

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN GÖBEK KORDON KANI VE PERİFERİK KAN
KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN *in vitro*
KÜLTÜR ORTAMINA ADAPTASYONUNA ETKİ
EDEN FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ**

Moleküler Biyolog Olga Nehir ÖZTEL

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalından
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	v
KISALTMA LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kök Hücreler	4
2.2 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri	5
2.2.1 Kendini Yenileme	5
2.2.2 Klonlaşma	5
2.2.3 Farklılaşma	6
2.3 Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli	6
2.3.1 Totipotent Hücreler	7
2.3.2 Pluripotent Kök Hücreler	7
2.3.3 Multipotent Kök Hücreler	7
2.3.4 Unipotent Hücreler	8
2.4 Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynaklar	9
2.4.1 Embriyonik Kök Hücreler	10
2.4.2 Erişkin Kök Hücreler	14
2.5 Elde Edildikleri Kaynaklara Kök Hücrelerin Özellikleri	25
2.5.1 Dokulardan Elde Edilen Kök Hücreler	25
3. GÖBEK KORDONU	36
3.1 Wharton Jeli:	37
3.2 Göbek Kordon Kanı:	38
3.2.1 İnsan Göbek Kordon Kanı Hücreleri	39
3.2.2 Göbek Kordon Kanı Kök Hücreleri:	41
3.2.3 İnsan Göbek Kordon Kanının Klinik Uygulamaları	43
4. HÜCRE KÜLTÜRÜ	46
4.1 Hücrelerin İzolasyonunda ve Kültüründe Kullanılan Maddeler	46
4.1.1 Besiyerleri	46
4.1.1.1 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	46
4.1.1.2 Dulbecco' nun Modifiye Ettiği Eagle Medyumu (DMEM)	46
4.1.1.3 Iscove' un modifiye ettiği Dulbecco Medyumu (Iscove's Modified Dulbecco's Media) (IMDM)	47
4.1.2 Serum	47
4.1.2.1 Fetal sıgır serumu (FBS)	48

4.1.2.2	HyClone Serum:	51
4.1.2.3	İnsan serumu:.....	51
4.1.3	L-Glutamin:	53
4.1.3.1	L-Glutamin	53
4.1.3.2	Glutamax:	53
4.1.4	Dengeli Tuz Solüsyonu (Balanced Salt Solution; BSS).....	55
4.1.5	Antibiyotikler.....	56
4.1.6	Ficoll	56
4.1.6.1	Ficoll ile Yoğunluk Farkı Oluşturarak Kandan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu.....	57
4.1.7	Hücre Kültüründe Kullanılan Flasklar.....	59
5.	FLOW SİTOMETRE.....	61
6.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	65
6.1	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	65
6.1.1	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	65
6.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	65
6.2	Deneyde Kullanılan Çözeltiler	66
6.2.1	PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu) Çözeltisi.....	66
6.2.2	1x PBS Çözeltisinin Hazırlanması.....	67
6.2.3	Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması.....	67
6.3	Göbek Kordonu İçin Taşıma Ortamı Hazırlanması.....	67
6.5	Göbek Kordonunun Alınması.....	68
6.6	Göbek Kordon Kanından Mononükleer Kök Hücrelerin İzolasyonu.....	69
6.7	Hücrelerin Kültüre Alınması	73
6.7.1	Mononükleer Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması.....	73
6.7.2	Mononükleer Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Serumların Hazırlanması	73
6.7.3	Besiyerlerinin Hazırlanması	74
6.7.4	Hücre Kültürünün Tripsinizasyonu	74
6.7.5	Mononükleer Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Flasklar.....	74
6.7.6	Morfolojik İnceleme	75
6.7.7	İzole edilen mononükleer hücrelerin Tripan Blue boyası ile canlılıklarının belirlenmesi ve Thoma lamında sayılması:	75
6.8	Flow Sitometrik analiz.....	76
6.8.1	Kordon Kanı (Tam Kan) Flow Sitometrik Analizi.....	76
6.8.2	Periferik Kan (Tam kan) ile Flow Sitometrik Analiz	77
6.8.3	Kordon Kanı Mononükleer Hücrelerinin Flow Sitometrik Analizi.....	78
6.8.4	Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Flow Sitometrik Analizi	79
6.8.5	Periferik Kan Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Flow Sitometrik Analizi.....	80
7.	DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	82
7.1	Kordon Kanından Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürünün yapılması.....	82
7.2	Periferik Kandan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürünün Yapılması.....	126
7.3	Flow Sitometrik Analiz Sonuçları	129
7.3.1	İnsan Göbek Kordon Kanı (Tam Kan) Flow Sitometrik Analiz Sonuçları	129
7.3.2	İnsan Göbek Kordon Kanından Eritrosit Lizis Yöntemi ile İzole Edilen Mononükleer Hücrelerin Flow Sitometrik Analiz Sonuçları.....	130
7.3.3	İnsan Göbek Kordon Kanından Eritrosit Lizis Yöntemi ile İzole Edilen Mononükleer Hücrelerin Flow Sitometrik Analiz Sonuçları.....	131
7.3.4	Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yüksek Glikozlu DMEM Besiyerinde Kültürünün Flow Sitometrik Analiz Sonuçları.....	132

7.3.5	Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Düşük Glikozlu DMEM Besiyerinde Kültürünün Flow Sitometrik Analiz Sonuçları.....	133
7.3.6	Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyon Yöntemine ve Farklı Glikoz Konsantrasyonuna Göre İncelenmesi	134
7.3.7	Düşük Glukoz DMEM İçeren Kültür Ortamında Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Oranı	135
7.3.8	Periferik Kandan (Tam Kan) Ficoll Gradient Yöntemi ile İzole Edilen Mononükleer Hücrelerin Mezenkimal Kök Hücre Miktarı	136
7.3.9	Yüksek Glukoz DMEM Besiyerinde Periferik Kandan İzole Edilen Mononükleer Hücreler 14 Gün İçeren Kültür Ortamında Inkübe.....	137
Tartışma	139
EK-1	162

SİMGE LİSTESİ

μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μg	Mikrogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
gr	Gram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
mM	Milimolar
cm^2	santimetre kare

KISALTMA LİSTESİ

DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumu
IMDM	Iscove'un modifiye Eagle medyumu
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu
MKH	Mezenkimal kök hücre
HKH	Hematopoetik kök hücre
KK	Kordon kanı
EKH	Embriyonik kök hücre
iEKH	İnsan embriyonik kök hücresi
Kİ	Kemik iliği

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Kök hücrelerin genel özellikleri	5
Şekil 2. 2 Kök hücreler elde edildiği kaynaklara göre, embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler (nonembriyonik) olarak adlandırılırlar.	10
Şekil 2. 3 Embriyonik kök hücreler embriyonun 4–5 günlük erken dönem formu olan blastosistin yaklaşık olarak 64–200 arası hücreden oluşan iç hücre kitlesinden elde edilirler..	11
Şekil 2. 4 Pluripotent özelliğe sahip embriyonik kök hücreler	12
Şekil 2. 5 Pluripotent özelliğin sürdürülmesi için erken embriyonik hücrelerdeki NANOG, OCT4 ve SOX2 transkripsiyonel düzenlemesi.	13
Şekil 2. 6 İnsan embriyonik kök hücrelerinin izolasyonu ve kültürü	14
Şekil 2. 7 Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre türlerine farklılaşma potansiyeli.	16
Şekil 2. 8 MKH farklılaşmasında rol alan gen sayıları.....	21
Şekil 2. 9 Multipotent özelliğe sahip hematopoetik kök hücreler.	23
Şekil 2. 10 Nöral kök hücreler sinir sistemini oluşturan ve nöron, astrosit ve oligodendrositleri oluşturan kök hücreler.....	27
Şekil 2. 11 Erişkin nöral kök hücrelerin fare beyнинin subventriküler bölge ve subgranüler bölgesinde bulunduğu gösterilmiştir.	27
Şekil 2. 12 İnsan yağ dokusunun aspirasyonu	33
Şekil 3. 1 İnsan göbek kordon kanı	37
Şekil 3. 2 Kordon kanı mezenkimal kök hücreleri uygun koşullarda <i>in vitro</i> , hepatositlere, kondrositlere, hatta nöronlar ve astrositlere farklılaşabilir	43
Şekil 4. 1 Hücre kültürüne eklenen L-Glutaminde gözlenen ani kırılmalar sonucu amonyak oluşur.	54
Şekil 4. 2 Glutamax, stabilize formda L-Glutamin, dipeptid L-Alanil-L-Glutamin içerikleri ile ortam stabilitesi sağlar ve amonyak oluşumunu önler.....	54
Şekil 4. 3 Yoğunluk farkı ile tam kanda bulunan hücrelerin ayrılması	57
Şekil 4. 4 İnsan kanındaki tek çekirdekli hücrelerin Ficoll gradiyent santrifüj ile izolasyonu	58
Şekil 4. 5 Hücre kültüründe kullanılan flasklar	60
Şekil 4. 6 Tripan mavisi molekül yapısı.	60
Şekil 6. 1 Sezaryen ile doğum sonrası insan göbek kordonunun hazırlanması.....	68
Şekil 6. 2 Sezaryen ile doğum sonrası insan göbek kordonunun kesilmesi.	68
Şekil 6. 3 Göbek kordon ven ve arterleri.....	69
Şekil 6. 4 Santrifügasyon ile ayırma işleminde tam kanda bulunan eritrositler, buffy coat tabakası ve plazmanın ayrılması.	70
Şekil 6. 5 Yoğunluk farkıyla kordon kanından mononükleer hücrelerin izolasyonu.....	71
Şekil 6. 6 Yoğunluk farkıyla kordon kanından mononükleer hücrelerin izolasyonu.....	72
Şekil 6. 7 Thoma lamı üzerindeki yivler.	75
Şekil 7. 1 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (72. saat, 10x)	82
Şekil 7. 2 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (96. Saat, 10x).	83
Şekil 7. 3 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (9. gün, 20x).	83
Şekil 7. 4 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (10. gün, 20x).	84
Şekil 7. 5 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (12. gün, 20x).	84
Şekil 7. 6 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (15. gün, 20x).	85
Şekil 7. 7 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik	

	görünümü (24. saat, 20x).....	86
Şekil 7. 8	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (48. Saat 20x).	87
Şekil 7. 9	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (96. saat, 20x).	87
Şekil 7. 10	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (6. gün, 20x).....	88
Şekil 7. 11	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (7. gün, 20x).....	88
Şekil 7. 12	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (8.Gün10x).	89
Şekil 7. 13	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (9. Gün, 20x).....	89
Şekil 7. 14	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin DMEM+ %15 FBS besiyerindeki mikroskobik görünümü, 17. gün.....	90
Şekil 7. 15	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (24.saat, 20x).....	91
Şekil 7. 16	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (48.saat, 10x).....	92
Şekil 7. 17	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (5. Gün, 20x)..	92
Şekil 7. 18	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (6. gün, 20x).	93
Şekil 7. 19	İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü, DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler (7. gün, A: 10x, B: 20x).....	93
Şekil 7. 20	İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü. IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler (7. gün, 20x).....	94
Şekil 7. 21	İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü. (8. gün, 10x).	94
Şekil 7. 22	İnsan kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü. DMEM +%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler (10. gün, A: 10x, B: 20x).....	95
Şekil 7. 23	İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü. DMEM +%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler (30. gün; 20x).....	95
Şekil 7. 24	İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM +%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü. (36. gün, A: 10x, B: 20x).....	96
Şekil 7. 25	İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü. DMEM+%15FBS besiyerinde devam ettirilen kültür. (68. gün, 20x).96	
Şekil 7. 26	İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü. DMEM+%15FBS besiyerinde devam ettirilen kültür (72. gün, 20x).....	97
Şekil 7. 27	İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü (96. Saat, 20x).....	98
Şekil 7. 28	İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü (5. gün, 20x).....	99
Şekil 7. 29	İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü (6. gün, 10x).....	100

