyileşmenin uyarılması sağlanmaktadır. Antienflamatuvar tedavilerin uzun dönemde sonuç vermeleri nedeniyle, bu tedavi yöntemleri yerine kullanılan PRP enjeksiyonları ile doğal iyileşmeyi arttırarak kalıcı tedavi amaçlanmaktadır.

8 dakikada 3000 devir/dakika ile santrifüj edilerek elde edilen PRP tedavi edilecek bölgeye mezoterapi veya dolgu yöntemi ile enjekte edilir. PRP uygulamasının en önemli avantajı hastanın kendi kanından elde edilmiş olması ve alerji riski taşımamasıdır. Enjeksiyon yapılan bölgelerde trombositler ve lökositler (beyaz kan hücreleri) sinerjik bir etki ile yoğun konsantrasyonlarda büyüme faktörlerinin serbest kalmasını sağlarlar. PRP'nin dermatolojide

kullanım alanları; cilt gençleştirme, ince çizgi ve kırışıklıkların tedavisi, volumetrik (hacimsel olarak) doldurma (dolgu), akne sikatrisleri (izleri), alopesi (kellik), sellülit, çatlak ve yara iyileşmesini hızlandırma tedavileridir.

Bizim çalışmamızın önemi PRP'nin bu özelliklerinden yararlanarak kültür ortamındaki adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden (AD-SCs) adiposit hücrelerinin farklılaştırılarak eldesinde geleneksel olarak kullanılan hayvansal kaynaklı FBS ve FCS yerine PRP'nin kullanılarak etkinliğinin değerlendirilmesidir ve çalışmamızın sonuçları PRP'nin olumlu etkilerini göstermektedir.



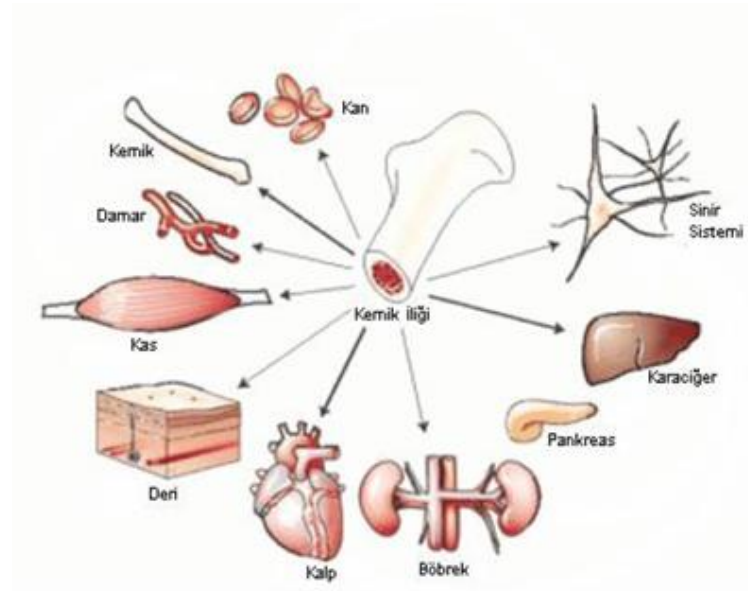
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

2.1.1. Kök Hücrenin Tanımı ve Tarihçesi

Kök hücreler temelde yaşamın kaynağı olarak düşünülmektedir (1). Alman bir bilim adamı olan Carl Rudolph Virchow, 1800'li yılların başlarında "Omnis cellula e cellula = tüm hücreler başka hücrelerden gelişir" düşüncesiyle kök hücre kavramıyla ilgili ilk önemli fikri ortaya koymuştur (2). Kök hücre izolasyonu ilk kez 1981 yılında Evans ve arkadaşlarının çalışmalarıyla gerçekleştirilmiştir (3).

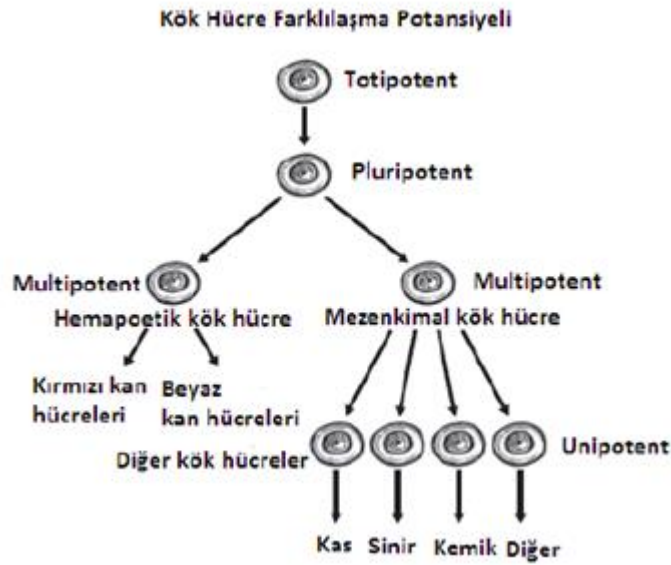
Kök hücreler gereksinim duyduğu uygun bir sinyal ile uyarıldıklarında çeşitli birçok hücreye dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir (4).



Şekil 1: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaştığı diğer hücreler (4)

Kök hücreler sahip oldukları kendilerini yenileme, doku ve organlara farklılaşabilme gibi özellikleri sayesinde oldukça önemlidirler. Kök hücrelerin bu kendini yenileyebilme özelliği ilk kez 1950'li yılların başında keşfedilmiştir (5). Bu özellikleri sayesinde *in vitro* kültür ortamlarında da kolaylıkla çoğalabilmektedirler (2).

Daha sonra yapılan çalışmalarda kök hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda sadece köken aldıkları doku ve organların hücrelerine dönüşmedikleri, vücudumuzun diğer farklı hücrelerine de dönüşebilme özelliğine sahip oldukları ortaya konmuştur ve bu özellik '*farklılaşma*' (*plastisite*) olarak adlandırılmaktadır (4).



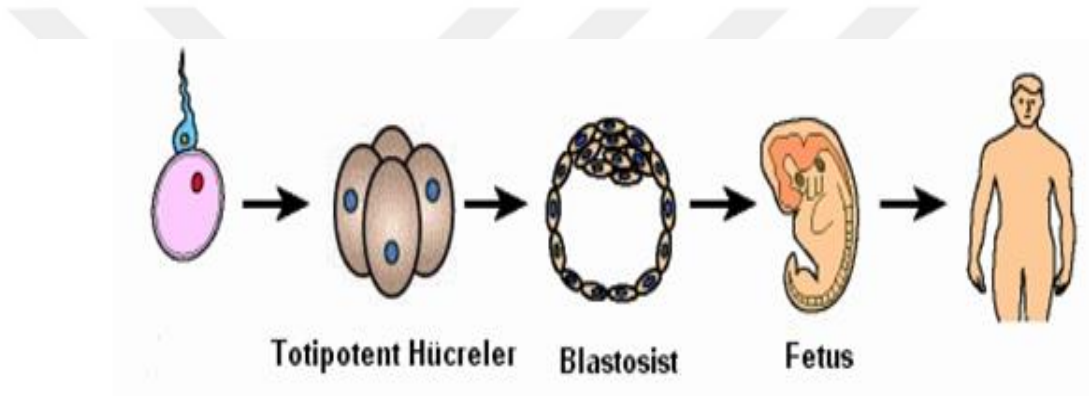
Şekil 2 : Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri (6)

Birçok laboratuvar çalışması sayesinde kök hücrelerin sınırsız bölünebilme özelliğine sahip olduğu saptanmıştır. Günümüzde tedavisi mümkün olmayan birçok hastalığın tedavisindeki başarıları kök hücrelere olan ilgiyi arttırmaktadır (4).

2.1.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

2.1.2.1. Totipotent Hücreler

İnsanda sperm ve yumurtanın döllenmesiyle oluşan zigottaki embriyonik kök hücrelerin organizmadaki tüm hücrelere dönüşebilme özelliğine 'totipotent' denilmektedir. Totipotentin kelime anlamı 'her şeyi yapabilen' olarak açıklanabilir. Totipotent kök hücreler yeni bir organizmaya dönüşebilme yetisine sahip hücrelerdir (4).



Şekil 3 : Totipotent kök hücrelerin yeni bir organizmaya dönüşmesi (4)

2.1.2.2. Pluripotent Hücreler

Fertilizasyonun (döllenme) yaklaşık olarak beşinci gününde, ortalama 150 hücreden oluşan ve içi sıvı dolu kistik bir yapı meydana gelir. Bu yapıya '*blastokist*' adı verilmektedir. Blastokistin iç hücre kitlesinde bulunan hücreler endoderm, mezoderm ve ektoderm kökenli birçok farklı hücreye farklılaşabilmektedir. Bu hücre tipine 'pluripotent' hücreler denilmektedir (2).

2.1.2.3. Multipotent Hücreler

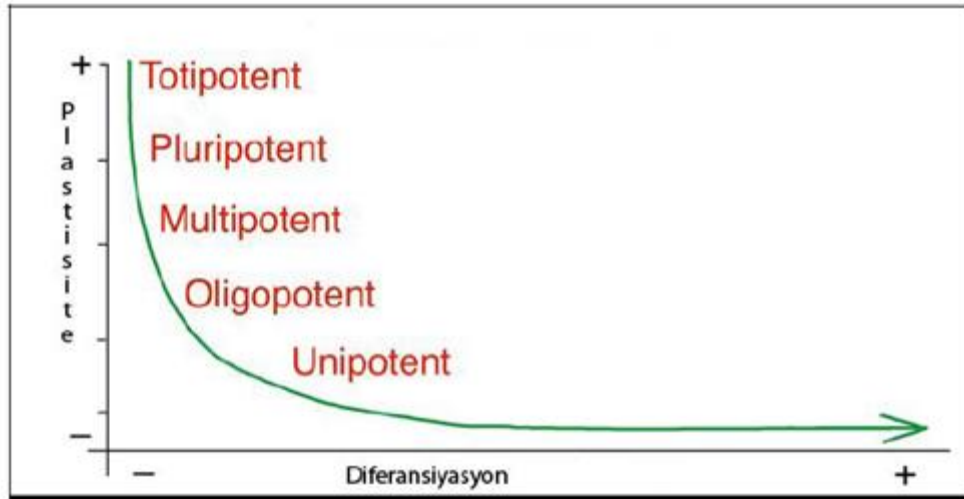
Bulundukları dokunun hücre tipine göre hücre üretebilen yani birbirine yakın hücrelere dönüşebilen kök hücrelerdir (2,4).

2.1.2.4. Oligopotent Hücreler

Yalnızca birkaç farklı hücre tipine dönüşebilen kök hücrelerdir. Bunlara örnek olarak myeloid ve lenfoid seri hücreleri verilebilir (4).

2.1.2.5. Unipotent Hücreler

Yalnızca tek bir hücreye dönüşebilen kök hücrelerdir. Örneğin, bu hücreler sadece kas dokusundaki uydu (satellite) hücrelerini meydana getirmektedir (1,4).