Şekil 7. 30 İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopikgörünümü (9. gün, 20x).....	100
Şekil 7. 31 İnsan kordon kanından elde edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. (17. gün, 40x).....	101
Şekil 7. 32 Kordon kanından elde edilen ve DMEM besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. (96. saat, 20x).....	102
Şekil 7. 33 Kordon kanından elde edilen ve DMEM besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (19. gün 20x).....	103
Şekil 7. 34 Kordon kanından elde edilen ve DMEM besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (25. Gün, 20x).....	103
Şekil 7. 35 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (5. gün, 20x).....	105
Şekil 7. 36 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (6. gün, 20x).....	106
Şekil 7. 37 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (8. gün, 20x)	106
Şekil 7. 38 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (11. gün, 20x).....	107
Şekil 7. 39 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (31. gün, 20x).....	107
Şekil 7. 40 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve 6 kuyulu plate içinde kültürü yapılan mononükleer hücreler.	108
Şekil 7. 41 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (24. Saat, 20x)	109
Şekil 7. 42 Kordon kanından izole edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (5. gün, 20x).....	109
Şekil 7. 43 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (5.gün, 20x).....	110
Şekil 7. 44 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (14.gün, A: 10x, B: 20x)...	110
Şekil 7. 45 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (15. gün, A: 10x, B: 20x)..	111
Şekil 7. 46 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (18.gün, A: 10x, B: 20x)...	111
Şekil 7. 47 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (18.gün, A: 10x, B: 20x)...	112
Şekil 7. 48 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (18.gün, A: 10x, B: 20x)...	112
Şekil 7. 49 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (20.gün, 20x).....	113
Şekil 7. 50 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (21.gün, 10x).....	113
Şekil 7. 51 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü 1. Pasaj sonrası (26. gün, 10x).....	114
Şekil 7. 52 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan	

	mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (30. gün, 10x)	114
Şekil 7. 53	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (35. gün, 20x).....	115
Şekil 7. 54	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (36. gün, 20x)	115
Şekil 7. 55	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (39. gün 10x) center well .	115
Şekil 7. 56	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (4. gün 10x).....	116
Şekil 7. 57	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (4. gün 20x).....	117
Şekil 7. 58	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (60. gün 20x)..	117
Şekil 7. 59	Kordon kanı mononükleer hücrelerinin ayrılmasında farklı izolasyon yöntemleri ve kültüründe farklı serum kullanılması.	118
Şekil 7. 60	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (96. saat 10x).	119
Şekil 7. 61	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (7. gün 10x).....	119
Şekil 7. 62	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (14. gün 10x)	120
Şekil 7. 63	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (20. gün 10x).....	120
Şekil 7. 64	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (96. Saat, 20x)	121
Şekil 7. 65	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (10. gün, 20x).....	121
Şekil 7. 66	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (14. gün, 20x).....	122
Şekil 7. 67	Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (21. gün, 20x)	122
Şekil 7. 68	Kordon kanından izole edilen hücrelerin, düşük (1g/L) ve yüksek (4,5g/L) glikoz içeren DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü.....	123
Şekil 7. 69	Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü A: Düşük glikozlu DMEM+%15 FBS B: Yüksek glikozlu DMEM+%15 FBS (96. saat 10x).	124
Şekil 7. 70	Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü A: Düşük glikozlu DMEM+%15 FBS B: Yüksek glikozlu DMEM+%15 FBS (7. gün 10x)	124
Şekil 7. 71	Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü A: Düşük glikozlu DMEM+%15 FBS B: Yüksek glikozlu DMEM+%15 FBS (14. gün 10x).	125
Şekil 7. 72	Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü A: Düşük glikozlu DMEM+%15 FBS B: Yüksek glikozlu DMEM+%15 FBS (14. gün 10x)..	125
Şekil 7. 73	Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin IMDM+%15 FBS besiyerinde kültürünün mikroskopik görüntüsü (96. saat, 10x)	126
Şekil 7. 74	Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin IMDM+%15 FBS	

	besiyerinde kültürünün mikroskopik görüntüsü (96. saat 10x)	127
Şekil 7. 75	Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin IMDM+%15 FBS besiyerinde kültürünün mikroskopik görüntüsü (14. gün 10x)..	128
Şekil 7. 76	Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin IMDM+%15 FBS besiyerinde kültürünün mikroskopik görüntüsü (21. gün 10x).....	128
Şekil 7. 77	Mononükleer hücre izolasyonu öncesi tam kordon kanındaki mezenkimal kök hücre oranı.	129
Şekil 7. 78	Eritrosit lizis tamponu kullanılarak yapılan mononükleer hücre izolasyonu sonrası kordon kanındaki mezenkimal kök hücre oranı.....	130
Şekil 7. 79	Mononükleer hücre izolasyonu sonrası kordon kanındaki mezenkimal kök hücre oranı.	131
Şekil 7. 80	Yüksek glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı (Mononükleer hücre izolasyonu sonrası 7. gün)	132
Şekil 7. 81	Düşük glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı (Mononükleer hücre izolasyonu sonrası 7. gün)	133
Şekil 7. 82	Kordon kanında izolasyon ve besiyeri ortamına bağlı olarak mezenkimal kök hücre oranı	134
Şekil 7. 83	İkinci donörde düşük glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı (Mononükleer hücre izolasyonu sonrası 7. gün).....	135
Şekil 7. 84	Mononükleer hücre izolasyonu öncesi tam periferik kandaki mezenkimal kök hücre oranı.	136
Şekil 7. 85	Farklı donörlerde yüksek glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında periferik kan mezenkimal kök hücre oranı (Mononükleer hücre izolasyonu sonrası 14. gün).....	137

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2. 1 Embriyonik Germ Tabakalarından Gelişen Farklı Dokular	6
Çizelge 2. 2 Bazı erişkin kök hücre kaynakları	9
Çizelge 2. 3 Mezenkimal kök hücrelerin elde edildiği kaynaklar	15
Çizelge 3. 1 Göbek kordon kanının günümüze dek malign ve malign olmayan hastalıklardaki klinik kullanımları.....	38
Çizelge 3. 2 Göbek Kordon Kanının Avantajları	39
Çizelge 3. 3 İnsan göbek kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin yüzey belirteçleri.....	41
Çizelge 3. 4 Hayvan Modellerinde Hastalık ve Yaralanmaları Tedavisinde başarı ile uygulanan Göbek Kordon Kanının Klinik uygulamaları.....	44
Çizelge 4. 1 Farklı Serumların Ortalama IgG seviyeleri	51
Çizelge 5. 1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometrik Belirteçleri.....	63
Çizelge 6. 1 Deneylerde kullanılan sarf malzemeler	65
Çizelge 6. 2 Tam kordon kanının Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması	77
Çizelge 6. 3 Tam periferik kanın Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması	78
Çizelge 6. 4 Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması	79
Çizelge 6. 5 Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültürünün Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması	80
Çizelge 6. 6 Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin kültürünün Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması	81

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca akademik bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen çok değerli danışman Hocam Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e, çalışmalarım boyunca aynı ilgi ve desteği gösteren değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, verdiği mali destekten dolayı TÜBİTAK'a ve ek destek sağlayan Devlet Planlama Teşkilatı'na teşekkür ederim.

Bölümümüzün kurucusu Prof. Dr. Mehmet Mustafa AKDESTE'ye ve kurucu üyelerden Prof. Dr. Huriye KUZU'ya teşekkürü bir borç bilip yakın zamanda kaybettiğimiz bu iki değerli hocamızı saygı ve minnet ile anıyorum. Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanı ve aynı zamanda Biyomühendislik bölüm başkanı Prof. Dr. Sabriye PİŞKİN'e, çalışmalarım boyunca kullandığım kordon kanlarını temin eden Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Ünitesi Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Tülay İREZ'e teşekkürü bir borç bilirim. Bununla birlikte bu çalışmanın yerine getirilmesine imkan sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığı'na, Fen Bilimleri Enstitüsü'ne, Biyomühendislik Bölüm Başkanlığı'na ve bütün değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında sonsuz desteği için Melike ERSÖZ'e,

Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarındaki sevgili arkadaşlarım; Serhat ELÇİÇEK, Emrah Şefik ABAMOR, Sezen CANIM, Rabia ÇAKIR, Özlem ŞAHİN, Serap YEŞİLKIR, Necati FINDIKLI, Elif METE, Zafer Nihat CANDAN, Müge YAZICI ve Ayça AKSOY'a,

En değerli varlıklarım sevgili annem; Fatma ÖZTEL ve babam; Ömer ÖZTEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması 1085170SBAG-4007 nolu TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Günümüzde kordon kanı (KK) kök hücre (KH) çalışmalarına ilgi giderek artmaktadır. Bunun nedeni, KK'nın, kemik iliği, periferik kan (PK) ve yağ dokusu ile kıyaslandığında daha genç hücreleri içermesi, yaşayabilme yeteneklerinin yüksek olması gibi özelliklere sahip olmasıdır. Mezenkimal kök hücrelerin diğer bir kaynağı olan PK, kolaylıkla elde edilebilmesi ve ön çalışmalar için uygun bir kaynak olması nedeniyle tercih edilmektedir. Kordon kanından MKH'lerinin kültürü, yapılmasında mevcut olan zorluklardan dolayı dünyanın az sayıda laboratuvarında yapılmaktadır. Ülkemizde ise, bu konu ile ilgili çalışmalar sadece KK'ından hematopoetik ve MKH izolasyonu, immünofenotiplendirilmesi, kriyoprezervasyonu (Prof. Dr. Tülay İREZ) ve transplantasyonu ile sınırlıdır. Buna göre de bu çalışmanın amacı farklı donörlerin periferik ve kordon kanından elde edilen MKH'lerin izolasyonuna, *in vitro* kültürde adaptasyonuna ve proliferasyonuna etki eden çeşitli faktörlerin (fiziksel, kimyasal, donöre bağlı) etkisini incelemek olmuştur. Çalışmalarda 15 Kordon kanı ve 30 periferik kan örneği kullanıldı. Deneylerde farklı izolasyon yöntemleri (Ficoll, eritrosit lizis ve santrifügasyon), hücre sayımı ve canlılık tayini, hücre kültürü, mikroskopik ve Flow Sitometrik yöntemler kullanıldı. Bu çalışmada ilk kez olarak kordon kanından mononükleer hücre izolasyonunda Ficoll gradienti yönteminin (900xg hızda) incelenen yöntemler arasında en uygun yöntem olduğu, mezenkimal kök hücrelerinin izolasyon, ve adaptasyonunda +%15 HyClone serum ve düşük glikoz içeren DMEM besiyerinin kültürün yapılmasında kullanılan flaklardan ise Falcon marka flakların en uygun olduğu tespit edildi. Flow Sitometrik analizler sonucunda, kordon kanındaki mezenkimal kök hücre miktarının, izolasyon öncesi %0,04, izolasyon sonrası %1,22 ve kültürde %10,22 olduğu belirlendi ($p<0,05$). Periferik kanda izolasyon öncesi, izolasyon ve kültürde mezenkimal kök hücre miktarı Flow Sitometrik olarak incelendiğinde ise sadece kültürü yapılan periferik kan MNH'lerinden %0,001 mezenkimal kök hücre olduğu belirlendi ($p<0,05$). Kordon kanı MKH'lerin izolasyonu ve kültür ortamında proliferasyonuna etki eden faktörler belirlenmesi sonucunda Türkiye'de ilk kez olarak kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin adaptasyonu sağlanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, rejeneratif tıp ve biyomühendislikte doku mühendisliği çalışmalarında önemli olabilir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlar, TÜBİTAK tarafından yayınlanan 2003–2023 Teknoloji Öngörü Çalışmasında, Türkiye'de kök hücre teknolojilerinin geliştirilmesi ve kök hücrelerin özellikle rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılabilir hale gelmesi gerekliliği talebine de uygun olarak yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kordon kanı, Periferik Kan, Flow Sitometre, Mezenkimal Kök Hücre

ABSTRACT

The very promising features of cord blood stem cell studies have been attracting more and more interest nowadays. Compared to the well-known stem cell sources such as bone marrow, peripheral blood and adipose tissue, cord blood consists of younger cells with a higher survival ability. However, in the preliminary studies, peripheral blood, which also includes mesenchymal stem cells (MSC), has been preferred much more since it can be accessed easily. As likes to preripheral blood, cord blood include mesenchymal stem cells. Nevertheless, due to presence of lower amount of MSC in cord bloos and some technical difficulties in its in vitro culture, it is rarely processed by research laboratories.

In our country, practiced studies of cord blood are limited with hematopoetic and mesenchymal stem cell isolation, immunophenotyping, cryopreservation (Prof. Dr. Tülay İREZ) and transplantation from cord blood. The aim of this study was following to the isolation of mesenchymal stem cells from pheriperic and cord blood, donated from different donors, to investigate the effects of a several physical, chemical and donor-related factors on cell proliferation and adaptation of these cells in vitro culture conditions. 15 cord blood and 30 peripheral blood samples were processed in this study. Cells were isolated via ficoll, erythrocyte lysis and centrifugation based different methods. In order to the assess the efficiency of these isolation methods cell count and survival assessment, cell cultuvation, microscopic and flow cytometric methods were efficiently performed.

This present study proposed for the first time that the use of Ficoll gradient method (900xg speed) in mononuclear cell isolation from cord blood is more suitable than the other examined methods. Additionally, cultture medium consisiting of %15 HyClone serum and DMEM (with low glucose) yielded higher amount of MSC and provided cells better cultural environment. Finally, culture flask (Falcon BD, U. S.A) was the most appropriate in culture of MSC. Flow cytometric analysis of MSCs revealed that the percentage of MSC in cord blood was gradually increased with a significant amount; 0,04% at pre-isolation, 1,22% during isolation and 10,22% after culture ($p<0,05$). In case of peripheral blood, flow cytometric analysis of MSC at pre-isolation, during isolation and in culture has pointed out that only 0,001% MSCs were blood mononuclear cells in cultured peripheral ($p<0,05$).

This present study, for the first time in Turkey, revealed out the factors that have effects on the adaptation and isolation of MSC from cord blood. Those obtained data could be beneficial

for regenerative medicine and tissue engineering in bioengineering field. Furthermore, this study was performed adequately to the 2003–2023 Technology Vision Study that was published by TUBITAK with the demand of development of stem cell technologies in Turkey and making stem cells especially employable in regenerative medicine applications.