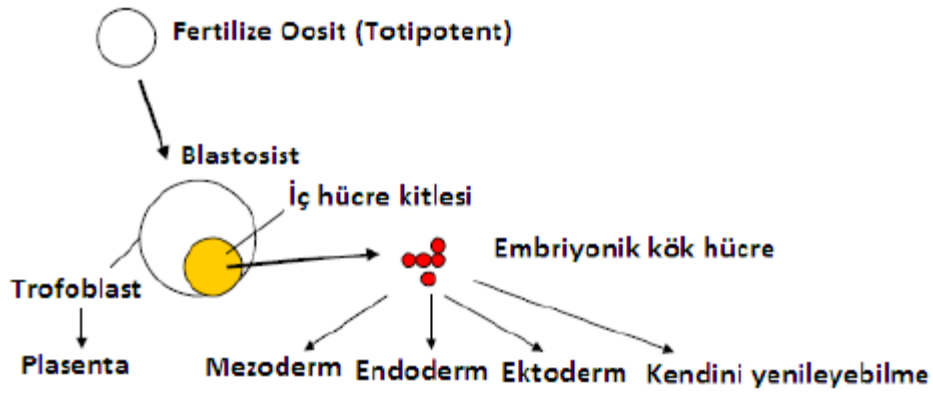
Şekil 4: Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler (4)

2.1.3. Kaynaklarına Göre Kök Hücreler

Kök hücreler temelde kaynaklarına göre 2 çeşittirler. Bunlar 'embriyonik kök hücreler' ve 'embriyonik olmayan kök hücreler' dir.

2.1.3.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Zigotun beşinci veya altıncı defa bölünmesi sonucu oluşan yapıya 'blastokist' adı verilir. İnsanda blastokist yapısının 4. gününde sahip olduğu iç hücre kitlesinde bulunan hücreler EKH'lerdir. Totipotent hücreler ileri dönemde pluripotent hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahiptirler (7).



Şekil 5 : Embriyonik kök hücrelerin gelişim süreci (8)

James Thomson ve arkadaşları 1988 yılında dondurulmuş embriyolardan insan embriyonik kök hücreleri (iEKH) ürettirler. İnsan embriyosunun tedavi amaçlı kullanılması etik açıdan birçok soruna yol açmaktadır ve bu sebeple günümüzde hala tartışma

konusudur. Özellikle de iEKH çalışmalarında etik açıdan çok büyük kısıtlamalar mevcuttur (4).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda EKH'lerin Alzheimer, diyabet, multipl skleroz ve diğer birçok hastalığın tedavisinde başarılı olması bu hücrelerin, rejeneratif tıbbın geleceği açısından önem kazanmasına yol açmıştır (1).

Son yıllarda, EKH'lere benzer özelliklere sahip yeni bir hücre grubu tanımlanmıştır. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) *denilen bu hücreler*, somatik bir hücreye, EKH'lere benzer pluripotent kök hücre özelliği kazandırmak için pluripotens genlerinin aktarılması yoluyla yapılan işlemle elde edilen kök hücrelerdir. *Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc* genlerinin somatik hücrelere aktarımı ile iPKH elde edilmektedir (1).

2.1.3.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Bu kök hücrelerin çeşitleri şunlardır;

- a) Erişkin kök hücreler (mezenkimal kök hücreler, hematopoetik kök hücreler)
- b) Kadavradan izole edilen kök hücreler
- c) Fetüs kök hücreleri
- d) Plasenta ve kordon kanı kök hücreleri (4)

Kan, yüksek yenilenme kapasitesine sahip olan dokulardan biridir. Hematopoetik kök hücrelerin ve bunlardan türevlenen kan hücrelerinin temel kaynağı kemik iliğidir. (9)

2.1.3.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH, ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından ortaya konmuştur (10). *MKH* çalışmaları ilk olarak kemik iliği nakilleri ile başlamıştır (11).

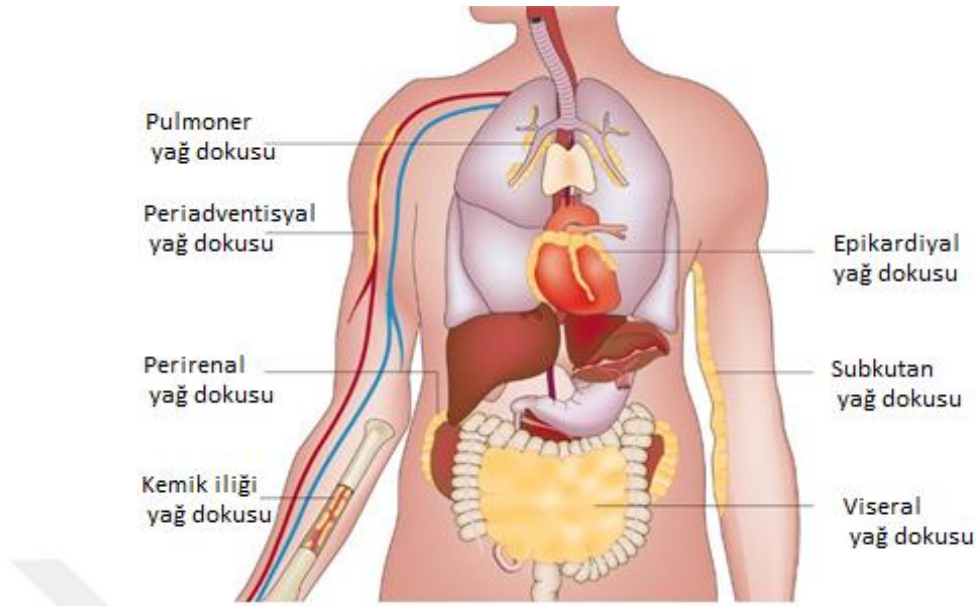
MKH'ler multipotent farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerdir ve mezoderm tabakadan köken alırlar. *In vivo* ve *in vitro* koşullarda *MKH*'ler mezoderm kökenli olan kondroblast, osteoblast ve adiposit gibi hücrelere dönüşebilirler (12).

İsim	Hücre Tipi (Yerleşim)	Farklılaşma etkinliği	Farklılaşma yönü
EKH	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
EKH	Blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyon gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
EKH	Ektoderm, endoderm ve mezoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
MKH	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Hücresinin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre (örn. hematopoetik kök hücre)
MKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi (örn. kas dokusundaki uydu hücreler)

Tablo 1 : Farklılaştıkları hücre tipi ve yönüne göre kök hücreler (1)

2.1.3.2.1.1. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

AD-SCs deri altı adipoz dokudan liposakşın yöntemi ile kolaylıkla elde edilebilir. AD-SCs'i kas, kartilaj ve kemik hücreleri gibi hücre tiplerinden ayırt etmenin mümkün olduğu ilk olarak Zuk ve arkadaşları tarafından ele alınmıştır (13).



Şekil 6 : Vücutta adipoz doku lokalizasyonu (14)

Adipoz doku klinik uygulamalar için kullanılan en elverişli kaynaktır. Bunun nedeni az sayıda donörden liposakşın yöntemiyle çok miktarda ve kolayca elde edilebilir olmasıdır (15).

Başka bir MKH türü olan AD-SCs bazı kaynaklarda ASC olarak kısaltılmaktadır. Patricia Zuk ve meslektaşları AD-SCs'i karakterize ettiler. Patricia Zuk ve arkadaşları lipoaspirat ile AD-SCs'i izole ettikten sonra in vitro koşullarda çoğalttılar ve bu hücrelerin multipotent olduklarını belli kültür ortamlarında bu hücrelerin adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve myojenik özelliklerini göstererek kanıtlamışlardır (16).

Kemik iliğinden ve adipoz dokudan alınan MKH'in toplanma tekniklerini karşılaştırdığımızda, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin (BMSC) elde edilmesi için kemiğin delinmesi gerekir

buna karşılık AD-SCs daha kolay bir yöntem olan liposakşın yöntemiyle elde edilebilir ve aynı zamanda adipoz doku alınan donörlerde estetik açıdan da pozitif sonuç sağlar. Ayrıca, kök hücre verimi adipoz dokularda daha yüksektir. Bu nedenle, adipoz doku diğer dokulara göre otolog ve heterolog hücre nakillerinde bol miktarda ve kolayca AD-SCs elde edilebilen multipotent kök hücre kaynağıdır (16).

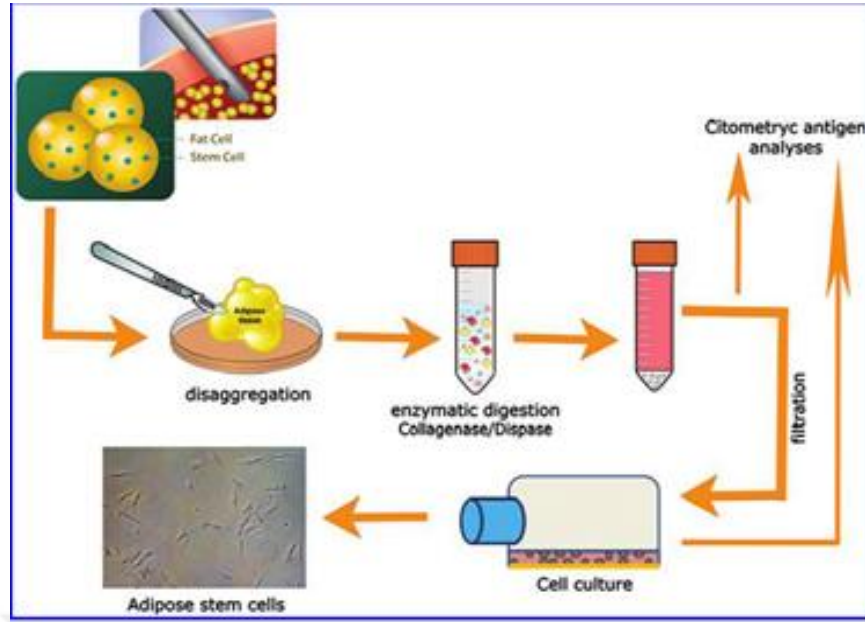
AD-SCs'in izolasyon protokolünde adipoz doku ya da lipoaspirat kollajenaz tip IV ile enzimatik muameleden sonra santrifüj yapılır. AD-SCs stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak adlandırılan, heterojen hücre popülasyonu içerir. Bu hücreler; fibroblast, kırmızı kan hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve preadipositlerdir. Taze izole edilmiş SVF kültür ortamına (DMEM, % 10 FBS) alınıp kültüre edilince yapışık (adherent) hücre popülasyonu çoğalmaya başlar ve çoğu kez birkaç pasajlama sonrası bu hücrelerin karyotip anormallikleri olmadan sayıları artar. Bu yapışık popülasyon AD-SCs olarak kabul edilir. Bu hücreler belirli yüzey mezenkimal belirteçleri açısından pozitif olarak karakterize edilirlerken (CD13, CD29, CD44, CD49, CD90 ve CD105 gibi) hematopoietik belirteçler (CD11, CD14, CD31, CD45 ve CD144) açısından da negatiftirler (16).