Keywords:

Umbilical cord blood, Peripheral blood, Flow Cytometry, Mesenchymal Stem cell

1. GİRİŞ

Son yıllarda kök hücre çalışmalarına ilgi giderek artmaktadır. Bunun nedeni kök hücrelerin sahip oldukları farklılaşma özellikleri ile çeşitli doku ve organları oluşturan hücrelere dönüşebilme potansiyelleridir. Kök hücreler bu özellikleri ile, rejeneratif tıp gibi yeni bir bilim dalının gelişmesine neden olmuştur (Rosenbaum vd., 2008). İleride rejeneratif tıbbın daha da gelişmesi, günümüzde tedavisi mümkün olmayan Alzheimer, Parkinson, diyabet, kanser gibi hastalıkların hücresel tedavisine, doku mühendisliği ile yeni doku ve organların elde edilmesine imkan verebilir (Shihabuddin ve Aubert, 2010; Yuan,2010; Luo, 2009). Ancak, bütün bu çalışmaların temelini, kök hücrelerin izolasyonu ve farklılaşması oluşturur (Park vd., 2009; Atala, 2009).

Kök hücreler; embriyonik ve fetal dokular dışında, erişkinlerde kemik iliği, kordon kanı, periferik kan, yağ dokusu gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilir (Steinbock, 2005; Moore vd. 2006; de Villiers vd., 2009). Embriyonik ve fetal kaynaklardan kök hücrelerin izolasyonundaki zorluklar yanında, bu kaynakların kullanımının çeşitli etik tartışmalara yol açması halen tartışılmaktadır (de Kretser, 2007; Brignier ve Gewirtz, 2010). Erişkin kaynaklardan kök hücre elde edilmesinde de çeşitli zorluklar bulunmaktadır. En çok kullanılan kök hücre kaynaklarından olan kemik iliğinin elde edilmesinde hasta açısından zorluklar olması, bu kök hücre kaynağının kullanımını sınırlamaktadır (Mizuno H, 2009). Bir diğer erişkin kök hücre kaynağı ise adipos dokudur. Adipos dokunun alınması bir dizi cerrahi işlem gerektirdiğinden, izolasyonda da çeşitli problemlere neden olur (Brayfield vd., 2010; Zuk, 2010). Ayrıca erişkin dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin, donörün yaşı ve sağlık durumu gibi fizyolojik şartlarının değişken olması nedeniyle, adipos doku gibi erişkin kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin *in vitro* gelişimi ve farklılaşma potansiyelleri de değişkendir (Zuk, 2010). Oysaki bir ameliyat atığı olan kordon kanı, donöre zarar verme riski taşımayan, özellikle ülkemiz gibi genç nüfusu olan ve doğum oranı yüksek ülkelerde, elde edilmesi kolay ve çok bulunan bir kök hücre kaynağıdır. Kordon kanı, kolay elde edilmesinin yanında, kemik iliği ile karşılaştırıldığında düşük viral kontaminasyon oranına sahiptir (Solves vd., 2003; Solves vd., 2003). Ayrıca kriyojenik derecelerde hücre canlılığını büyük ölçüde koruyarak muhafaza edilebilen (M-Reboredo vd., 2000) ve etik tartışmalara yol açmayan bir kaynaktır. Klinik kullanım açısından ise, kordon kanı kök hücreleri, allojenik antijenlere cevap veren sitotoksik T lenfositlerini üretmediklerinden, yüksek immün tolerans gösterirler. Göbek kordon kanı hücreleri ayrıca proinflamatuvar sitokin interferon- γ (IFN γ) ve

tümör nekroz faktör- α (TNF α)'yı da üretmediklerinden, klinik kullanım açısından allojenik transplantasyona uygun hücrelerdir (Zeddou vd., 2010). Yapılan birçok çalışmada, bir mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kordon kanından elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin yağ, kemik, kıkırdak, sinir hatta karaciğer hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Lee vd., 2004). Ancak tüm bu avantajlarına rağmen göbek kordon kanı kök hücrelerinin izolasyonunda ve kültür ortamına adaptasyonunda halen çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda farklı izolasyon ve kültür koşul parametreleri denenmiş olmasına rağmen, başarılı bir kordon kanı mezenkimal kök hücre kültürünün elde edilmesi ancak 1/15 (~%6,6) oranında sağlanmıştır (Laitinen ve Laine, 2007; Zeddou vd., 2010).

Klinik kullanım potansiyeline sahip bir diğer kök hücre kaynağı olan periferik kan, aferizi kolay ve istenildiği zaman hastadan elde edilmesi mümkün bir kök hücre kaynağı olması nedeniyle günümüzde kemik iliğine alternatif olarak kullanımına yönelik yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Allojenik transplantasyonlarda Graft versus Host Disease (GvHD) yanıtı ve tümör oluşturma riski nedeniyle kök hücre tedavilerinde kullanımı sınırlı olmasına rağmen, kök hücrelerin kültürü ve farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi çalışmalarında kullanım için uygun bir kaynaktır (Huss vd., 2000).

Kordon kanından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin sınırlı olması, ayrıca kültürünün yapılmasına ve adaptasyonuna etki eden çeşitli faktörlerin yeteri kadar bilinmemesi, kordon kanı mezenkimal kök hücre kültürünün ancak dünyanın az sayıda laboratuvarında yapılmasına neden olmuştur.

Ülkemizde ise, bu konu ile ilgili çalışmaların büyük bölümü kordon kanından izole edilen hematopoetik ve mezenkimal kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi, kriyoprezervasyonu ve transplantasyonuna yönelik olup özellikle Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Ünitesi Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Tülay İREZ danışmanlığında yürütülmektedir. Bütün bunlara rağmen, ülkemizin az sayıda laboratuvarında (Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Merkezi-KOGEM) kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve kültürü ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

TÜBİTAK tarafından yayınlanan 2003–2023 Teknoloji Öngörü Çalışması'nda, Türkiye'de kök hücre teknolojilerinin geliştirilmesi ve kök hücrelerin özellikle rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılabilir hale gelmesi gerekliliği vurgulanmaktadır (Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Kasım, 2004).

Buna göre çalışmamızın amacı, ilk kez olarak farklı donörlerden elde edilen periferik ve

kordon kanından Mezenkimal kök hücrelerin izolasyonuna, *in vitro* kültürde adaptasyonuna ve proliferasyonuna etki eden fiziksel, kimyasal ve donöre bağlı faktörlerin etkisini belirlemek olmuştur.

Amaca ulaşmak için aşağıdaki çalışmalar yapıldı:

- Farklı donörlerden izole edilen kordon ve periferik kanda mezenkimal kök hücrelerin varlığının immünofenotipik olarak belirlenmesi,
- Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonuna ve proliferasyonuna etki eden çeşitli fiziksel faktörlerin
 - Eritrosit lizis tamponu,
 - Ficoll gradient ile ayırma yönteminde farklı santrifüj hızları,
 - Santrifügasyon ile ayırma yöntemi,
 - Flask yüzey yapısının

Karşılaştırılması,

- Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonunda ve proliferasyonunda farklı besiyerlerinin etkisinin incelenmesi,
- Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu ve adaptasyonunda farklı kaynaklardan elde edilen serumların (otolog serum, düşük immünooglobulin G oranına sahip HyClone Fetal Sığır Serum, Fetal Dana Serum) etkisinin incelenmesi,
- Düşük ve yüksek glikoz konsantrasyonu içeren DMEM besiyerinin, kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu ve adaptasyonuna etkisinin incelenmesi

GENEL BİLGİLER

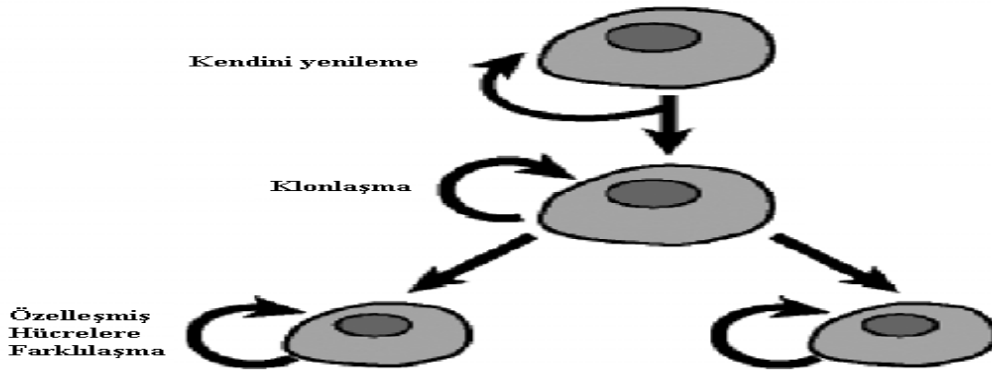
2.1 Kök Hücreler

Kök hücreler organizmayı oluşturan ve organizmanın yaşamı boyunca birçok hücre tipine farklılaşabilme, kendini yenileyebilme ve çoğalabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir (Katsumoto vd., 2010; Nandoe Tewarie vd., 2009). Uygun koşullarda çeşitli doku ve organları oluşturan farklı hücelere dönüşebilme özelliğine sahip olan kök hücreler, bu özellikleri ile günümüzde tıbbın birçok alanında ve doku mühendisliği çalışmalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır. Farklı hücre türlerine dönüşebilme potansiyeli olan kök hücelere olan bu ilginin nedeni, ileride bu hücrelerin laboratuvar ortamında istenilen hücre türüne dönüştürülebilmesiyle, vücutta hasar görmüş doku veya organların hücresel tedavisinde uygulanabilmesinin ümit verici olmasıdır (Liu vd., 2010). Kök hücrelerin bu özellikleri, birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve kemik iliği başta olmak üzere, farklı kök hücre kaynaklarını kullanarak yapılan araştırmalar ve uygulamalar sonucu, “rejeneratif tıp” kavramı gelişmiştir (Keller, 2002). Kök hücrelerin eşsiz işlevlerinin sürdürülmesi için, hücrelerin gelişebileceği optimum koşulların sağlanması ve tıbbi uygulamalarda kullanılmak üzere organizmada hasar ve red oluşturmayacak koşullarda üretilmeleri gerekmektedir (Bosse vd., 2000).

Elde edildikleri kaynaklara göre farklı farklılaşma potansiyellerine sahip olan kök hücreler ile yapılan çalışmalar, hücrelerin elde edildiği kaynaklar ve kullanım alanları, birçok tartışmayı da beraberinde getirmiştir (Tárnok vd., 2010). En çok tartışılan kök hücre olan embriyonik kök hücreler, farklı hücre hatlarına dönüşme potansiyeli açısından avantajlı olmalarına rağmen, etik sorunlar ve donör sağlığı açısından oluşturduğu tehlikeler sebebiyle bazı çalışmalarda tercih edilmemektedirler (Lengner ve Ann, 2010). Göbek kordon kanından elde edilen kök hücreler ise, farklılaşma potansiyeli ve birim hacimdeki kök hücre sayısı açısından avantajlı olmalarının yanında, kemikiliği, embriyo ve yağ dokusu ile kıyaslandığında donör sağlığı, donör sayısı ve etik tartışmalara bağlı sorunlar açısından da en uygun kaynaklardan biridir (Smith ve Wagner, 2009).

2.2 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Kök hücreler, kendini yenileme, klonlaşarak kendi kopyasını oluşturabilme ve farklı hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahip özel hücrelerdir (Yu ve Estrada 2010). Bu 3 özelliğin tümüne (Kendini yenileme, Klonlaşma, Farklılaşma) sahip olan bir hücre kök hücre olarak tanımlanabilir (Şekil 2. 1).



Şekil 2. 1 Kök hücrelerin genel özellikleri

2.2.1 Kendini Yenileme

Kök hücrelerin temel özelliklerinden biri olan kendini yenileme terimi, hücrenin çoğalma yeteneğini belirler. Kök hücreler bu yönden ölümsüz, sürekli ve sınırsız bölünme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bunun yanında, Houck ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* çalışmalarda, kök hücrelerden farklı olarak, somatik hücrelerin en fazla 80 kez bölünebildiği ve daha sonra bu hücrelerin yaşlanması sonucunda replikasyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Houck vd., 1971).

2.2.2 Klonlaşma

Klonlaşma; bir hücrenin aynı yapıya sahip birden fazla hücreyi üretme kapasitesi olarak tanımlanır. Klonlaşma özelliği hücrelere, kendi özelliklerine sahip yeni hücreler üretebilme yeteneği kazandırır. Böylece hücrelerin homojen hücre grupları oluşturabilmelerini sağlar. Sonuçta tamamen aynı hücresel ve genetik yapıya sahip olan hücrelerden bir hücre hattı oluşturulabilir (Lanza vd., 2004).

2.2.3 Farklılaşma

Kök hücreler, organizmada ihtiyaç duyulduğunda farklı hücelere dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Ancak, her kök hücre türü, elde edildiği kaynağa bağlı olarak farklı farklılaşma potansiyeline sahiptir. Kök hücreler farklı sinyaller verildiğinde bu özellikleri *in vitro* koşullarda da gösterebilir. Erişkin kaynaklardan elde edilen kök hücrelerde, embriyonik ve fetüs kaynaklı kök hücrelerin sahip olduğu yetenekler sınırlıdır. Bu nedenle kök hücrelerin işlevlerini tanımlamada, hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Watt ve Driskell, 2010).