Birçok hastalığın tedavisinde, kök hücre bazlı tedavilerin kullanımı önemli hale gelmektedir. Yetişkin kök hücreler doku mühendisliğinde ve doku onarımında kullanım açısından en uygun hücreleri temsil etmekte ve minimal düzeyde müdahaleler ile elde edilebilmektedir. Buna ek olarak MKH, kök hücre temelli tedavilerde en sık kullanılan kök hücrelerdir ve kıkırdak, kemik, kas, yağ dokusu ve bağ dokusuna farklılaşabilme kapasitesine sahiplerdir. Eskiden kemik iliği, MKH'lerin ana kaynağı olarak kabul edilirken, son yıllarda, insandan elde edilen yetişkin adipoz dokunun, MKH

için en iyi, en uygun, alternatif kaynak olabileceği belirtilmektedir (17).

AD-SCs yetişkin insanların deri altındaki adipoz dokularından bol miktarda elde edilebilir. SVF direkt olarak çalışılabilir ya da yapışık popülasyonun ayrılması için kültüre edilebilir. Son yıllarda, SVF hücreleri ve AD-SCs'le ilgili literatürler oldukça artmıştır. Son yapılan çalışmalarda SVF ve AD-SCs'in *in vivo* hayvan modellerinde etkili ve güvenli olduğu gösterilmiştir. Bu gözlemlere dayanarak çoğu ülkede SVF ve AD-SCs içeren bazı klinik çalışmalara izin verilmiştir (17). Bu çalışmalar SVF hücrelerinin etkinliğini ve güvenli kullanımını *in vivo* olarak hayvan modellerinde ortaya koymuştur. *International federation for adipose therapeutics and science*'ın (IFATS) raporlarına göre AD-SCs birçok nedenden dolayı rejeneratif tıp uygulamaları için ideal görünmektedir. AD-SCs'in ideal olmalarındaki nedenler; noninvaziv, kolay ve etkin bir şekilde toplanıp saklanabilirler, işlenebilirler ve çoğaltılabilirler (17).

1960'larda Rodbell ve arkadaşları, ilk olarak AD-SCs izolasyon metodunu bildirmişlerdir. Daha sonra 2001 yılında, bu prosedür Zuk ve arkadaşları tarafından insan yağ dokusu örneklerinden kök hücre izolasyonu sağlamak için modifiye edilerek kullanılmıştır. Hala laboratuvar sonuçlarında kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanan tutarsızlıklar olabilmektedir. Bu sorunu aşmak için Nicoletti ve arkadaşları enzimatik parçalanma yöntemini kullanarak insan adipoz dokularından AD-SCs'i elde etmek için yeni bir standart protokol geliştirmişlerdir (17).



Şekil 7 : Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre izolasyonu (17)

Bu yeni protokol, AD-SCs'in saflık ve canlılığının daha yüksek oranda olmasını garanti eder. Tek bir standart protokolün kullanılması, otolog adipoz doku nakilleri yapan farklı kurumlar arasında takip ve izin belgeleri temini açısından kolaylık sağlar (17).

Zuk ve arkadaşları tarafından sunulan çalışmada AD-SCs'in multipotentliğinin ve verimliliğinin diğer MKH kadar etkili olduğu gösterilmiştir (18).

MKH'lerin bir çeşidi olarak AD-SCs rejeneratif tıpta terapötik ajanlar (tedavi edici hücreler) olarak önemli bir potansiyele sahiptirler. Sayısız hayvan çalışmalarında AD-SCs kas, kemik, kıkırdak ve tendon gibi diğer dokulara diferansiye edilerek AD-SCs'in multipotentliği gösterilmiştir. Ancak, insanlarda eklem içine

otolog AD-SCs enjeksiyonları yeni başladığından güvenilirliği konusunda veriler henüz yeterli değildir (19).

AD-SCs'i de içeren MKH, gelecekte rejeneratif tıp uygulamaları için büyük bir potansiyele sahiptirler. AD-SC's'in tedavi edici potansiyelleri; MKH üzerinde yapılan *in vitro*, *in vivo* ve klinik deneyler üzerinde gösterilmiştir. MKH kalça ve omurga kemik iliğinden; karın, uyluk ve kalça yağ dokularından kolayca elde edilebilir. İnsan kemik ve kıkırdak yenilenmesi için MKH'in özellikle de AD-SCs'in başarılı bir şekilde kullanıldığı birçok çalışmayla gösterilmiştir (19). Ancak tedavilerde otolog MKH kullanımı ile ilgili güvenilir veriler eksiktir. Centeno ve arkadaşları ortopedik uygulamalarda BMSC'in kullanımının güvenilirliğini ve komplikasyon oranlarını bildirmişlerdir. Ancak, ortopedik uygulamalarda AD-SCs kullanımının güvenli olduğuna dair henüz herhangi bir güvenilirlik verisi bulunmamaktadır (19).

Ele alınması gereken güvenlik konularından biri, bu kök hücrelerin tümör oluşturabilme potansiyelleridir. Bu endişeye, *in vitro*da kültüre edilen MKH'lerde (AD-SCs içermeyen) kromozomal anormalliklerin bildirilmesi sebep olmuştur. Ancak bu hücreler *in vitro*da 60 günden daha az süreyle kültüre edildiğinde, hücre mutasyonu veya tümör oluşumu riskinin olmadığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Ayrıca insanlarda kartilaj onarımı için kullanılan otolog MKH'in uzun süreli izlemlerinde tümör oluşturmadıkları gösterilmiştir. Bugüne kadar insanların klinik tedavisinde kullanılan MKH'in güvenli tedavi edici ajan oldukları bildirilmiştir (19).

Çok fonksiyonel bir metabolik doku olan adipoz doku, MKH'den zengindir. Yapılan bir çalışmada obez hastaların beyaz yağ dokusu hücrelerinden (WAT) izole edilen AD-SCs'in farklılaşma

potansiyellerinin daha düşük olduğu ve daha az proanjiyogenik oldukları bildirilmiştir. Bu nedenle obez hastaların adipoz dokularındaki AD-SCs'in spontan veya terapötik onarım kapasitesi obez olmayan metabolizması normal bireylere göre daha düşüktür (20).

Son 10 yılda birçok çalışmada PRP veya AD-SCs kardiyovasküler çalışmalardan kornea uygulamalarına kadar çok çeşitli alanlarda kullanıldığı bildirilmiştir. Yine de, PRP ve AD-SCs'in pratik uygulamalarında bir takım sınırlamalar vardır. AD-SCs'in üretimi için iyi üretim uygulamaları (GMP) yöntemlerine gereksinim vardır. Ayrıca bazı çalışmalarda AD-SCs'in malign hücrelere dönüşme potansiyelinin olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle kök hücre bazlı tedaviler için birçok çalışmada PRP ve AD-SCs etkinlik ve güvenilirlik açısından araştırılmaktadır (21).

MKH'in izolasyonu için adipoz doku, kemik iliğine göre daha ulaşılabilir, verimli ve güvenilir bir bölgedir. Adipoz doku her gramında 100 000 MKH içerir. Kollajenaz sindiriminin ardından adipoz dokunun santrifüjü sonrası elde edilen SVF adipoz doku kökenli stromal hücreler olarak düşünülebilir. SVF 'nin içeriğinde sadece AD-SCs yoktur; bunun dışında endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler, fibroblastlar, lökositler, hematopoetik kök hücreler veya endotelyal progenitör hücreler gibi pek çok hücre türlerini de içerir. AD-SCs üretimi için GMP yöntemlerine gereksinim duyulmasının sebebi, çok miktarda hücre elde edilmesi için *in vitro* ortamda çoğaltılmaya gereksinim duyulduğundan; çoklu pasajlarda MKH'lerin fenotipik ve genotipik dengesini korumak gerekliliğidir. Ancak bu işlem çok masraflıdır ve çok zaman alıcıdır. Ayrıca AD-SCs'in *in vitro* çoğaltılabilmelerini sağlamak için Food and Drug Administration (FDA)'dan onay almak gerekmektedir. Bu süreç karmaşık ve zordur. Hücre tabanlı tedavinin kozmetik cerrahide

kullanımı kolaydır ve sistematik etki riski düşüktür. SVF yüzeysel bir hazırlık olarak kabul edilebilir. Çünkü nispeten hızlıca hazırlanır ve her ne kadar başka hücreler içerse de uygulama bölgeleri için yeterli oranda AD-SCs'i sağlayabilir. Bu nedenle, bazı cerrahi uygulamalar için, AD-SCs'in saflığı cerrahi kolaylık lehine feda edilebilir. Ancak SVF'nin yararlı etkileri henüz bilimsel olarak kanıtlanmış değildir. SVF çoğunlukla plastik ve rekonstrüktif cerrahide meme büyütme ya da şekil bozukluklarının tedavisi için yağ dolgusu amacıyla kullanılmaktadır. Yoshimura'nın araştırmaları hücre destekli yağ transferi olarak bilinen bir strateji üzerine odaklanmıştır. Bu yöntemde SVF lipoaspiratın yarısından izole edilmektedir ve re-enjeksiyon sırasında lipoaspiratın geri kalan diğer yarısıyla rekombine edilerek uygulanmaktadır (21).

2.2.Trombositten Zengin Plazma (PRP)

PRP, küçük bir hacimde yüksek konsantrasyonda otolog insan trombositleri içeren plazmadır. PRP trombositlerdeki alfa granüllerin degranülasyonu ile etkili olur. Alfa granüllerinde 7 temel büyüme faktörü bulunur. Bunlar; trombosit (platelet) büyüme faktörünün 3 izomeri (PDGF- $\alpha\alpha$, PDGF- $\alpha\beta$, ve PDGF- $\beta\beta$), dönüştürücü (transforming) büyüme faktörünün 2 izomeri (TGF- β 1 ve TGF- β 2) , vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve epitelyal büyüme faktörü (EGF) 'dür (21).

Büyüme faktörlerinin aktif salgısı kanın pıhtılaşma süreci ile başlar. Pıhtılaşmadan sonra 10 dakika içerisinde başlayan bu süreçte daha önceden sentezlenip depolanmış olan büyüme faktörlerinin %95'den fazlası 1 saat içerisinde salgılanmış olur. Bu nedenle PRP antikoagüle bir durumda hazırlanmalı ve pıhtılaşmanın başlatılmasından sonraki 10 dakika içerisinde uygulama bölgesinde

kullanılmalıdır. Bu ilk salgılamamanın ardından trombositlerde yeni ilave proteinler (büyüme faktörleri) sentezlenir ve salgılanır ve salgılanma trombositlerin yaşamına bağlı 5-10 gün sürer (21).

PRP'nin anjiyogenez (damar oluşumu) sürecindeki ve farklılaştırılmamış (undifferentiated) kök hücrelerin çoğalmasındaki pozitif etkileri deneysel olarak gösterilmiştir. Anjiyogenez ile ilgili olarak Eppley ve arkadaşları, PRP'nin uygulandığı bölgenin yakınındaki endotelial hücreleri uyarak çoğalmasını ve yeni kılcal damar oluşumunu desteklediğini bildirmişlerdir. Ayrıca *in vitro* bir çalışmada Hu ve arkadaşları, PRP uygulayarak sıçan kemik iliği stromal hücre farklılaşmasını indüklemişler ve bu sırada PDGF ve VEGF'nin mRNA ekspresyonunda artış belirlemişlerdir. Böylece, PRP'nin anjiyogenezi başlatarak, kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerini iyileştirerek ve kemik yenilenmesini başlatarak etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

PRP hem farklılaştırılmamış kök hücrelerin çoğalmasını uyarabilir hem de hücre farklılaşmasını stimüle ederek doku yenilenmesini sağlayabilir. Farklılaştırılmamış kök hücreler PRP'nin büyüme faktörlerinin yoğun olduğu yere göç ederler ve büyüme faktörleri bu bölgeye gelen kök hücrelerin çoğalmasını tetiklerler. Bazı araştırmacılar trombositler kemik morfojenik proteini (BMP) içermediklerinden PRP'nin kemik iyileşmesindeki bu yararlı etkilerinin yumuşak doku iyileşmesindeki olumlu etkilerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir (21).

Klinik çalışmaların çoğunda PRP'nin iyileşmesi zor olan yaralarda, maksillofasiyal kemik defektlerinde ve kozmetik cerrahideki uygulamalarda başarılı olduğu bildirilmiştir. Ancak, PRP'nin az yararlı olduğu ya da hiçbir yararının olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmaların başarısız olma

nedeninin yetersiz cihazlarla ya da kitlerle üretilen düşük kaliteli PRP olduğu söylenebilir. Çünkü günümüzde pazarlanan PRP hazırlama kitlerinin hepsi aynı kalitede değildir. PRP üretimine ve karakterizasyonuna ilişkin yeterli fikir birliği yoktur. İlk olarak, PRP içeriğindeki trombositlerin başlangıçtaki konsantrasyonuna göre artış derecesi için tek bir öneri yoktur. Bazı araştırmacılar PRP'nin başlangıçtaki trombosit konsantrasyonundan 3 ila 8 kat artış göstermesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir. İkinci olarak, santrifüj işlemi steril koşullarda olmalıdır. Trombositler kırmızı kan hücrelerinden tam olarak ayrılmalıdır ve ayrılma işlemi trombositlerin parçalanmamasına ve zarar görmemesine dikkat edilerek gerçekleştirilmelidir. Böylece PRP aktif büyüme faktörlerini salgılayabilir. Trombosit canlılığını ölçmek için kullanılan testler pH, hipotonik stres, P-selektin ve trombosit agregasyonu düzeylerini içerir. P-selektin, alfa granüllerinin membranının iç yüzünde yer alan bir proteindir. Trombosit aktivasyonu sırasında alfa granül membranı trombosit membranı ile birleşir (füzyon) ve P-selektin trombosit yüzeyinde eksprese olur. Böylece P-selektin ölçülerek trombosit aktivasyonunun derecesi belirlenebilir. P-selektin düzeyinin düşük olması trombositlerin daha kaliteli olduğu anlamına gelir. Bu nedenle, P-selektin ölçümü PRP hazırlanmasının başarısı hakkında önemli bilgiler sağlar (21).

PRP, otolog bir hazırlama yöntemi olduğu için güvenlidir ve bu nedenle HIV, hepatit, Batı Nil humması ve Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD) gibi bulaşıcı hastalıklar açısından endişelenilmemelidir. Buna rağmen PRP'nin güvenilirliği son günlerde sorgulanmaktadır. PRP'nin PH değeri 6.5 ila 6.7 arasındadır. Olgun bir kan pıhtısının ise 7.0 ila 7.2 arasındadır. PRP aktivasyonu için kullanılan en yaygın yöntem, PRP'ye kalsiyum klorür ve trombin eklenmesidir (21).

Trombositler içerisinde bulundurdukları büyüme faktörleri ve mediatörler ile doku yenilenmesinde önemli rol oynarlar. *In vitro*'da kalsiyum klorür ile aktive edilen trombositlerin, büyüme faktörlerinin salınımının hemen indüklendiği gösterilmiştir. Otolog kandan elde edilen PRP, otolog büyüme faktörlerini yüksek oranda içerir. PRP'nin kalsiyum klorür ile muamele edilmesiyle trombositlerin degranülasyonu indüklenir. PRP hücre kültürlerinde otolog MKH'in çoğaltılması ve farklılaştırılması için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (19).

Genel olarak PRP ve AD-SCs otolog olduğundan, temel araştırmalarda ve prelinik çalışmalarda kullanımının diğer hücre bazlı terapilere göre daha güvenli ve pratik olduğu bilinmektedir. Son 10 yılda birçok çalışmada PRP veya AD-SCs kardiyovasküler çalışmalardan kornea uygulamalarına kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmışlardır. Ancak PRP ve AD-SCs'in pratikteki uygulamalarında belirli sınırlamalar vardır. PRP'nin tedavi etme potansiyelini belirlemek için bazı küçük çaplı temel çalışmalar ve prelinik uygulamalar yapılmıştır. Çalışmaların çoğu mükemmel sonuç vermesine rağmen birçoğu sınırlı olgu çalışmaları ya da serilerden oluşmaktadır. AD-SCs'nin ise *in vivo* ve *in vitro*'daki yararlı etkileri bilimsel olarak kanıtlanmıştır (21).

Otolog PRP ilk olarak 1987 yılında Ferrari tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Ferrari M. ve arkadaşları otolog PRP'yi kalp cerrahisinde kullanmışlardır (22). Günümüzde PRP'nin diğer kullanım alanları;

2.2.1. PRP Uygulama Alanları

- Diş hekimliği
- Oral maksillofasiyal cerrahi (Ağız, çene, yüz cerrahisi)
- Plastik cerrahi
- Ortopedi
- Romatoloji
- Kronik yaralar ve kas, tendon zedelenmelerinin tedavisinde
- Dermatoloji ve kozmetoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır (23).

PRP alfa granüllerinde sayısız büyüme faktörü barındırır ve bu büyüme faktörleri çok önemlidir. PRP iğesindeki bazı büyüme faktörleri Tablo 2 'de gösterilmiştir (24).

epidermal büyüme faktörü	EGF
platelet büyüme faktörü	PDGF
transforming büyüme faktörü alpha	TGF- α
transforming büyüme faktörü beta	TGF- β 1
keratinosit büyüme faktörü veya fibroblast büyüme faktörü-7	KGF veya FGF-7
fibroblast büyüme faktörü-1 ;asidik	aFGF veya FGF-1
fibroblast büyüme faktörü-2 ; bazik	bFGF veya FGF-2
vasküler endotelial büyüme faktörü	VEGF

bağ dokusu büyüme faktörü	CTGF
granülosit/makrofaj koloni- uyarıcı faktör	GM-CSF veya CSF- α
insulin benzeri büyüme faktörü	IGF
tümör nekrozis faktörü-alfa	TNF- α
interlökin-1 β	IL-1 β
interlökin-8	IL-8

Tablo 2: PRP büyüme faktörleri ve kısaltmaları (24)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma-Aldrich firmasına aittir.

Kullanılan malzemeler :

Kollajenaz Tip IV (SIGMA)
PBS
FBS
CaCl ₂
Distile Su
Tripsin-EDTA
Penisilin-Streptomisin
Serumlu Besi Ortamı
Trypan Blue
Serumsuz Besi Ortamı
DMEM
T3
Deksametazon
Apo Transferrin
İnsülin
IBMX
Rosiglitazon
Oil Red
Isopropanol
Alkol
Ksilen
Blocking Buffer
Antikorlar (CD34, CD45, CD90, CD105)
0.2µm Naylon Filtre
Falkon tüpler
Flask

Plak (plate)
Steril Lameller
Toma Lamı
Petri kapları
Entellan
Mikrotüpler
Pipet ve pipet uçları

Tablo 3 : Kullanılan malzemeler

3.1. MKH'lerin Adipoz Dokudan İzolasyonu

Kollajenaz tip IV hazırlama :

0,1 mg/ml konsantrasyonda kollajenaz stok hazırlamak için,

- 5 gr kollajenaz tartıldı ve 50 ml serumsuz besi ortamı içinde çözüldü.
- Bu solüsyon kullanılmadan önce 0,2 µm'lik naylon filtreden geçirildi.
- Çalışma sırasında stok solüsyonu distile su ile 10 kat seyreltildi.
- 0,01 mg/ml olan son konsantrasyon (final concentration), lipoaspirattaki yağ parçacıklarının çözülmesi için kullanıldı.

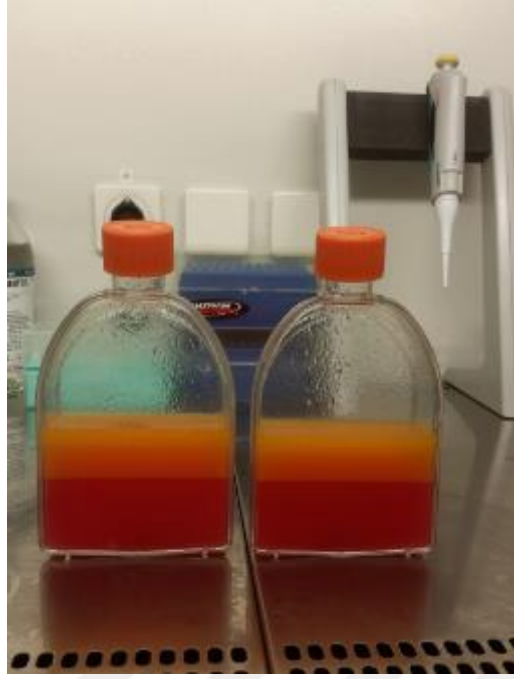
1) Etik onay alınarak temin edilen lipoaspiratın üstündeki ince yüzen sıvı yağ tabakası uzaklaştırıldı.

2) Sıvı yağ tabakasının altında kalan katı yağ dokusu tabakasının altındaki tabakada bulunan kan ve PBS kısmı da 50 ml'lik pipetle tamamen uzaklaştırıldı.



Resim 1: Lipoaspirattaki yağ hücrelerinin ayrıştırılması

- 3) Geride kalan yağ dokusu üzerine eşit miktarda 1xPBS eklendi ve iyice karıştırılarak 5 dk bekletildi.
- 4) Yağ hücreleri yukarıda, kan ve PBS aşağıda kalacak şekilde ayrıştırıldı.



Resim 2 : Yağ hücrelerinin yıkama işlemlerinden sonra 2 flaska ayrılması

5) Altta kalan kan ve PBS kısmı tekrar uzaklaştırıldı. 3-5 arasındaki basamaklar yağ tabakası altın sarısı renginde elde edilinceye kadar yıkama işlemlerine devam edildi. (En son yıkamada altta kalan PBS tabakası da pembeden beyaza dönüştü.)

6) Yıkama işlemleri sırasında lipoaspirat 5'er dk bekletildi ve altta kalan ve şeffaflaşan PBS tabakası dikkatle uzaklaştırıldı.

7) Yağ tabakası ile eşit miktarda Tip IV Kollajenaz hazırlandı ve filtreden geçirildi.

8) Yıkanmış lipoaspirat materyali 1:1 oranında Tip IV Kollajenaz ile karıştırılarak inkübatöre yerleştirildi.

9) 37 °C'de 30 dk inkübe edilirken 5-10 dakikada bir karıştırıldı.