2.3 Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli

Kök hücreler mezoderm, endoderm ve ektoderm olarak adlandırılan üç germ tabakasından meydana gelen hücrelerden oluşur. Bu üç germ tabakası, tüm vücut hücrelerinin embriyonik kaynağını oluşturmaktadır. Vücudun oluşumu sırasında, bu 3 germ tabakasının her biri farklı özelleşmiş hücreleri meydana getirir (Çizelge 2. 1) (Estrov, 2009).

Çizelge 2. 1 Embriyonik Germ Tabakalarından Gelişen Farklı Dokular

Embriyonik Germ Tabakaları	Farklılaşmış Dokular
Endoderm	Timus, Tiroid, Paratiroid Bezi, Larinks, Trake, Akciğer, İdrar kesesi, Vajina, Üretra Gastrointestinal Dokular, Karaciğer, Pankreas, Gastrointestinal Sistem İç Yüzeyi, Solunum Sistemi İç Yüzeyi
Mezoderm	Kemik İliği, Kan, Adrenal Korteks, Lenf Dokuları, Çizgili, Düz ve Kalp Kasları, Bağ Doku (Kemik ve Kıkırdak dahil), Ürojenital Sistem, Kalp ve Kan Damarları (Vasküler Sistem)
Ektoderm	Deri, Sinir Sistemi (Nöroektoderm), Adrenal Medulla, Hipofiz Bezi, Baş ve Yüz Bağ Dokuları, Göz, Kulak

Elde edildikleri kaynağa bağlı olarak kök hücreler, totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak adlandırılan 4 farklı farklılaşma potansiyeli gösterirler (Watt ve Driskell, 2010).

2.3.1 Totipotent Hücreler

Totipotent terimi *Totus*-Tam, bölünmemiş ve *Potentia*-Güç, potansiyel anlamına gelen kelimelerden türeyen ve her şeyi yapabilen anlamına gelen Latince bir terimdir. Fertilizasyon ile oluşan tek hücreli embriyo (zigot) ilk totipotent hücre olarak adlandırılır ve tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve potansiyele sahiptir.

Ayrıca erken embriyonik dönem olarak adlandırılan blastomerin olduğu embriyonun ilk 4–5. gününe kadar oluşan hücrelere de “totipotent hücreler” adı verilmektedir. Totipotent hücreler organizmanın tüm yapılarını ve ekstra embriyonik yapılarda olan göbek kordonu, amniyon kesesi, Wharton Jeli ve plasentayı da oluşturabilecek yeteneğe sahiptirler. Totipotent hücreler organizmanın gelişimini takiben farklılaşma potansiyellerine göre pluripotent, multipotent, ünipotent özellik gösterebilirler (Shanthly vd., 2006).

2.3.2 Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent terimi Latince “çeşitli, çok” anlamına gelen *Plures* ve *Potentia*-Güç kelimelerinden türemiştir. Pluripotent hücreler fertilizasyondan sonra, 4–5. günde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir. Bu hücreler, *in vivo* embriyonik gelişim sırasında ve *in vitro* koşullar altında embriyonun üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektodermden meydana gelen her türlü hücre tipini (yaklaşık 200 farklı hücre) oluşturabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu eşsiz farklılaşma özelliğine sahip olmalarına rağmen pluripotent hücreler, işlev gören bir organizmayı oluşturabilecek kabiliyete sahip değildirler. Pluripotent kök hücreler birçok farklı hücre türünü oluşturmalarına rağmen totipotent hücreler gibi ekstraembriyonik tabakaları oluşturamazlar. Yapılan çalışmalarda erken dönem insan embriyolarından alınan hücreler ile fetüs dokusundaki gonad kökenli hücrelerin de pluripotent özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir (Munsie vd., 2000; Brignier ve Gewirtz, 2010).

2.3.3 Multipotent Kök Hücreler

Embriyonik gelişimin daha ileri evresinde görülen bu hücreler sadece kendi kökeninde

bulunan özelleşmiş hücelere ve doku gruplarına farklılaşabilirler. Bu hüceler sınırlı farklılaşabilme kapasitesine sahip olmalarına rağmen yine de çok sayıda hücre türüne farklılaşabilmektedir. Multipotent hüceler, kemik iliğinde yüksek miktarda olmak üzere kordon kanı ve yağ dokusunda da bulunur (Barlow vd., 2008; Secco vd., 2008; Shoji vd., 2010).

2.3.4 Unipotent Hüceler

Latince “tek, bir” anlamına gelen *unus* kelimesinden türetilmiştir. Unipotent hüceler, sadece bir çeşit hücre grubuna farklılaşabilen hücelerdir. Bu hüceler, erişkin organizmada, tek bir seri boyunca farklılaşabilirler. Ayrıca, doku yenilenmesinde de rol oynarlar. Ancak, daha geniş doku hasarlarında, hasarlı bölgenin tamiri için pluripotent kök hüceler devreye girer (Young ve Black, 2004; de Kretser, 2007).

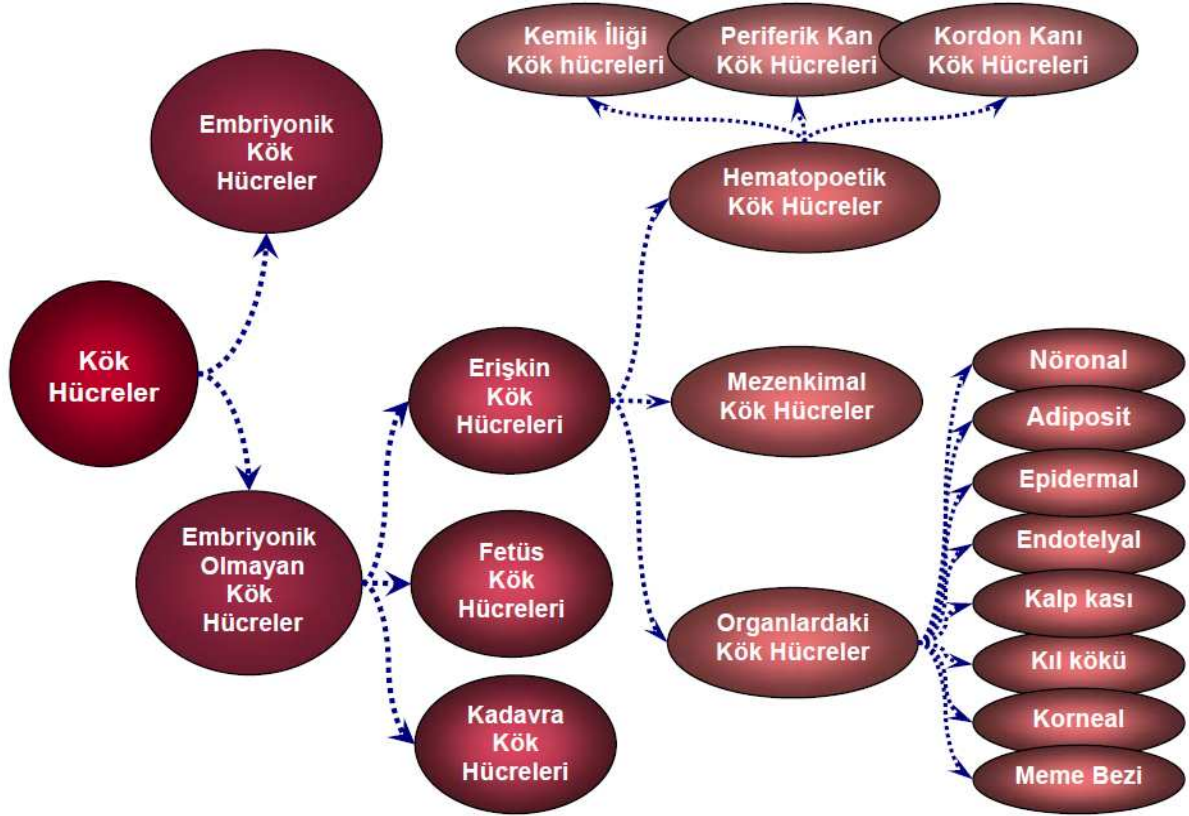
2.4 Kök Hücrelerin Elde Edildiği Kaynaklar

Embriyonik kök hücre kaynakları olan, erken embriyon dönemindeki blastosist, embriyonel yapraklar ve fetal dokular dışında kök hücreler, birçok farklı erişkin dokudan da izole edilir (izelge 2. 2). Günümüzde mevcut olan kök hücre kaynaklarına ek olarak tıbbi ve laboratuvar tekniklerinin gelişmesiyle ileride, daha farklı kök hücre kaynaklarının da keşfedilmesi beklenmektedir (Can ve Karahüseyinoğlu, 2008).

Çizelge 2. 2 Bazı erişkin kök hücre kaynakları

Kemik İliği
Kas Dokusu
Spongiyoz Kemik
Nöral Krista
Dermis
Yağ Dokusu
Periost
Perisit
Snovyal zar
Kan
Amniyon Sıvısı
Wharton Jeli
Göbek Kordon Kanı
Göbek Kordon Stroması
Diş Pulpası

Sınıflandırmada birçok farklı görüş olmasına rağmen kök hücreler temelde, kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine göre iki gruba ayrılırlar (Şekil 2. 2). Bunlardan ilki embriyonik diğeri ise erişkin kök hücredir (Zhang ve Wang, 2008).



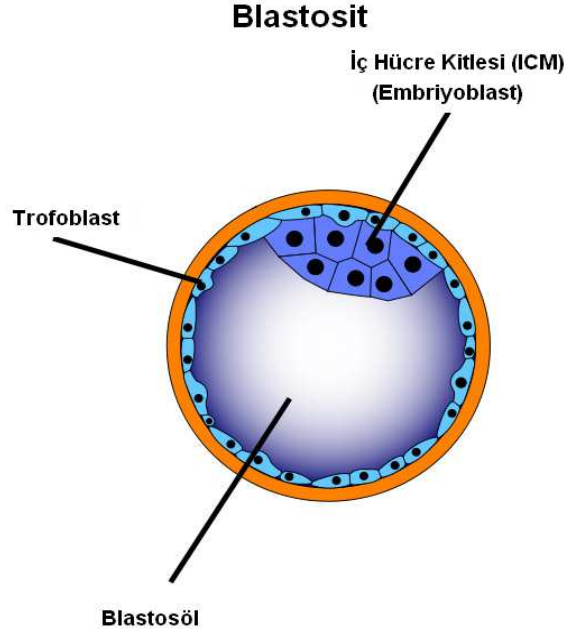
Şekil 2. 2 Kök hücreler elde edildiği kaynaklara göre, embriyonik ve embriyonik olmayankök hücreler (nonembriyonik) olarak adlandırılırlar. Embriyonik kaynakların yanında, çok çeşitli hücre hatlarına farklılaşma özelliği göstermeleri, kolay kültüre edilmeleri ve etik tartışmalara yol açmamaları nedeniyle, en çok çalışılan kök hücre kaynakları erişkin kök hücre kaynaklarıdır.

2.4.1 Embriyonik Kök Hücreler

Fertilize yumurta, olgun bir organizmayı oluşturuncaya kadar bölünür ve farklılaşır. İnsanın dahil olduğu tüm erişkin memeliler, sinir (nöronlar), kas (miyositler), deri (epiteller), kan (eritrositler, monositler, lenfositler, v.b.), kemik (osteositler) ve kıkırdak hücreleri (kondrositler) gibi 200' den fazla hücre çeşidinden oluşur (Watt ve Driskell, 2010).

Embriyonik kök hücrelerinin 1998 yılında Wisconsin-Madison Üniversitesinde James Thomson tarafından keşfinden (Thomson vd., 1998) 17 yıl sonra 1998 yılında insan embriyonik kök hücrelerinin (iEKH) elde edilmesi ve kültürünün yapılması, biyoloji bilimi için çok önemli bir ilerleme olmasının yanında doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için de dev bir adım olmuştur (Placzek vd., 2009).

İnsan embriyonik kök hücrelerinin elde edildiği embriyolar, blastosist adı verilen 4–5 günlük içi boş mikroskobik kürelerdir. Blastosist üç yapıdan oluşur: Blastosisti kaplayan katman olan trofoblast; blastosistin içinde bulunan boşluk olan blastosöl ve blastosölün bir ucunda bulunan ve yaklaşık 200 hücreden oluşan iç hücre kitlesi (Şekil 2. 3).



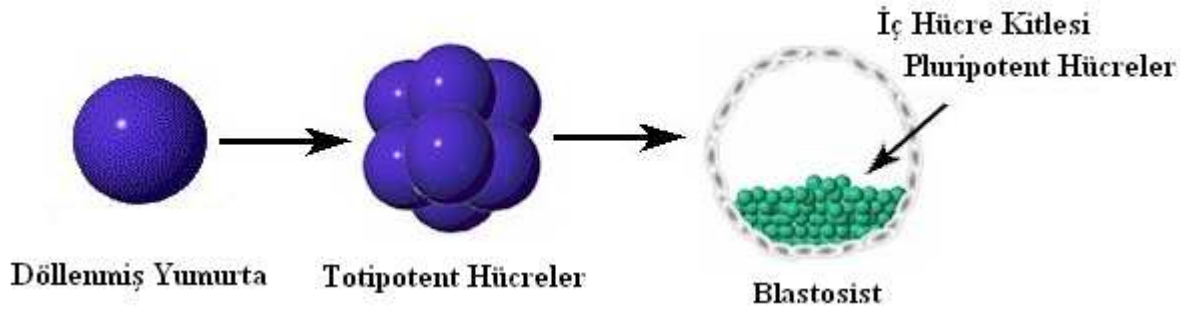
Şekil 2. 3 Embriyonik kök hücreler embriyonun 4–5 günlük erken dönem formu olan blastosistin yaklaşık olarak 64–200 arası hücreden oluşan iç hücre kitlesinden elde edilirler. (Vogelstein vd., 2002).