Resim 3 : Kollajenaz eklenen hücrelerin inkübasyonu

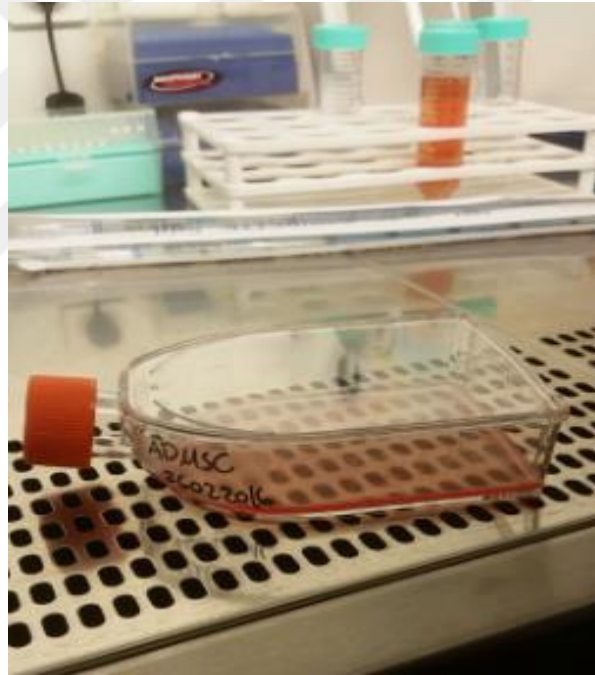
- 10) Enzimatik aşamanın sonunda yağ tabakası tamamen çözüldü.
- 11) Alttaki SVF'de yer alan hücre tabakası 25 ml şeklinde 50 ml'lik falkonlara aktarıldı ve üzerine 25 ml %20'lik FBS içeren serumlu besi ortamından eklendi.
- 12) Kollajenazın inaktive olması için 5 dk oda ısısında bekletildi.
- 13) 10 dk 1200 rpm'de santrifüj edildi.
- 14) Üstteki süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve alttaki SVF 50 ml'lik 2 falkona ayrıldı.
- 15) 10 dk 1200 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı.

16) Kırmızı kan hücreleri varsa 10 ml Red Blood Cell Lysis Buffer ekleyip 10 dk oda ısısında bekletildi.

17) Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dipteki kısım %20-%40 FBS içeren besi ortamı içinde kültüre edildi.

18) 4-5 gün 37 °C'de flasklar hareket ettirilmeden inkübe edildi.

19) Daha sonra kan hücreleri ve yüzeye yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı ve yeniden serumlu besi ortamı eklendi.



Resim 4 :İnkübasyona bırakılacak olan hücreler

3.2. PRP Hazırlama Yöntemi

1) 20 ml'lik kan örnekleri 50 ml'lik falkon tüplere aktarıldı.



Resim 5 : Gönüllülerden alınan kan örnekleri

2) 300 g'de 10 dk oda ısısında santrifüj edildi.

3) Kanı karıştırmadan çok yavaş bir şekilde tüpler santrifüjden alındı ve steril kabine koyuldu.

4) Bütün plazma ve buffy coat kısmı dikkatle 15 ml'lik falkona aktarıldı.

5) 3000 g'de 15 dk oda ısısında santrifüj edildi.

6) Üstte kalan *platelet poor plasma* (trombositten fakir plazma) atıldı.

7) Alttaki fazda 2×10^6 trombosit/ml elde edildi.

8) PRP kullanılacağı zaman 5 ml %10 CaCl_2 ile aktifleştirildi.

%10'luk CaCl₂ solüsyonu hazırlama yöntemi

1 ml distile suda 100 mg CaCl₂ ya da 100 ml distile suda 10 gr CaCl₂ çözülerek hazırlandı.

3.3. Kök Hücrelere PRP Muamelesi

1. İnkübatörden alınan %90 konfluent (konfluensi'ye ulaşmış) olan flasklardaki besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. T75 cm²'lik flaska 3-4 ml , T25 cm²'lik flaska 2 ml PBS ekleyerek yıkama işlemi yapıldı.
3. T75 cm²'lik flaska 3 ml , T25 cm²'lik flaska 1 ml %0.25 ml tripsin-EDTA enzimi eklendi 6-10 defa çalkalanıp fazlası uzaklaştırılıp 3 dk inkübatörde bekletildi.
4. İnkübatörden alınan flasklar avuç içine vurularak yapışık hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağladıktan sonra mikroskop altında incelendi.
5. Flasklara %20'lik FBS içeren besiyeri eklendi. (T25 cm²'lik flaska 2 ml, T75 cm²'lik flaska 6 ml FBS'li besiyeri eklendi). FBS eklenmesiyle enzim aktivitesi durduruldu.
6. FBS'li besiyeri yüzeye temas ettirilerek iyice karıştırıldı. Hücreler ve FBS pipetleme yöntemiyle karıştırılarak hücreler dikkatlice ayrıştırıldı.



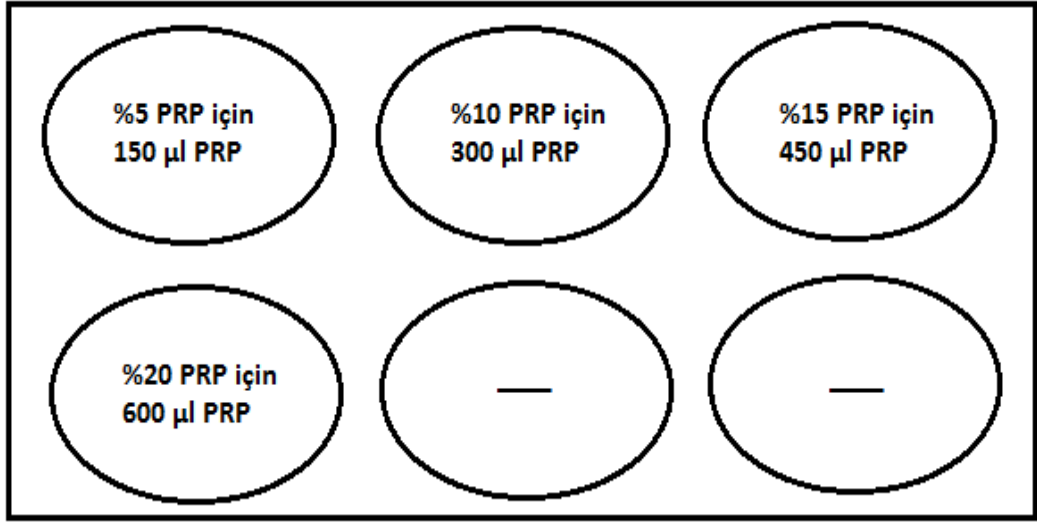
Resim 6 : Hücrelere besi ortamı muamelesi

7. 2 flastaki hücreler alınarak 15 ml'lik bir falkona koyuldu.
8. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
9. Santrifüjden çıkarılan falkonun süpernatantı tamamen uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücrelerin üzerine 1 ml serumlu besi ortamı eklenerek pipetleme yapıldı.
10. 96'lık plaklara 30 μ l hücrelerden ekleyip üzerine aynı miktarda %0.5'lik trypan blue boyası eklendi. Nubar lama yerleştirilerek mikroskopta sayım yapıldı.
11. 1 ml PRP başına 50 μ l %10 CaCl_2 'den eklendi.

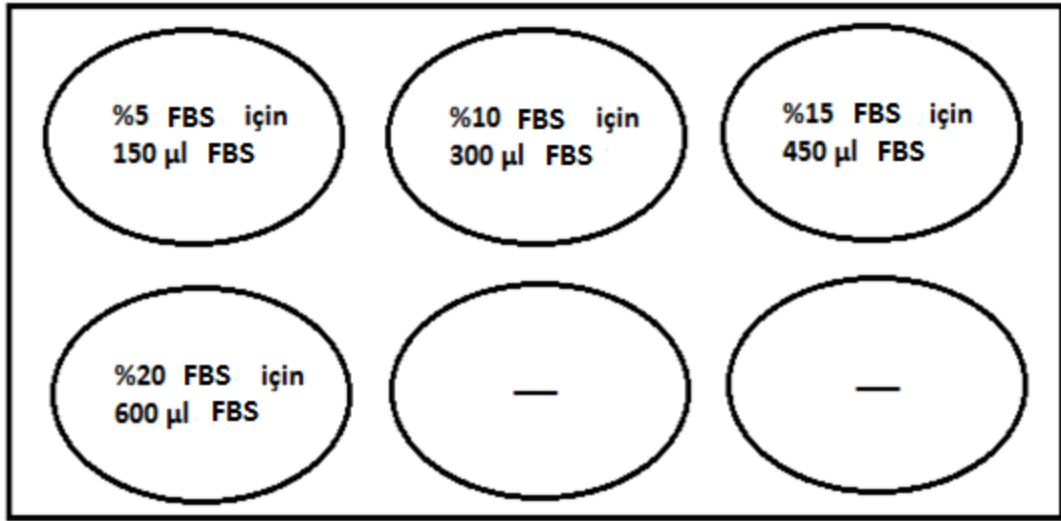
12. 2 adet 6 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna Şekil 8 ve 9'da gösterildiği gibi PRP ya da FBS eklendikten sonra serumsuz besi ortamı eklenerek 3'er ml'ye tamamlandı ve her kuyucuğa 20.000 hücre eklendi.



Resim 7 : Plaklara ekim yapılması



Şekil 8 :Plaklara farklı oranlarda PRP eklenmesi



Şekil 9 :Plaklara farklı oranlarda FBS eklenmesi

13) Plaklar inkübatöre kaldırıldı ve 3 gün sonra çıkarılıp tekrar hücre sayımı yapıldı.



Resim 8 : Hücre sayımı

3.4. AD-SCs'in Adiposit Yağ Hücrelerine Farklılaştırılması

- 1) 3×10^5 AD-SCs steril lamel üzerinde 6 kuyucuklu plaklarda normal besiyerinde kültüre edildi. PRP ya da FBS içeren 2 farklı grup oluşturuldu.
- 2) Hücreler %80 konfluent olana kadar 37°C 'de inkübatörde bekletildi.
- 3) Besi ortamı uzaklaştırıldı.
- 4) İlk önce İndüklenme besiy ortamı eklendi. Bu besiy ortamı 2 günde bir yenilenerek 6 gün kültüre edildi.
- 5) Ardından Adiposit farklılaştırma besiy ortamı eklendi. Hücreler 2 hafta kültüre edildi. Besiy ortamları 2 günde bir yenilendi.

İndüklenme besi ortamı : İçeriği; %20 FBS ya da %20 PRP içeren DMEM, 0,2 μ M T3, 1 μ M deksametazon, 10 μ g/ml Apo transferrin, 0,85 μ M insülin ve 500 μ M IBMX)

Adipositlere farklılaştırma besi ortamı : İçeriği; %20 FBS ya da %20 PRP içeren DMEM, 0,2 μ M T3, 10 μ g/ml Apo transferrin, 0,85 μ M insülin, 1 μ M rosiglitazon.

3.5. Oil Red Boyama

AD-SCs'in adipositlere dönüşmesini kontrol etmek için Oil Red boyama işlemi yapıldı.

- 1- Farklılaştırma besi ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 2 ml PBS ile yıkandı.
- 2- Hücreler uygun bir fiksatif (%4 paraformaldehit) ile muamele edildi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml distile su ile yıkandı.
- 3- 1.5 ml %60 isopropanol ilave edilerek 5 dk bekletildi.
- 4- İsoopropanol uzaklaştırıldı. 1.5 ml Oil red solüsyonu ilavesi yapıldı ve 5 dk inkübe edildi.
- 5- Oil red uzaklaştırıldı ve distile su ile 5 dk bekletilerek 2 kez yıkandı.
- 6- Hücreler ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

3.6. İkilenme Süresinin (Doubling Time: *dt*) Hesaplanması

- 1- AD-SCs 6 kuyucuklu plaklara konuldu. (Her kuyucukta 20.000 hücre olacak şekilde)
- 2- 72 saat kültüre edildi.
- 3- Trypsin ile hücreler kaldırıldı.
- 4- Trypan blue ile hücreler boyandı.

5- Toma Lam ile hücreler ışık mikroskopunda sayıldı.

Kırmızıya boyanan hücrelerin hesaplanması

Oil Red boyamadan sonra, kırmızıya boyanan hücreleri hesaplamak için 'ImagJ' programı kullanıldı. <https://imagej.nih.gov/ij/>)

PRP veya FBS içinde adipositlere farklılaştırılmış hücreler:

%20 PRP.....> %25 farklılaştı

%20 FBS> %7 farklılaştı

3.7. Flow sitometri Yöntemi

- 1- Hücreler T75 cm²'lik flasklarda 48 saat kültüre edildi.
- 2- Trypsin ile hücreler kaldırıldı.
- 3- 1200 rpm'de , 5 dk santrifüj edildi.
- 4- 1 defa PBS ile yıkandı.
- 5- 1200 rpm'de , 5 dk santrifüj edildi.
- 6- Hücrelere *blocking buffer* eklendi.
- 7- Hücreler +4 °C'de 30 dk bekletildi.
- 8- Hücre sayımı yapıldı.



Resim 9 : Flow Sitometri Cihazı

3.8. Hücre Sayımı

- 1- 1,5 ml'lik mikrotüplerin her birine 500.000 hücre eklendi. (4 tüp+ kontrol)
- 2- 1200 rpm , 3 dk santrifüj edildi.
- 3- Süpernatant atıldı.
- 4- 100 µl blocking buffer eklendi.
- 5- Her tüpe 10 µl farklı antikor eklendi. (CD45, CD34, CD90, CD105)
- 6- 45 dk buz üzerinde çalkalayıcıda bekletildi.
- 7- Üzerlerine 1 ml staining buffer (boyama tamponu) eklendi ve 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.
- 8- Son santrifüj işleminden sonra 100 µl PBS eklendi.

9- Flow sitometri cihazında (BD Accuri C6 Flow Cytometer) okundu.

3.9. İkilenme Süresi Formülü

$$dt = \text{Doubling time} = \frac{\text{bekletme süresi (saat)} \times \log(2)}{\log(\text{son konsantrasyon}) - \log(\text{ilk konsantrasyon})}$$

Başlangıçta 20.000 hücre vardı. 6 kuyucuklu plaklarda, 5. pasaj hücreleri kullanıldı ve 72 saat sonra ikilenme süreleri hesaplandı.

3.10. Trypan Blue ile Canlılık Testi

Canlılık testi, %20 PRP veya %20 FBS içeren besi ortamında kültüre edilen hücrelerle yapıldı. Canlı ve ölü hücre adetleri sayıldı ve ml'deki hücre miktarları verildi.

3.11. İstatistiksel Veri Analizi

Bu çalışmadaki veriler, SPSS 18 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılarak, grup karşılaştırmaları ve analizleri için Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık açısından $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında ise one-way ANOVA testi kullanıldı.

4. BULGULAR

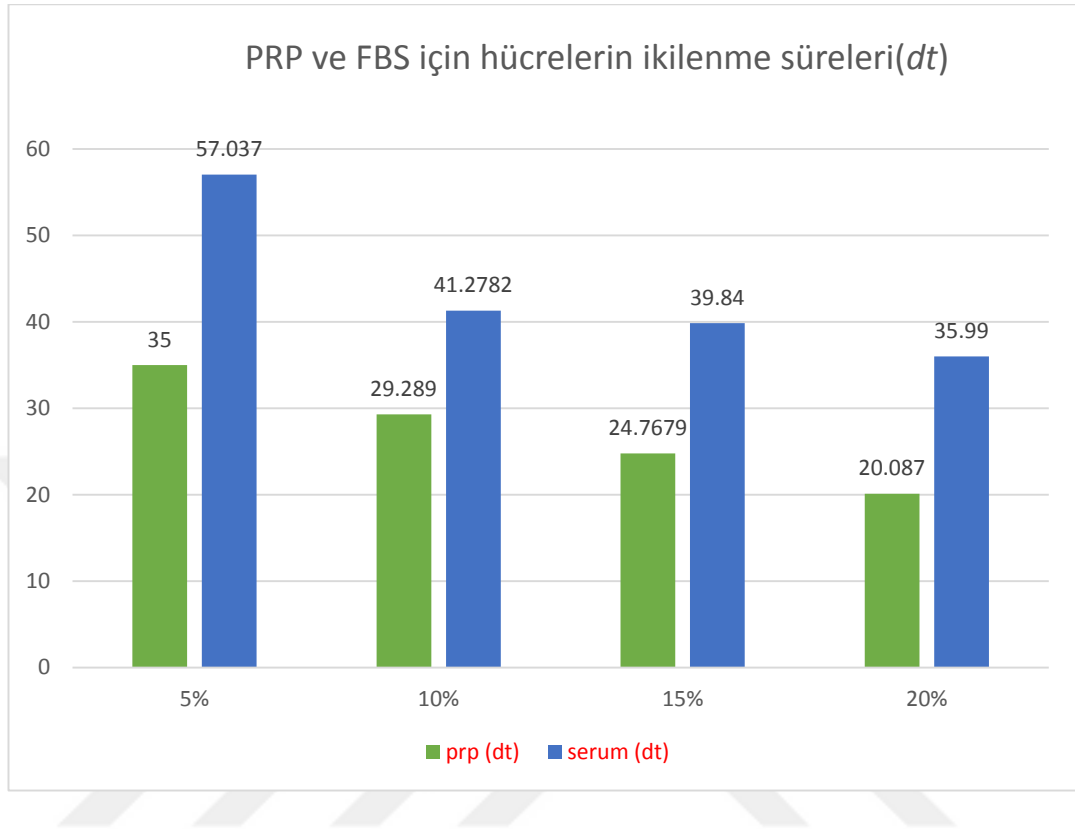
İkilenme süresi (Duplication time: dt) olarak kültür ortamında %5-20 oranlarında PRP kullanılan hücreler %5-20 oranlarında FBS kullanılan hücrelere göre yaklaşık 2 kat daha hızlı farklılaştı. PRP kullanılan hücrelerin canlılığı daha iyiydi. (içerdikleri yoğun orandaki büyüme faktörlerinden dolayı)

%	PRP hücre sayısı→ dt (saat)	FBS hücre sayısı→ dt (saat)
5	0.8×10^5 hücre→ 35 saat	0.48×10^5 hücre→ 57.037 saat
10	1.1×10^5 hücre→29.289 saat	0.67×10^5 hücre→ 41.2782 saat
15	1.5×10^5 hücre→ 24.7679 saat	0.7×10^5 hücre→ 39.84 saat
20	2.4×10^5 hücre→ 20.087 saat	0.8×10^5 hücre→ 35.99 saat

Tablo 4 : PRP ve FBS için hücre sayıları ve ikilenme süresi
(istatistiksel açıdan anlamlılık değeri $p < 0.05$)

PRP kullanılan hücreler 2 günde %80 konfluent oldular. FBS kullanılanlar ise 3 günde %80 konfluent oldular. 2 kültür de konfluent olduktan sonra 21 gün farklılaşma için bekletildi ve oil red boyama uygulandı. Oil red boyamanın sonucuna göre PRP kullanılan kültürler FBS kullanılan kültürdeki hücrelere göre 2 kat daha fazla ve daha hızlı çoğaldıkları tespit edildi.

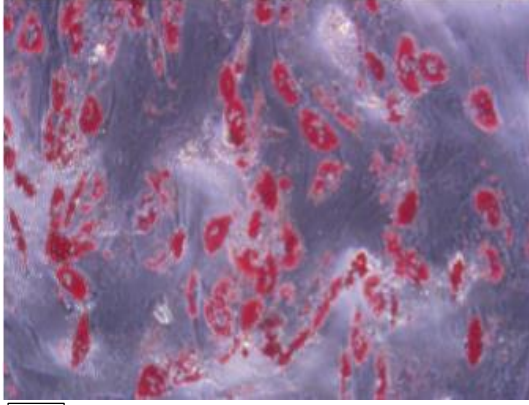
4.1. PRP ve FBS için İkilenme Süreleri



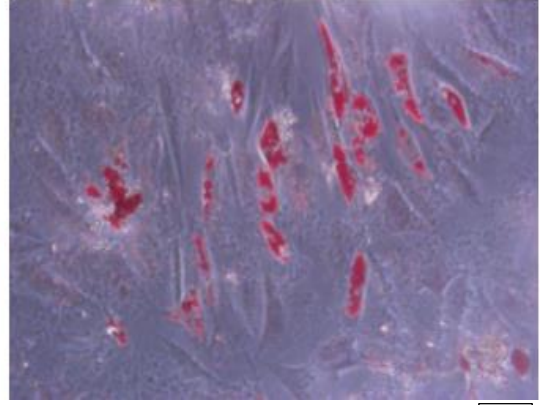
Grafik 1 : PRP ve FBS için hücrelerin ikilenme süreleri(dt)(istatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$)