2.4.1.1 Embriyonik Kök Hücrelerin Özellikleri

Embriyonik kök hücreler (EKH), vücuttaki herhangi bir hücreye dönüşme ve kültür ortamında sonsuza dek yayılma yeteneğine sahiptirler (Vogelstein vd., 2002). Bu eşsiz işlev kombinasyonu, bu hücrelerin, hastalıkların ve yaşlanmanın tedavisi için sınırsız bir farklılaşmış hücre kaynağı potansiyeli sağlayabileceğini göstermektedir. EKH'lerde bu

işlevleri sağlayan moleküler süreçlerin anlaşılması, bunların potansiyellerinin kontrol altında tutularak ve farklılaşmayı kontrol eden yeni stratejiler geliştirilmesini sağlayacaktır. Somatik hücrelerin, embriyonik kök hücre benzeri hücrelere dönüştürülmesi için en son teknolojiler ile kontrollü farklılaşma uygulamalarının birleşimi, gelecekte hastalıkların tedavisi için hasta kaynaklı pluripotent hücre türlerinin oluşturulması için umut vaat etmektedir.

Embriyonik kök hücrelerin, kültür ortamında ya da gelişen embriyo içinde embriyo ve erişkin organizmadaki tüm hücreleri oluşturma potansiyeli bu hücrelerin “pluripotent” özelliğini gösterir (Stewart vd., 2008). Pluripotent özellik, bir memelinin embriyonik gelişimi sırasında blastosistin iç hücre kütesindeki hücrelerde ve daha sonra gastrülasyon embriyosundaki epiblast içinde kısa bir süre var olan ve daha sonraki gelişim evrelerinde ve erişkinlerde primordiyal germ neslinde korunan bir özelliktir.



Şekil 2. 4 Pluripotent özelliğe sahip embriyonik kök hücreler, döllenmiş yumurtadan gelişen ve kültür ortamında ya da gelişen embriyo içinde embriyo ve erişkin organizmadaki tüm hücreleri oluşturma potansiyeline sahiptir.

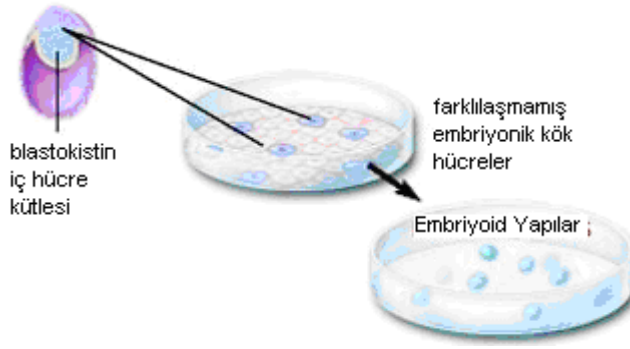
Embriyonik kök hücreler, pluripotent özelliklerini kültür ortamında da korurlar. Bu hücrelerin pluripotentliğinin sürdürülmesi, büyüme ortamına eklenen maddeler ya da farklılaşmış hücrelerden oluşan bir besin katmanı üzerinde büyüme ile sağlanan dış faktörleri gerektirir. Bu faktörlerin, hücre içinde pluripotentliği kontrol eden kilit transkripsiyon ağının sürdürülmesinden sorumlu olmaları muhtemeldir. Bu ağ, homeodomain transkripsiyon faktörü Oct4, varyant homeodomain transkripsiyon faktörü Nanog ve yüksek mobilite grubu (HMG)-box transkripsiyon faktörü Sox2'yi içerir. Bu faktörler tarafından oluşturulan pek çok sistem ve kendi kendini düzenleyici ağın tanımlanması, pluripotent özelliğin anlaşılması ve kontrolü için bir başlangıç noktası oluşturmaktadır (Johnson vd., 2008; Adachi vd., 2010)



Şekil 2. 5 Pluripotent özelliğın sürdürülmesi için erken embriyonik hücrelerdeki NANOG, OCT4 ve SOX2 transkripsiyonel düzenlemesi. Pluripotent faktörlerin aktivitelerinin azalmasına mezodermal hücre hatlarına özel, türe özgü brachyury (BRY) ve MESP transkripsiyonel aktivatörlerin artışı eşlik eder (Srivastava ve Ivey, 2006; Sauerzweig vd., 2009). Göbek kordon kanı pluripotent hücreleri tümü 0. günde nükleuslarında Oct-4, Sox-2 ve Nanog transkripsiyon faktörlerini eksprese ederler. Bu üç transkripsiyon faktörü kök hücrelerin farklılaşmama özelliğinin sağlanması ve sürdürülmesi için gereklidir (Srivastava ve Ivey, 2006; Sauerzweig vd., 2009).

2.4.1.2 Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü:

Embriyonik kök hücrelerin (EKH) kültürü, farklılaşmamış durumda korunmaları ve farklılaşmalarının yönlendirilmesi için çok hassas bir metodoloji gerekmektedir. Geleneksel EKH kültür prosesi, bir sürdürme/genişletme fazından, bir embriyoid yapı (EY) oluşum fazından ve son olarak, istenen hücre şekline kalıcı olarak farklılaşma fazından oluşur. Her bir faz, aşılması gereken zorluklara sahiptir. Embriyonik kök hücreler, özellikle de insan EKH'leri, farklılaşmamış durumlarının sürdürülmesi için, fare embriyonik fibroblast (EMF) gibi besleyici hücreler üzerinde kültüre alınırlar (Kent, 2009; King, 2010). Halen, EKH'lerden farklılaşmış hücreler oluşturmak için en kullanışlı yöntem, EKH'lerin kültür süspansiyonu içinde kendiliklerinden farklılaştıkları ve doku benzeri küresel yapılar oluşturdukları embriyoid yapıların (EY) oluşumudur. Embriyoid yapıların kültürünün süresi, istenen hücre türüne göre değişir ve embriyoid yapıların farklılaşması, embriyoların implantasyon sonrası gelişimine karşılık gelecek şekilde ortaya çıkar. Bir kaç gün içinde mezodermal ve ektodermal prekürsörler oluşur ve bazı endodermal hücre türleri, pek çok EY'nin içlerinin boşaldığı ve kistik bir yapıya büründükleri 10. güne kadar sürdürülür (Amit ve Itskovitz-Eldor, 2009).



Şekil 2. 6 İnsan embriyonik kök hücrelerinin izolasyonu ve kültürü. İnsan embriyonik kök hücreleri, blastosistte bulunan iç hücre kitlesinin, içinde kültür ortamı adı verilen ve besleyici maddeler içeren bir medyum bulunduran plastik kültür kaplarına aktarılması ile gerçekleştirilir. Hücreler çoğalır ve kültür kabının yüzeyine yayılır. Kültür kabının iç kısmı genellikle, bölünme özelliklerini kaybetmiş fare fibroblast hücreleri ile kaplıdır. İç kısmı kaplayan bu tabakaya aynı zamanda besleyici tabaka adı verilir.

2.4.2 Erişkin Kök Hücreler

Erişkin ya da somatik kök hücreler, erişkin vücudunda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Bunlar, hasar gören dokuları tamir etmede kullanılan hücreleri oluşturan ve/veya ölen hücrelerin yerini alan hücrelerdir ve üretildikleri farklı organlardaki özel yerlerde bulunurlar (Hodgkinson vd., 2009). Erişkin kök hücreler, 1950' li yıllarda kemik iliğinden alınan kök hücreler kullanılarak kök hücre nakli yapılmasından bu yana klinikte kullanılmaktadır. Bu tarihten bu yana, alternatif doku onarım olasılıkları sunan ve kordon kanı, yağ, cilt, goblet hücreleri ve periferik kan (PK) gibi elde edilmesi daha kolay hücre kaynaklarından elde edilen diğer kök hücre türleri tanımlanmıştır. Erişkin kök hücreler farklılaştıkları dokular temel alınarak hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler olarak 2 gruba ayrılırlar (Tárnok vd., 2010).

2.4.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler

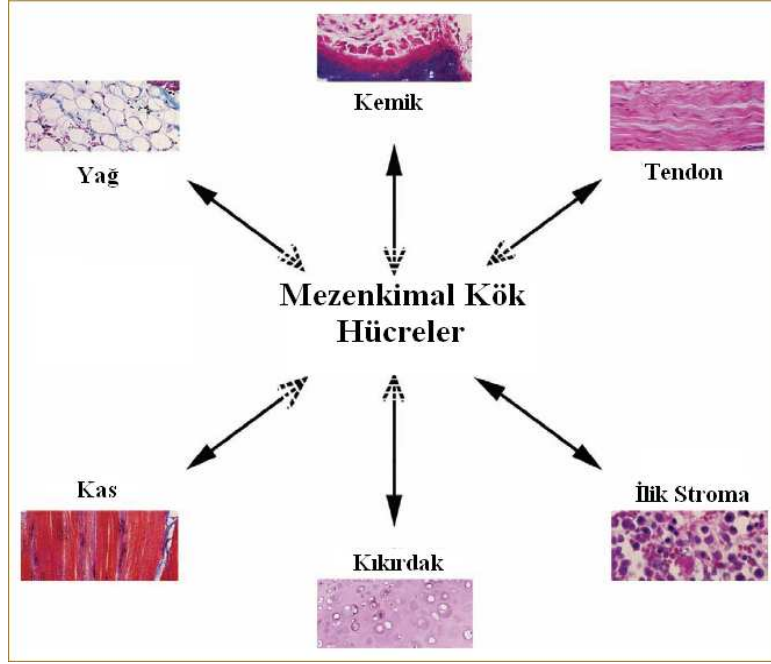
Memeli kemik iliği mikro çevresi, kemik homeostazisi ve hematopoezini destekleyen birçok farklı elemandan oluşur. Bu elemanlardan biri de mezenkimal hücreler olarak adlandırılan hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler; başlıca kemik iliğinde bulunan kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ ve kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan multipotent progenitor hücrelerdir. Kemik iliğinde non-hematopoetik kök hücrelerin varlığı ilk olarak 130

yıl önce Alman patolog Cohnheim tarafından ile sürülmüştür. Friedenstein ve arkadaşları, 1976'da fibroblast kolonisi yapan ünitelerde (CFU-F), nonhematopoetik kemik iliği progenitörleri olan mezenkimal kök hücreleri (MKH) tanımlamıştır. Friedenstein, fetal buzağı serumu içeren kemik iliği materyalinin ortama yayılması sonucunda, adezyon yeteneği olan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip hücre kolonilerinin varlığını bildirmiştir (Friedenstein vd., 1976). Takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokulara farklılaşabilen non-hematopoetik multipotent kök hücreler oldukları anlaşılmıştır (Pittenger vd., 1999; Jiang vd., 2002). Günümüzde bu hücreler genel olarak mezenkimal tip hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı mezenkimal kök hücre olarak adlandırılmışlardır. Farklı hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahip MKH'ler ile yapılan yoğun çalışmalar sonucu birçok farklı dokudan mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi mümkün olmuştur (Çizelge 2. 3).

Çizelge 2. 3 Mezenkimal kök hücrelerin elde edildiği kaynaklar

Kemik iliği
Kemik trabeküler dokusu
Kordon kanı
Plasenta
Wharton jeli
Amniyon mayı
Yağ dokusu
Tendonlar
Snovyal membran
Karaciğer
Diş pulpası

Mezenkimal kök hücreler (MKH), yayılma potansiyeli olan ve *in vitro* olarak kondrojenik, osteojenik, adipojenik ve miyojenik serilere dönüşebilen hücreler olarak tanımlanır (Şekil 2. 7). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, uygun koşullar altında, MKH'lerin, hepatosit ve nöron benzeri hücrelere farklılaşma kabiliyetlerinin de olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2. 7 Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre türlerine farklılaşma potansiyeli. MKH'ler uygun koşullar altında kemik, kıkırdak, adipos, kas, tendon ve stroma hücrelerine farklılaşabilirler. İki yönlü olarak gösterilen oklar dediferensiasyonu ve transdiferansiasyonu belirtir (Song ve Tuan, 2004).

Mezenkimal kök hücreler, MKH ve hematopoetik kök hücrelerin öncülleri olduğu düşünülen farklı kök hücre gruplarını da içine alan heterojen bir hücre grubudur. Bunlar; multipotent erişkin progenitor hücreler (MAPC), multilineage uyarılabilir kök hücre (MIAMI) ve çok küçük embriyonik hücre benzeri kök hücrelerdir (VSEL) (Sauerzweig vd., 2009).

Mezenkimal kök hücreler, sahip oldukları farklılaşma potansiyelleri ve zayıf immün yanıt oluşturma özellikleri sayesinde klinik kullanıma uygundurlar. Bu özellikleri ile mezenkimal kök hücreler Avrupa Birliği (AB) Tıp Ajansı tarafından "İlaç Hücre (Cell Drug)" kapsamına almışlardır (Bey vd., 2010; Parekkadan vd., 2010).