4.2. Oil Red Boyama Sonuçları

Oil Red

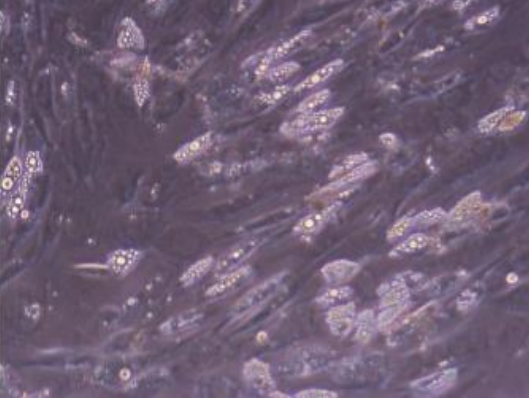


A

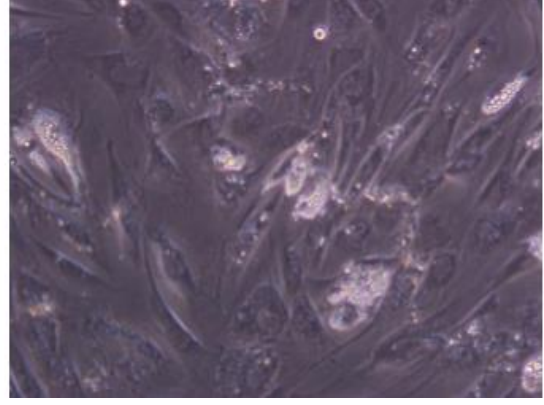


B

Farklılaşma

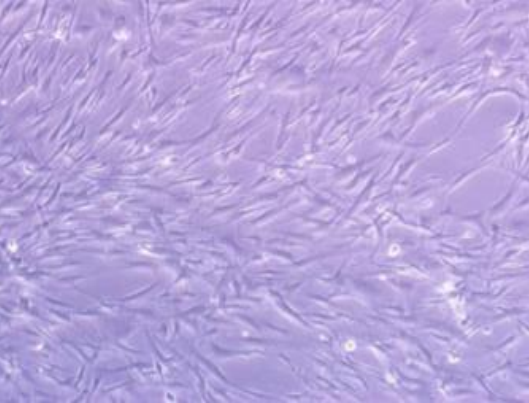


A

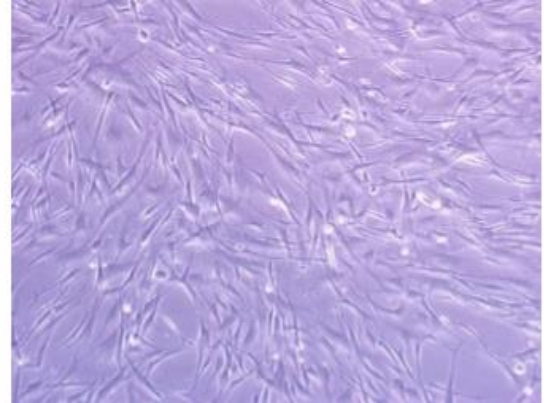


B

%80 konfluent MKH



A



B

PRP ile

FBS ile

Resim 10 :Oil Red boyama sonucu PRP ve FBS'li hücrelerin yoğunluğu

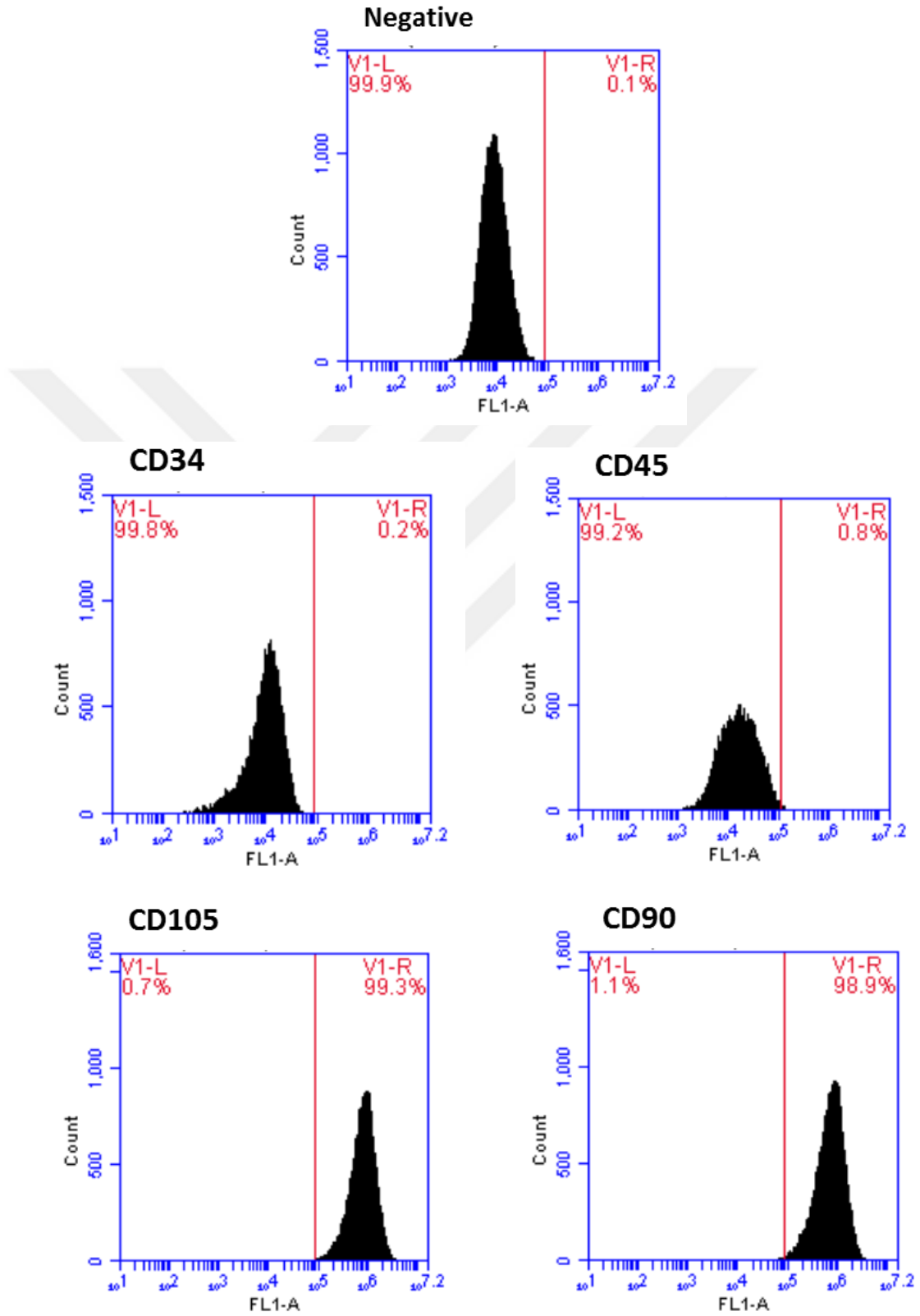
A ve B'deki adipojenik farklılaşma besi ortamları aynı, sadece farklı olarak A'da PRP, B'de FBS kullanıldı. PRP kullanılan hücreler daha fazla, FBS kullanılan hücreler ise daha az farklılaştı.

İkilenme süreleri; PRP kullanılan hücreler FBS kullanılan hücrelere göre yaklaşık 2 kat daha hızlı farklılaştı.

PRP içerdiği yoğun büyüme faktörleri nedeniyle PRP kullanılan hücrelerin FBS'li hücrelere göre canlılığının daha iyi olduğu gözlemlendi.

Boyanmamış hücreler; PRP içeren hücreler 2 günde %80 oranında konfluent olurken, FBS içeren hücreler 3 günde %80 oranında konfluent oldular. %80 oranında *konfluensi* sonrası iki kültüre de 21'er gün farklılaşma dönemi tanındı. Farklılaştırma fotoğrafları besi ortamları eklendikten sonra görüntülendi.

4.3. Flow sitometri Sonuçları



Resim 11 : Flow Sitometri sonuçları

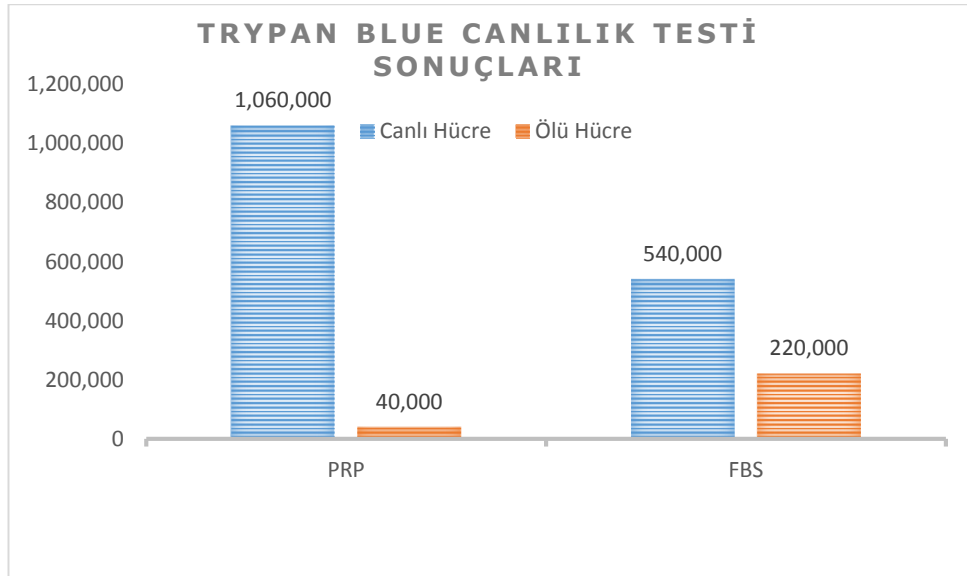
Flow sitometri sonuçlarına göre AD-SCs, CD34 ve CD45 yüzey belirteçleri için negatif sonuç verirken; CD90 ve CD105 yüzey belirteçleri için pozitif sonuç verdi.

4.4. Trypan Blue Canlılık Testi Sonuçları

Trypan Blue Testinde PRP'de 53 canlı 2 ölü hücre, FBS'de 27 canlı 11 ölü hücre görüldü.

PRP; T75 cm²'lik flaskta (1ml'de)
53 x 20.000 (canlı hücreler için)
2 x 20.000 (ölü hücreler için)

FBS; T75 cm²'lik flaskta (1ml'de)
27 x 20.000 (canlı hücreler için)
11 x 20.000 (ölü hücreler için)



Grafik 2 : Trypan Blue Canlılık Testi Sonuçları

5. TARTIŞMA

PRP, tam kanın santrifüj edilmesiyle elde edilen ve tam kandan daha yüksek oranda trombosit konsantrasyonuna sahip olan hücresel içerikli plazma komponentidir (22).

PRP uygulaması, insandan alınan az miktardaki kanın özel bir santrifüj işleminden geçirilerek, üstte kalan plazma ve dibe çöken eritrositler arasında bulunan ve trombositlerden zengin olduğu için PRP denilen plazmanın yine aynı kişiye enjeksiyon yoluyla geri verilmesi işlemidir. PRP yüksek oranda büyüme faktörü içermektedir. Trombositlerden salınan büyüme faktörleri hücrelerin onarım mekanizmasını devreye sokmaktadır ve böylece yaraların iyileşmesi, cildin onarımı, kemik ve kıkırdak rejenerasyonu gibi hasarlı bölgelerin tedavisinde etkin bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Otolog PRP ilk olarak 1987 yılında Ferrari M. ve arkadaşları tarafından kullanılmaya başlanmıştır ve kalp cerrahisinde kullanılmıştır (24).

2014 yılında Richard J. Griffeth ve arkadaşları yunuslarda rejeneratif tıp uygulamaları kapsamında PRP'yi ve AD-SCs'i birlikte uygulamışlardır. Bu çalışma yunuslardaki yaraların PRP ile tedavi edilebileceğini göstermiştir. Bu çalışmada 9 farklı yunustan tam kan örnekleri toplanmıştır ve trombositleri iki katından fazla konsantre eden basit bir özgün protokol geliştirilmiştir (25).

Geleneksel adipoz doku naklinde (transplantasyonunda) hücrelerin yaşama yeteneği oldukça düşüktür ve zayıf absorpsiyon oranına sahiptirler. Güncel çalışmalar PRP, SVF ve AD-SCs'in kombinasyonu ile tedavinin nakledilen adipoz dokunun sağ kalım oranını arttırdığını bildirmektedir. 2014 yılında Deok-Yeol Kim ve arkadaşları bu konuda yaptıkları çalışmalarında PRP, AD-SCs ve SVF kombinasyonu ile nakillerin sağ kalımının ilk olarak eş

zamanlı kıyaslamasını yapmışlardır ve olumlu sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir (26).