2.4.2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Genel Özellikleri:

Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu (ISCT) mezenkimal kök hücreleri tanımlamak için 3 özellik bildirmiştir:

1. MKH'ler standart kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilen hücrelerdir,
2. MKH'ler yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4)ve CD90 gibi non-hematopoetik hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmelerine rağmen, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR gibi tipik hematopoetik belirteçleri göstermezler,
3. *İn vitro* koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilirler (Tögel ve Westenfelder, 2007; Kucia vd., 2007; Horwitz vd., 2005; Dominici vd., 2006).

2.4.2.1.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği dışında adipoz doku, göbek kordon kanı, plasenta, amniyotik sıvı ve amniyotik membran gibi çeşitli fetal dokulardan izole edilebilir. Son yıllarda pek çok çalışma, insan göbek kordonundaki Wharton jelinin, primitif MKH'ler bakımından zengin bir kaynak olduğunu göstermiştir (Lee, 2008).

Klinik uygulamalarda kullanılmak üzere izole edilecek olan hematopoetik veya mezenkimal kök hücreler için kullanılan hücre kaynakları; kemik iliği, kordon kanı, periferik kan ve yağ dokusudur. Kemikiliği ve kordon kanından hematopoetik veya mezenkimal kök hücreleri elde etmek için herhangi bir uyarıcı faktör kullanılmasına gerek yoktur. Ancak periferik kandan kök hücrelerin elde edilebilmesi için kan alımından önce G-CSF ile indükleme yapılması gerekir (Demirer vd.,1996; Appelbaum, 1996; Ratajczak vd., 2007; Körbling ve Anderlini, 2001; Grove vd., 2004; Hassan ve El-Sheemy, 2004; Li vd., 2006).

Kaynaklarına bakılmaksızın, farklılaşmamış MKH'ler, fibroblast benzeri morfolojiye ve kendi kendilerini kopyalama kabiliyetine sahip hücrelerdir. Dolayısıyla potansiyel olarak, doku ve organ rejenerasyonu için yeterli sayılara ulaşmak üzere çoğaltılabilirler (Lee, 2008). Mezenkimal kök hücreler, ya MHK'nin özelliklerine dayanan doğrudan plakalama, ya da hücre yüzey markerleri kullanımı ile elde edilir. Her iki metodoloji de belirli sınırlamalar içerir. Kültür plastiğine dayalı olarak elde edilen saflaştırılmış popülasyonun homojenliği, hücrelerin yalnızca yüzde 10 ila 20'sinin multipotent farklılaşma kabiliyetine sahip olması nedeniyle yüksek değildir. MKH'lerin kültürü, doku kültüründe telomeraz faaliyetinin kaybı ile telomerin kısalmasının bir sonucu olarak izole hücrelerin popülasyonun 40 kez iki katına çıkması --yaşlı donörler için 25 kez-- sınırlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, klinik uygulamalar için, kültürdeki hücreler, bu uzatılmış genişleme yöntemi kullanılırken 250 kez

iki katına çıktıktan sonra önemli şekilde genetik instabilite göstermişlerdir ve bu da, uzatılmış *ex vivo* kültür süresi olmaksızın yeterli sayıda hedef hücrenin geliştirilebilmesi için verimli büyütme yöntemleri ve etkin farklılaştırma protokolleri gereğine işaret etmektedir (Placzek vd., 2009).

2.4.2.1.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Özellikleri

Kültür ortamındaki mezenkimal kök hücrelerin morfolojileri, ışık veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde fusiform şekilli, iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olarak görülürler. Morfolojik özellikleri fibroblastlara benzemekle birlikte en önemli farkları nükleus yerleşiminin fibroblastlarda asimetric olmasına karşın bu hücrelerde simetric olmasıdır (Wu vd., 2009).

2.4.2.1.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri ile ilgili çalışmalar genellikle primer hücreden ziyade kültürde çoğaltılmış hücrelerde araştırılmıştır. Primer mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri hakkında sınırlı sayıda çalışma vardır. Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücrelerin antijenik özelliklerine bakıldığında kendilerine has bir belirteç taşımadıkları; endotel, epitel ve kas hücrelerine benzer fenotipik özelliklere sahip oldukları görülmektedir. Kültürde çoğaltılmış mezenkimal kök hücreler CD45, CD34, CD14, CD11 gibi hematopoetik belirteçleri ve CD80, CD86, CD40 gibi ko-stimülatör molekülleri eksprese etmezler. Mezenkimal kök hücre için tipik olarak kabul edilen belirteçler CD105 (SH2) ve CD73 (SH3/4)'tür. Fibroblast yüzey markeri olan STRO-1 mezenkimal kök hücreler tarafından da eksprese edilmektedir. Ayrıca mezenkimal kök hücreler CD71 (transferin reseptör) ve CD90 (thy-1) taşırlar. Farklı dokulardan elde edilen hücreler genel olarak benzer fenotipik özelliklere sahip olmakla birlikte, bazı farklılıklar da göze çarpmaktadır. Örneğin, yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler, yüzeyinde CD49d taşıırken, CD106 taşımamaktadır; kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler de ise aksine CD49d negatif, CD106 pozitifdir. Erişkin mezenkimal kök hücrelerin, hücre yüzeyinde HLA sınıf I antijenlerini zayıf eksprese ettikleri, HLA sınıf II antijenlerini taşımadıkları, ancak hücre yüzeyinde taşınmayan HLA sınıf II antijenlerin sitoplazmada bulunduğu saptanmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin ko-stimülatör molekülleri ve HLA sınıf II antijenlerini eksprese etmemeleri gibi özellikleri graft versus host (GvDH) hastalığı tedavisinde kullanılmalarına olanak sağlamıştır. Fetal karaciğer kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ise HLA sınıf II

antijenleri hem hücre yüzeyinde hem de intrastoplazmik olarak içermedikleri gösterilmiştir. Bu bulgular MKH antijen ekspresyonunun fetal yaşamdan erişkin yaşama geçişte değiştiğini düşündürmektedir.

Mezenkimal kök hücreler ve hematopoetik kök hücreler bir çok adezyon molekülünü ortak olarak bulundurlar. Bunların başlıcaları fibronektin, laminin ve kollojene bağlanmadan sorumlu olan integrin ailesi ve L-Selektindir. Mezenkimal kök hücrelerin ayrıca sitokin, kemokin ve ekstraselüler matriks proteinlerini sentezleme yeteneği vardır. Sekrete ettikleri başlıca sitokinler Interleukin-6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), Flt-3 ligand ve stem cell faktördür (SCF). Ayrıca kültür ortamlarına IL-1 α ilave edildiğinde, granülosit-koloni stimüle edici faktör (G-CSF), granülosit -makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) sekrete etme yeteneği kazanırlar. Mezenkimal kök hücrelerin GM-CSF, G-CSF, SCF ve IL-6 salgılama yetenekleri, allojeneik ve otolog hematopoetik kök hücre nakillerinde, hematopoetik kök hücrelerin yerleşim, çoğalma ve farklılaşmalarına katkı sağlayarak nötrofil ve trombosit engrafmanını hızlandırıcı etki gösterdiği düşünülmektedir (Newcomb vd., 2007; Buzanska ve Lukomska, 2008; Can, 2008; Lanza vd., 2004; Montaya vd., 2005).

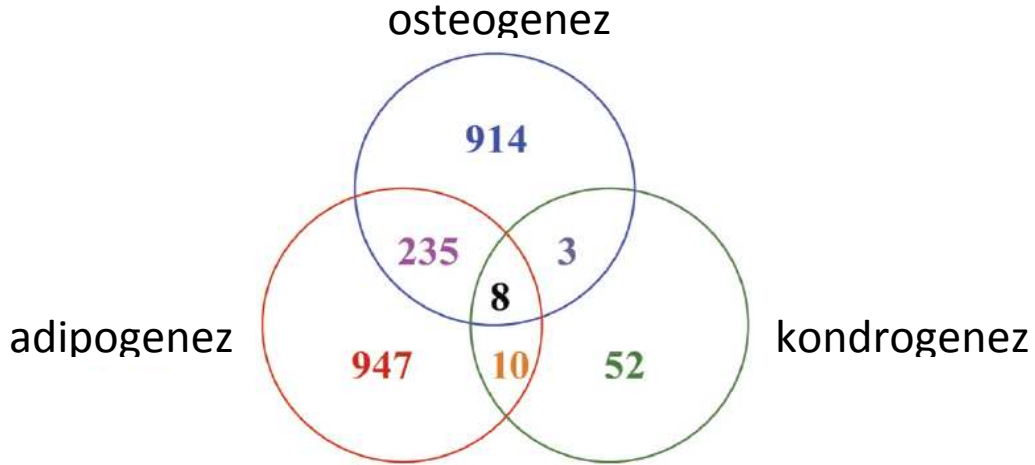
2.4.2.1.5 Mezenkimal Progenitör Hücreler:

Mezenkimal progenitör hücreler (MPH'ler) çeşitli bağ dokulardan izole edilmiştir ve yaygın olarak mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılırlar. Bir kök hücre, klonal kendi kendini yenileme ve çok çeşitli farklılaşma potansiyeline sahip bir hücre olarak tanımlanır. Bu çerçevede "MKH" terimi, bir mezenkimal hücre kaynağından tek hücreden ortaya çıkan klonal popülasyonların kendi kendilerini yenilemesini gösteren çok az veri olduğu için eleştirilmektedir (Sarugas vd., 2009).

2.4.2.1.6 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması

Erişkin kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler farklı dizilere farklılaşabilir (Adiposit, Miyofibroblast, Osteoblast, Endotelyal hücre, Kondrosit, Nöral hücre, Kalp kası, Karaciğer hücresi, İskelet kası, Böbrek tübül hücresi, Tenosit). Farklılaşmalarda rol oynayan genlerin bir kısmı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Şekil 2. 8). Bu farklılaşmış hücreler CD29, CD44, CD105 ve CD166 için pozitif ve yaklaşık iki günlük bir iki katına çıkma ömrü vardır, altı kata kadar kültürde genişleyebilir ve biyolojik işlevleri yaşlanma ile azalmaz. MKH'lerin basit bir kemik iliği aspiratından 10 hafta içinde yaklaşık 50 kez ikiye katlanarak

çoğaltılması mümkündür. Bu özellikleri ile, ilk ve ikinci trimesterde fetal kan, karaciğer ve kemikten, amniyotik sıvı ve kordon kanından ve erişkin periferel kandan, yassı kemikler ve adipoz dokudan alınan hücelere benzerdir. Ayrıca, herhangi bir telomer kısalması ya da karyotipik anomali olmaksızın belirli koşullar altında yüzden fazla kez çoğaltılabilen bu hücrelerin CD133 pozitif bir alt popülasyonunun, yalnızca mezenkimal hücre türlerine değil (osteoblastlar, kondrositler, adipositler, miyositler) aynı zamanda endotel ve nöroektodermal fenotip ve işleve sahip hücelere de farklılaşma kabiliyeti de kanıtlanmıştır. İnsan MKH'lerinin (iMKH) fare iskelet miyositler ile kültüre edildiğinde kas hücrelerine farklılaşması ve sınırlı miyojenik potansiyel göstermesi ile MKH'lerin daha geniş bir farklılaşma kabiliyeti olduğu da öne sürülmüştür. Kardiyomiyosit farklılaşma da, uygun morfoloji, fizyolojik kardiyomiyojenik yanıt ve uygun adrenerjik ve muskarinik yüzey reseptörlerinin ifadesi ile gösterilmiştir (Placzek vd., 2009). Daha önce, erişkin kemik iliğinden alınan kök hücrelerin, embriyonik hücrelerin totipotent olması karşısında benzer bir hücre türünü ürettiği düşünülmekteydi. Bu multipotent erişkin kök hücrelerin keşfi ile kalıtsal ya da dejeneratif hastalıkların tedavisi ve kırıkta, kemik ve miyokardiyum gibi dokuların onarımı için gelecek vaat eden ve daha bol bir potansiyel kaynak sunulmuştur (Lin vd., 2006).



Şekil 2. 8 MKH farklılaşmasında rol alan gen sayıları (Song vd., 2006). Osteogenez, adipogenez ve kondrogenezin her üçünde de rol oynayan genler: Period homolog 1 (PER1), Nebulette (NEBL), nöronal hücre adezyon molekülü (neuronal cell adhesion molecule-NR-CAM), FK506-BP 5, İnterlökin 1 tip-II reseptörü (IL1R2), Çinko parmak protein 145 (ZNF145), Doku inhibitörü MMP 4 (TIMP4), Serum amiloidi A2 (Gorka vd., 2007; Vambutas vd., 2009; Tanabe vd., 2008).

2.4.2.1.7 Mezenkimal kök hücrelerin Avantajları

İnsan mezenkimal kök hücrelerinin hücrel tedaviler için temel olarak kabul edilmesinin nedenleri; hastadan kolayca izole edilmeleri, *in vitro* koşullarda hızla çoğaltılabilmeleri, genetik mühendisliğine bağlı olarak ilgili genler ile tedavi yapılmasına uygun olmaları, nontümörojenik olarak kültür ortamında stres koşulları olmaksızın geniş yayılma gösterebilmeleri ve çeşitli mekanizmalarla doku hasarlarını onarabilmeleridir. Bu onarım mekanizmaları şunlardır; (a) dokuya özgü fenotipe farklılaşma, (b) hasarlı hücrelerin onarımı ve hücrelerin çoğalmasını sağlayan kemokinlerin salgılanmasının sağlanması ve (c) muhtemelen mitokondri veya mitokondrial DNA'nın transfer edilmesi (Prockop vd., 2008).