2014 yılında Ariadne Cristiane Cabral Cruz ve arkadaşları, kemik rejenerasyonu ve maturasyonunda PRP'ye kombine edilen insan AD-SCs'in *in vivo* etkinliğini değerlendirmişlerdir ve PRP ile birlikte AD-SCs kombinasyonunun kemik rejenerasyonunu ve *in vivo* kemik maturasyonunu geliştirdiğini göstermişlerdir (27).

2014 yılında Jaewoo Pak ve arkadaşları, 43 yaşında erkek bir hastada AD-SCs ve PRP kombinasyonu ile femur başı avasküler nekrozunun tedavi edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada AD-SCs içeren SVF, PRP ve hyaluronik asit ile karıştırılarak uygulanmıştır (28).

Tendon yaralanmaları ya da incinmeleri yaygındır, iyileşmesi zordur ve genellikle tedavisi fibrozis ve skar oluşumuyla sonlanmaktadır. 2014 yılında Lei Chen ve arkadaşları aşıl tendinopatili farelerde tendondan türetilen kök hücreleri ve PRP'yi birlikte kullanarak etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma ile tendondan türetilen MKH'in sıçan aşıl tendonunun tedavisinde PRP'ye destek olduğunu göstermişlerdir (29).

Farklı literatürlerde FBS/FCS yerine PRP kullanılarak *in vitro* adipositlere farklılaştırma esnasında etkinliği araştırılmış ve birbiriyle çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (30). İnsan MKH'lerinde adipositlere farklılaştırma esnasında PRP'nin etkinliğinin araştırıldığı bazı çalışmalarda AD,SCs ve BM-SCs'in PRP ile kombinasyonunun adipogenezi azalttığı gösterilirken bazı çalışmalarda ise farklılık gözlenmediği belirtilmiştir (30). Chieragato ve ark. nın çalışmasında bizim çalışmamızda da olduğu gibi özellikle ileri pasajlı MKH seçilmiştir ve PRP'nin FBS'ye göre ikilenme süresini kısalttığı, canlılığı ve hücre sayısını arttırdığı tespit edilmiştir (31). Ayrıca,

Cervelli ve ark. da PRP'nin insülin ile kombine verilince etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çelişkili durumların aydınlatılması için yaptığımız bu çalışmada AD-SCs'in hem kültürasyonu sırasında hem de adipositlere farklılaştırılması esnasında hayvansal kaynaklı FBS/FCS yerine insanın kendi kanından alınıp elde edilen PRP kullanılarak etkinliği FBS ile kıyaslamalı olarak araştırılmıştır ve PRP açısından olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda adipoz doku kullanmamızın nedeni adipoz dokunun liposakşın veya lipektomi gibi basit cerrahi girişimler sırasında kolayca elde edilebilmesi yanı sıra kemik iliği ve diğer MKH kaynaklarına göre daha fazla miktarda MKH içeriğine sahip olması ve *in vitro* ortamda daha kısa sürede daha fazla hücre elde edilebilmesidir. Kullandığımız kök hücreler nispeten yaşlı yani ileri pasajlı (pasaj 5-6) olan hücrelerdi. Erken pasaj hücreleri seçmememizin, 5.-6. pasaj hücreleri tercih etmemizin sebebi ileri pasajlarda hücre çoğalmasının yavaşlaması ve zorlaşmasındandır. Fazla hücre elde edebilmek için ileri pasajlara gereksinim vardır ve PRP ve FBS'nin ileri pasajlardaki etkinliğini görmek bu konuda fikir verebilecektir.

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar PRP'nin *in vitro* ortamda kök hücrelerin çoğaltılması ya da farklılaştırılarak özgün doku hücrelerine dönüştürülmesi esnasında da yararlı olduğunu göstermektedir. FBS yerine PRP kullanımının *in vitro* kültürasyon ve diferansiyasyon aşamalarında hücre çoğalmasını arttırması ve *dt*'i kısaltması ve bunu ileri pasaj hücrelerinde bile sağlayabilmesi kısa sürede daha fazla miktarda hücre eldesini de sağlayacağından oldukça önemlidir (32).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

AD-SCs'in kültürasyonunda ve adipositlere farklılaştırılması esnasında hücre kültürü ortamına büyüme faktörlerini içeren hayvansal serum olan FBS veya FCS kullanıldığı bilinmektedir. Farklı literatürlerde FBS/FCS yerine PRP kullanılarak etkinliği araştırılmış ve birbiriyle çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Oysa hayvansal kaynaklı materyal yerine otolog kaynaklı materyal kullanmak birçok açıdan daha avantajlıdır. FBS/FCS yerine insanın kendi kanından alınıp otolog olarak elde edilen PRP kullanılarak bu hücrelerin tedavi amacıyla kişiye uygulanması sırasında alerjik reaksiyonların ve immün reddin engellenmesi en önemli avantajlarından biridir. Ayrıca PRP, içerisindeki büyüme faktörleri sayesinde FBS'ye göre hücrelerin çoğalma hızını arttırarak, ikilenme süresini kısaltır ve daha kısa sürede daha çok hücre elde edilebilmesini sağlar. Bizim çalışmamızda bu çelişkili durumu aydınlatmak için hem AD-SCs'in kültürasyonunda hem de adipojenik farklılaştırma esnasında FBS yerine PRP kullanılarak PRP'nin daha etkin olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$). Bu güne kadar PRP özellikle rejeneratif tıp alanında ve doku tamirinde daha çok kök hücre uygulamalarına kombine edilerek kullanılmıştır ve içeriğindeki büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler sayesinde parakrin etki yoluyla kök hücrelerinin etkisini arttırdığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar PRP'nin *in vitro* ortamda kök hücrelerin çoğaltılması ya da farklılaştırılarak özgün doku hücrelerine dönüştürülmesi esnasında da yararlı olduğunu göstermektedir. FBS yerine PRP kullanımının otolog olduğu için sağladığı avantajları yanı sıra *in vitro* kültürasyon ve diferansiyasyon aşamalarında hücre çoğalmasını arttırması ve *dt*'ı kısaltması ve bunu ileri pasaj hücrelerinde bile sağlayabilmesi kısa sürede daha fazla miktarda hücre eldesini de sağlayacağından

oldukça önemlidir ve in vitro uygulamalarda otolog PRP kullanımı rahatlıkla önerilebilir.



KAYNAKLAR

1. Akhan O, Arat M, Beksac M. ve arkadaşları. Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi. 2009.
2. Kömürcü M, Özkan H. Mezenkimal kök hücre ve ortopedide kullanımı. TOTBİD dergisi. 2006; 5:130-9.
3. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292(5819): 154-6.
4. Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler. Trabzon, Derya Kitabevi. 2004.
5. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res. 1961; 14: 213-22.
6. Alwattar BJ, Schwarzkopf R, Kirsch T. Stem cells in orthopaedics and fracture healing. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases. 2011;69(1):6-10
7. Chapman R, Frankel MS, Garfinkel MS. Stem cell research and applications: Monitoring the frontiers of biomedical research. Am. Assoc. Adv. Sci. Inst. Civil. Soc. 1999;34: 405-416.
8. Friel R, Sar S, Mee PJ. Embryonic stem cells: Understanding their history, cell biology and signalling. Advanced Drug Delivery Reviews 57. 2005; 1894- 1903.
9. Can A, Kök Hücre - Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara, Akademisyen Tıp Kitabevi. 2014.

10. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-274.
11. Keller R. Stem cells on the way to restorative medicine. *Immunology Letters*. 2002; 83: (1):1-12.
12. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG et. al. The meaning, the sense and the significance: Translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med*. 2013 January; 19(1): 35-42.
13. Dietrich I, Crescenzi A, Chaib E, D'Albuquerque LA. Trophic effects of adipose derived stem cells on Langerhans islets viability-Review. *Transplantation Reviews* 29. 2015; 121-126.
14. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 February; 11(2): 85-97.
15. Laschke MW, Menger MD. Adipose tissue-derived microvascular fragments: natural vascularization units for regenerative medicine. *Trends in Biotechnology* August 2015; Vol. 33, No. 8.
16. Forcales SV. Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies: A Review. July 2015; Volume 7. Article 123.
17. Francesco FD, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti GF, Ferraro GA. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bed-Side: A Review. *Tissue Engineering: Part B Volume 00, Number 00*. 2015.

18. Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: Biomechanical and immunohistochemical evaluation. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2012; 65, 1712-1719.
19. Pak J, Chang JJ, Lee JH, Lee SH. Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2013; 14:337.
20. Oñate B, Vilahur G, Lorente RF, Ybarra J, Caballero AD, López CB, Moscatiello F, Herrero J, Badimon L. The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J*. 2012; 26, 4327–4336.
21. Choi J, Minn KW, Chang H. The Efficacy and Safety of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells: An Update. *Arch Plast Surg*. 2012; 39:585-592.
22. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: A review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008; 1:165–174.
23. Perez AG, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero WD, Santana MH. Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. *ISRN Hematology Volume*. 2014; Article ID 176060.

24. Rozman P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatoven APA* Vol 16. 2007; No 4.

25. Griffeth RJ, Garcia-Parraga D, Mellado-Lopez M, Crespo-Picazo JL, Soriano-Navarro M, Martinez-Romero A, Moreno-Manzano V. Platelet-rich plasma and adipose-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine-associated treatments in bottlenose dolphins (*tursiops truncatus*). September 2014; Volume 9, Issue 9, e108439.

26. Kim DY, Ji YH, Kim DW, Dhong ES, Yoon ES. Effects of platelet-rich plasma, adipose-derived stem cells, and stromal vascular fraction on the survival of human transplanted adipose tissue. *J Korean Med Sci*. 2014; 29: S193-200.

27. Cruz AC, Caon T, Menin A, Granato R, Boabaid F, Simões CM. Adipose-derived stem cells incorporated into platelet-rich plasma improved bone regeneration and maturation in vivo. *Dent Traumatol*. 2015 Feb; 31(1):42-8.

28. Pak J, Lee JH, Jeon JH, Lee SH. Complete resolution of avascular necrosis of the human femoral head treated with adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma. *J Int Med Res*. 2014 Dec; 42(6):1353-62.

29. Chen L, Liu JP, Tang KL, Wang Q, Wang GD, Cai XH, Liu XM. Tendon derived stem cells promote platelet-rich plasma healing in collagenase-induced rat achilles tendinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 34(6):2153-68.

30. Rubio-Azpeitia, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience: A Review article. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014 Jan-Mar; 4(1): 52–62.
31. Chieriegato K, Castegnaro S, Madeo D, Astori G, Pegoraro M, Rodeghiero F. Epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-bb can substitute for fetal bovine serum and compete with human platelet-rich plasma in the ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue. *Cytotherapy.* 2011;13(8):933-943.
32. Cervelli V, Scioli MG, Gentile P, Doldo E, Bonanno E, Spagnoli LG, Orlandi A. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(3):206-220.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Muğla'da doğdum. İlköğrenimimi Edirne-Uzunköprü Şinasi İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi Edirne-Uzunköprü Gazi Turhan Bey Ortaokulu'nda, liseyi ise İzmir İnönü Lisesi'nde tamamladım. Lisans eğitimimi 2009-2013 yıllarında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, Moleküler Biyoloji ve Genetik opsiyonunda gerçekleştirdim. 2014-2015 eğitim döneminden itibaren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimi yapmaktayım.

e- posta: noyansavas35@gmail.com