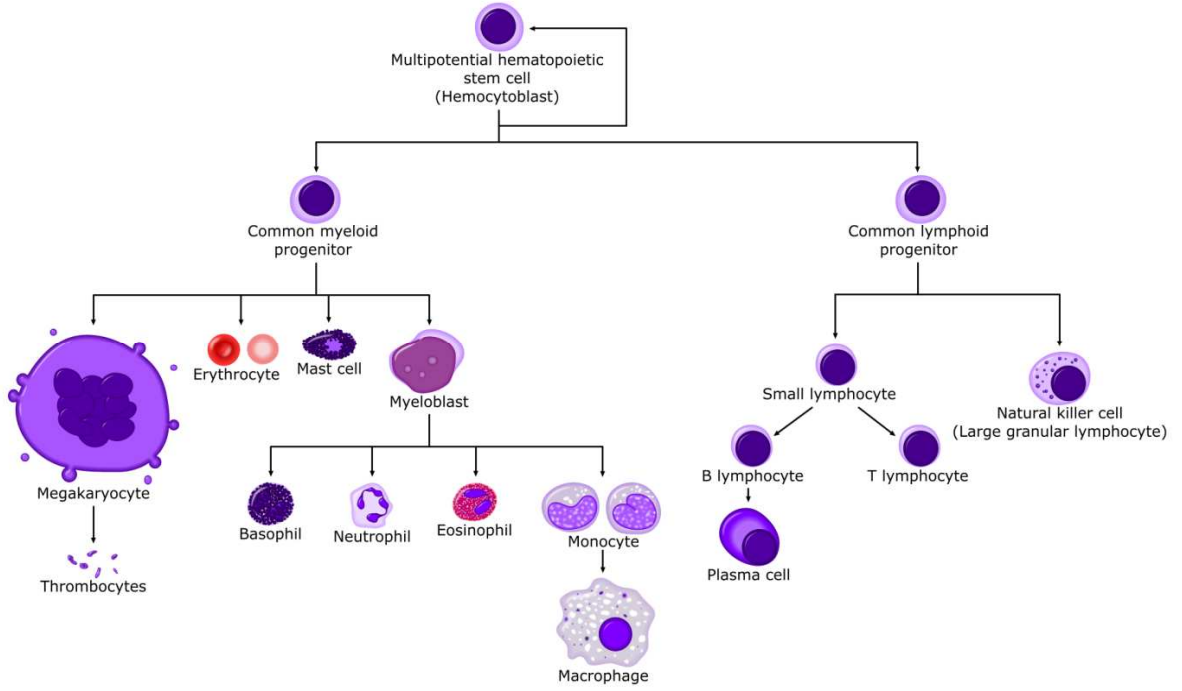
Kemik iliği, her 10.000 çekirdekli hücreye karşın 1 mezenkimal kök hücre içerir (Bu oran kordon kanında $1/10^8$ 'e kadar düşebilmektedir) (Sotiropoulou vd., 2006). Çocuklarda 29 CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranı bulunurken, ileri yaşlarda bu oran 3.2CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranına kadar düşmektedir (Baxter vd., 2004). Yapılan araştırmalar fetal

MKH'lerin sadece sayısal açıdan değil erişkin kök hücrelerden doku gelişiminde, hücre bölünmesinde ve immünolojik antijen sunumunda rol oynayan genler açısından da önemli farklılıklar taşıdığını göstermektedir (Gotherstrom vd., 2005; Bobis vd., 2006). Ancak MKH'lerin laboratuvarında farklılaştırılması ve üretilmesi ile bu farklılıklar ortadan kaldırılabilmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahip olmaları doku mühendisliği için ideal aday olmalarına neden olmuştur. Ayrıca engrafmanı hızlandırıcı ve immunmodulator etkilerinin keşfi kemik iliği transplantasyonunda klinik kullanıma girmelerine olanak sağlamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin başta hematopoetik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeline sahip olmaları bu hücrelere olan ilgiyi giderek artırmıştır.

2.4.2.2 Hematopoetik Kök Hücreler:

Hematopoetik kök hücreler, kendini yenileme kabiliyetine ve özelleşmiş kan hücrelerine, (eritrositler, trombositler ve lökositlere) farklılaşma kabiliyetine sahip, farklılaşmamış hücrelerdir (Şekil 2. 9).



Şekil 2. 9 Multipotent özelliğe sahip hematopoetik kök hücreler, farklı fonksiyonel hücre tiplerini (nötrofil, monosit/makrofaj, bazofil, eozinofil, eritrosit, trombosit, mast hücreleri, dendritik hücreler, B ve T lenfositleri) oluşturabilirler.

Günümüzde 4 farklı kaynaktan (kemik iliği, kordon kanı, periferik kan ve plasenta) elde edilen hematopoetik kök hücreler, miyeloablatif, miyeloablatif benzeri ya da miyeloablatif olmayan işlemlerden sonra lenfematopoetik işlevin geri kazanımı için kullanılmaktadır. E. D. Thomas tarafından 1963'te tanımlanan, kemik iliğinden elde edilen kök hücreler, klasik kök hücre kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bir hematopoetik kök hücre kaynağı olarak periferik kan 1981'de kanıtlanmıştır ve kordon kanı bir kaynak olarak 1988'de tanıtılmıştır. Farklı kök hücre kaynakları, hücrelerin sayı ve özelliklerine göre farklı rekonstrüktif ve immünojenik özelliklere sahiptir (Körbling ve Anderlini, 2001).

Ciddi kayıplar sonrasında bile, kan hücrelerinin yüksek rejeneratif potansiyeli ve kendini yenileme yeteneği ve lenfositlerin döngüsü, hematopoetik kök hücrelerin rejeneratif potansiyelinin göstergesidir. Alman patolog Julius Cohnheim 1867'de, kemik iliğinin enflamatuar yara iyileşme süreçlerinin içinde bulunan fibroblastlar da dahil olmak üzere, sirkülasyonda olan hücreleri ürettiğini göstermiştir. Bununla birlikte, kan hücresi türlerinin klonojenitesi ve kök hücre teorisi kavramı ancak 1961'de kanıtlanmıştır. Bu nadir kemik iliği hücrelerinin kimliği konusunda oldukça fazla bilgi birikimi olmasına karşın, bu hücrelerin tam kimliği halen tartışmalıdır ve bu hücreyi doğru bir şekilde tanımlamak için tek bir belirteç bulunmamaktadır. Bazı laboratuvarlar tarafından, belirli pozitif belirteçlerin gösterilmesini ve farklılaşma ya da dizi markerlerinin yokluğunu gerektiren HKH'ler bakımından zengin hücre popülasyonlarını tanımlanmıştır. Bununla birlikte tek bir hücrenin hematopoetik kök hücre faaliyeti, öldürücü dozda radyasyona maruz bırakılmış bir farenin ilgili hücre ile başarılı tedavisi sonucu elde edilebilir. Hematopoetik kök hücreler, kolay erişilebilirlikleri, çeşitli yüzey marker antikörlerine sahip olmaları ve klinik uygulamalardaki geniş kullanımları da dahil olmak üzere fare modellerinin bulunabilmesi nedeniyle, vücuttaki en iyi anlaşılan kök hücrelerdir. Bununla birlikte 1990'ların sonunda, bazı laboratuvarlar, farklılaşma ve dizilere ayrılmanın geri çevrilemezliği konusunda uzun süredir devam eden dogmaları sorgulayan HKH'lerin daha önceden bilinmeyen ve şaşırtıcı özelliklerini keşfettiler. Böylece, kemik iliği kaynaklı hücrelerin yalnızca doğal dizilerine ayrılmadığı, kas ve karaciğer hücrelerine dönüştükleri de rapor edilmiştir (Tögel ve Westenfelder, 2007).

Farklı kaynaklardan izole edilen HKH'ler, büyük oranda benzer özelliklere sahiptir; ancak, elde edilen hücre miktarları önemli ölçüde değişkenlik gösterir. Hematopoetik kök hücreler, miyeloid ve lenfoid dizileri de içerecek şekilde tüm kan hücrelerini meydana getirme kabiliyetine sahiptir. Hematopoetik kök hücrelerin iskelet kası, kalp kası, karaciğer, endotel hücreler ve nöronlara farklılaştığını bildiren çalışmalar da günümüzde mevcuttur. Hematopoetik kök hücrelerin sürdürülebilir simetrik bölünme kabiliyetleri sayesinde, az sayıda HKH'nin boşaltıldıktan sonra kemik iliğini doldurabildiği görülmektedir. Ayrıca hematopoetik kök hücrelerin hızlı ve uzun süreli genişleme kabiliyeti, bunları biyoprosesler için uygun bir aday hücre haline getirmektedir.

2.4.2.3 Hematopoetik Kök Hücre Kaynakları

Başlarda, kemik iliği, allojenik transplantasyon için kullanılan progenitör hücrelerin tek kaynağıydı. 1990'ların başında belirli avantajlar sağlayan mobilize (çoğunlukla granülosit

koloni stimule edici faktör-G-CSF) ile periferik kan (PK)da klinik olarak önerildi. Periferik kandan daha büyük hacimde hücre alınabilmesi, toplanan hücreler içindeki progenitör ve yardımcı hücrelerin sayısını arttırmıştır. Transplantasyon için, aşılama ve T-hücresi kimerizmini kolaylaştıran daha hızlı miyeloid ve lenfoid geri kazanım sağlamaktadır. Ek olarak, mobilize PK toplama ve G-CSF kullanımına ilişkin küçük riskler yanında kemik iliği bağıışı ile ilişkili riskler ve yan etkiler önemli ölçüde daha fazladır. Bununla birlikte biyoprosesler için, hücrelerin büyük bölümü düşük genişleme kabiliyetleri nedeniyle çıkarılmakta ve bu da PK HKH'lerini, kemik iliğinden alınan kök hücrelerden daha az uygun hale getirmektedir. Kordon kanı, HKH kaynağı olarak kullanılmaya başlanmış ve 2004 yılı itibarıyla Avrupa'daki toplam allojenik transplantasyonların yüzde 3'ü ve ilişkisiz allojenik transplantasyonların yüzde 7'sinde, kordon kanı kullanılmaktadır. Ancak, düşük toplama hacmi nedeniyle kordon kanı kullanımı önünde klinik engeller vardır. Bu durum naklin başarısız olması ya da relaps gibi komplikasyonlara neden olmaktadır. Bununla birlikte kordon kanının terapötik potansiyeli de azımsanmamalıdır; düşük insan lökosit antijen uyumluluk (HLA) kısıtlamaları, donörlerden alınma ile ilgili düşük risk ve alındığında kullanıma hazır halde olması, kordon kanının yeterli miktarda alınabildiği takdirde HKH'ler için umut vaat eden bir kaynak olarak karşımıza çıkmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, bu durum, çift kordon kanı transplantasyonu ve kordon kanının bir üçüncü taraftan haploidentik hematopoetik progenitör hücreler ya da mezenkimal stroma hücreleri ile birlikte infüzyonu gibi farklı yaklaşımların test edildiği aktif bir araştırma alanıdır (Mahmoud vd., 1999).

2.5 Elde Edildikleri Kaynaklara Kök Hücrelerin Özellikleri

2.5.1 Dokulardan Elde Edilen Kök Hücreler

Embriyonik kök hücrelerin aksine, dokulardan elde edilen MKH'ler, kanserli yapı oluşturmayan, etik sorunlara yol açmadan bireylerden kolaylıkla elde edilebilen kök hücre kaynaklarıdır. Son yıllarda dokulardan elde edilen kök hücrelerin araştırmalarda ve klinikte kullanımı giderek artmaktadır. Ayrıca klinikte Osteogenezis imperfecta, Hematopoetik iyileşme ve Kemik dokusu onarımına yönelik hücresel tedavi uygulamalarında başarılı sonuçlar gösterilmiştir. Ancak tüm bu avantajlarına rağmen dokulardan elde edilen kök hücrelerin etkin bir şekilde saflaştırılmalarında ve tanımlanmalarında zorluklar olmasının yanında tedavilerde alıcıda yüksek oranda bağışıklık yanıtı ortaya çıkma riski de taşımaktadır. Ayrıca erişkin dokulardan elde edilen kök hücrelerin sahip oldukları sınırlı büyüme kapasiteleri nedeniyle kültür ortamında uzun süreler çoğaltılmaları mümkün olmamaktadır.

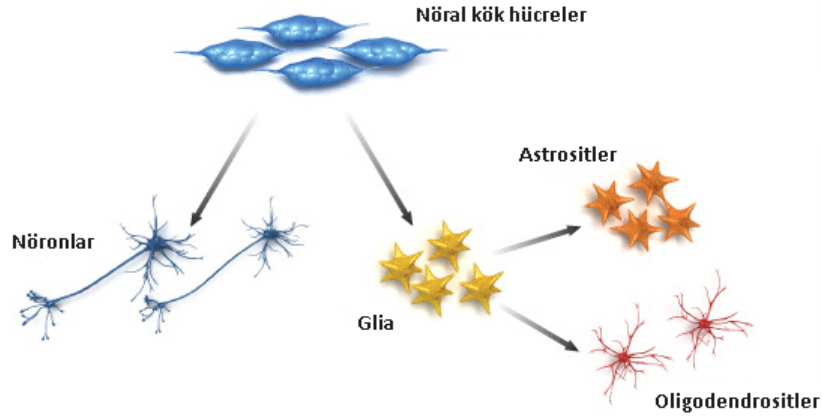
(Horwitz vd., 2002; Koç vd., 2000; Petite vd., 2000).

2.5.1.1 Periferik kan kök hücreleri

Hayvan modelleri üzerinde yapılan ilk çalışmalar, uyarılmış periferik kanda, kemik iliğinden daha fazla tek çekirdekli hücre olduğunu göstermiştir. Periferik kan kök hücrelerinin hematopoetik nakil için kaynak olarak kullanılması, büyük sayıda afereze ihtiyaç duyulması (genellikle 7 ya da daha fazla) sebebiyle oldukça zordur. Kısa süre önce, kemoterapi kullanımı ve/veya hematopoetik büyüme faktörleri ile uyarılma ile periferik kandaki CD34+ hücreleri olan hematopoetik progenitör sayısında önemli bir artışa yol açtığı bildirilmiştir. Bu sebepten, periferik kan kök hücrelerinin kemik iliğine alternatif olarak kullanımına yönelik yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Ototolog kullanım için, granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF) ya da granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ile tedavi gerekmektedir. Nakil sonrasında iyileşme için mobilize periferik kan kök hücrelerinin kullanılması kemik iliği kullanımını sonrası iyileşmeden önemli ölçüde daha hızlıdır. Periferik kan hücrelerinin otolog nakiller için kullanımıyla ilgili endişeler, otolog kemik iliğine kıyasla tümör hücreleriyle kirlenme ihtimalinin daha yüksek olmasından dolayı sakıncalıdır. Allojeneik nakil için T-hücre miktarının kemik iliğine göre daha yüksek olması da endişe vericidir. Ancak, periferik kan kök hücreleri kullanımının hızlı ve güvenilir olması verici için cerrahi işlemlerin olmaması göz önünde bulundurulduğunda periferik kan kök hücrelerin kemik iliğinin yerine geçmesi olasıdır (Appelbaum vd., 1996).

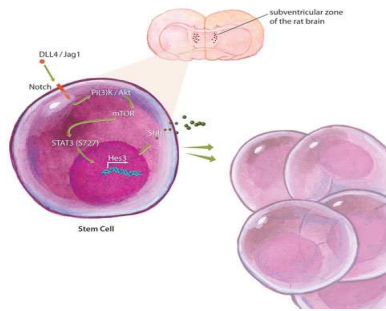
2.5.1.2 Nöral kök hücreler

Kısa süre öncesine kadar sinir sistemi hücrelerinin kendilerini yenileyemedikleri düşünülüyordu. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarda insan beyinde nöral hücrelerin öncülü olan kök hücrelerin olduğu anlaşıldı. Bu kök hücrelerin, fetusun beyin ve sinir sistemini oluşturan ve nöron, astrosit ve oligodendrositleri oluşturan kök hücrelere benzediği belirlenmiştir (Şekil 2. 10). Bu gelişmelerin ardından araştırmacılar hayvan deneylerinde kök hücreleri kullanarak bu sinirleri tamir etmeyi başarmıştır (Teng vd., 2002).



Şekil 2. 10 Nöral kök hücreler sinir sistemini oluşturan ve nöron, astrosit ve oligodendrositleri oluşturan kök hücelere benzediği belirlenmiştir.

Nöral kök hücreler (NKH) uzun süreli kendini yenilemeye yönelik kapasiteye sahip ve farklı nöral soylar üretebilen özel somatik hücrelerdir. *In vivo* olarak büyük ölçüde pasif olduğuna inanılan erişkin NKH'lerin kimlikleri halen tartışma konusudur. Bir dizi genetik izleme serisine dayalı önde gelen model olan farmakolojik ablasyon, morfolojik ve immünohistokimya analizi, gliyal fibriller asidik protein (GFAP) ortaya koyan ve belli radyal gliyal özellikler gösteren özel astrositlerin subventriküler bölge (SVZ) ve subgranüler bölgede (SGZ) erişkin NKH'lerin bulunduğunu öne sürmektedir (Şekil 2. 11).



Şekil 2. 11 Erişkin nöral kök hücrelerin fare beyнинin subventriküler bölge ve subgranüler bölgesinde bulunduğu gösterilmiştir.

Yaralanma halinde memeli önbeynindeki karıncıkların etrafındaki $CD133^+$ ependimal hücreler etkinleşerek erişkin NKH görevini gören radyal gliya benzeri hücelere dönüştüğü gözlenmiştir. Erişkin SGZ'sinde cinsiyet belirleme bölgesi Y-kutusu 2'yi (Sox2) ifade eden

ve daha fazla Sox2⁺ hücrelerinin, nöron ve astrositin artmasına sebep olan bir grup hücre popülasyonunun erişkin NKH'si olduğu öne sürülmüştür. Erişkin merkezi sinir sistemindeki (MSS) bazı hücrelerin normal şartlarda ya da büyük yaralanmalar sonrasında nörojenez aracılık etmede NKH rolü üstleniyor olması, olfaktor epiteldeki erişkin nörojenezinin kanıtıdır.

Erişkin NKH'lerinin özellikleri tamamen karakterize edilmiştir. Örneğin, insan beyinde nöron, astrosit ve oligodendrosit üretme kapasitesine sahip tripotent NKH'nin varlığı *in vivo* olarak gösterilmiştir (Duan vd., 2008)

Memeli beyinde hem kendini yenileyebilen hem de merkezi sinir sistemin üç nesil yolu boyunca üretebilen bir NKH popülasyonu mevcuttur, fakat NKH'nin postnatal MSS'deki *in vivo* tanımlanması ve lokalizasyonunun zor olduğu ortaya konmuştur. Kısa süre önce, farklı çalışmalar kirpikli ependimal (CE) hücrelerinin ve özel subependimal bölge (SEZ) astrositlerinin erişkin beyindeki NKH için aday olduklarını göstermiştir. Başka bir çalışmada ise bu iki NKH adayının *in vitro* olarak multipotent küresel klon – nörosfer – oluşturma potansiyelini incelenmiş ve postnatal ve erişkin beyinden izole edilen ve multipotent proliferatif klonlar – nörosferler – olarak büyüeyebilen hücreler nöron, astrosit ve oligodendrosit oluşturma özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir. Nörosfer oluşturan hücreler nöral kök hücre (NKH) olarak kabul edilebilir ve hem temel nörogelişim süreçleri için bir model, hem de beyin yaralanmaları ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için potansiyel bir kaynak teşkil etmektedir. NKH'nin biyolojisini anlamada önemli bir adım da onların tanımlanmaları ve *in vivo* lokalizasyonlarıdır. Periventriküler subependimal bölgenin (SEZ) bir nörojenez kaynağı olduğu ve bu bölgenin muhtemelen postnatal ve erişkin beyindeki en yüksek NKH yoğunluğunu içerdiği gösterilmiştir. Subependimal bölgenin altındaki ventriküler sistemin etrafındaki kirpikli ependimal (CE) hücreler başka bir önerilen NKH kaynağıdır. Kirpikli ependimal hücrelerinin erişkin memelilerde yeni nöronlar üretme yeteneğine sahip olma ihtimalinden uzun süredir şüphe edilmiştir ve bu durum düşük omurgalılarda merkezi sinir sistemi (MSS) yaralanmaları sonrasında CE'nin nöron üretmesine dair raporlarla desteklenmiştir (Laywell vd., 2000).

NKH'lerin anatomik konumu ve nesil özellikleri ancak nihayet subependimal bölgede ve koku alma bulbunda farklılaşmak ya da etraftaki hipokampal nöral devreye entegre olmak amacıyla rostral migratör akımda migrasyona uğrayan progenitörler üretmek için bölündükleri hipokampal dentat girus (DG) içinde tanımlandıkları zaman tespit edilmiştir. HKH'lere

benzer biçimde, nestin+ olan NKH'ler işlevsel olarak sürekli kendini yenileyen ve hem gliyal hem de nöral nesilden ara ve olgun hücreler üretme potansiyeline sahip olan hücreler olarak tanımlanabilir (Lin vd., 2006). Memeli santral sinir sisteminde yer alan nöron ve nörogial hücreler aynı progenitor nöronal kök hücresinden köken almaktadır. Bu hücreler farklılaşmamış hücreler olarak, sinir sisteminin en az bulunan ve en primordial hücreleridir. Nöral kök hücrelerin taşıması gereken özellikler şu şekilde belirlenmiştir: (1) Multipotent hücreler olmalı ve sinir sistemi hücrelerinden nöron, astrosit ve oligodendrositlerin bütün alt türlerine farklılaşabilmelidir, (2) Sinir sistemi hücre tiplerine farklılaşabilme ve sinir sisteminin dejenere veya hasarlanmış bölgelerinde yeniden çoğalabilme yeteneğinde olmalıdır (3) Seri olarak transplante edilebilir olmalıdır. (4) Kendi kendini yenileyebilir olmalı, aynı potansiyel ve özellikleri taşıyan yeni hücreler üretebilme yeteneğinde olmalıdır. Multipotent nöral kök hücreler, santral sinir sisteminin gelişimi boyunca bulunan hücreler olmakla birlikte, erişkinlerde, belirli bölgelerde bulunabilirler. Bir HMG box transkripsiyon faktörü olan, SOX2, farelerde *in vivo* ve *in vitro* nöral kök/progenitor hücrelerde gösterilmiştir. Sinir sistemi gelişmesi sırasında, NKH'lerin, SSEA-1, HNK-1, PSA-NCAM, prominin-1, gp130, kondroidin sülfat proteoglikanları, heparan sülfat proteoglikanları, cystatin C, galectin- 1, glikolipidler, ve Notch I ekspresyonu ettikleri gösterilmiştir (Teng vd., 2002).

2.5.1.3 Karaciğer Kök Hücreleri

Erişkin karaciğerinde hepatik kök hücrelerin varlığı günümüzden yaklaşık 40 yıl önce Wilson ve Leduc tarafından öne sürülmüştür. Fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, safra kanalının distal kolanjiyollerindeki hücrelerin besinsel yaralanma sonrasında karaciğer kütlelerinin restorasyonunu sağladıklarını göstermişlerdir. Deneysel çalışmalarda, normal erişkin karaciğerinin cerrahi reseksiyon ya da kanser yaralanması sonrasında tamamen yenilendiği gözlemlenmiştir. Böylece kayıp karaciğer kütlelerinin yenilenmesinde hepatositlerin onarıcı rolü anlaşılmıştır (Khan vd., 2006).

Sağlıklı karaciğerde dört ana hepatik progenitor türü hücre tanımlanmıştır. Bunlar oval hücreler, küçük hepatositler, karaciğer epitelyal hücreleri ve mezenkimal benzeri hücrelerdir. Oval hücreler hepatik yaralanmaya karşılık safra kanallarından üretilir. Bipotent farklılaştırma potansiyeli (hepatik ve biliyer hücreler) gösteren oval hücreler *in vitro* olarak çoğaltılabilirler. Küçük hepatosit hücrelerinin izolasyonu ilk olarak Mitaka ve arkadaşları tarafından bir parankimal olmayan fraksiyondan izole edilen karaciğer hücrelerinin santrifüjü sonrasında gerçekleştirilmiştir. Bu hücreler hepatositlerden daha küçük, *in vitro* proliferasyon

kapasitesine sahip ve *in vitro* olarak erişkin hepatosite dönüşebilme kabiliyetinde hücrelerdir. Karaciğer epitelyal hücreleri ise Tsao ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve bipotansiyel olarak *in vivo* ortamda hepatosit benzeri hücelere farklılaşabildikleri belirlenmiştir. Erişkin insan karaciğerinden izole edilen mezenkimal benzeri hücre popülasyonunun da yüksek seviye proliferasyon göstererek MKH'ler gibi geniş bir farklılaşma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerin, MKH'lerin immünolojik özelliklerini nasıl taşıdıkları henüz belirlenememiştir (Lysy vd., 2008).

Lagasse ve arkadaşları erişkin fare Kİ'inden alınan yüksek derecede saflaştırılmış kök hücrelerin, karaciğerdeki işlevsel hepatositleri üretebildiğini gösterilmiştir (Sharma vd., 2005). Hepatositlerin gelişimi sırasında mikroortamda ard arda birçok biyolojik süreç gerçekleşir. Hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol oynayan en önemli hücre dışı sinyaller; Nodal (aktivin), FGF'ler, BMP, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve onkostatın M (OSM)'dir. Hücreler arasında ise, transkripsiyon faktörleri hepatosit nükleer faktör (HNF) 3 α , β , HNF4 α , HNF1 α , β , HNF6, ve CCAAT çoğaltıcı bağlayıcı protein (C/EBP) α , β , belli gelişim aşamalarında karaciğere özgü gen ifadesini düzenlerler (Lin vd., 2006)

2.5.1.4 Kemik İliği Kök Hücreleri

Kemik iliği uzun yıllar boyunca öncelikle HKH kaynağı olarak görülmüştür (Körbling vd., 2001). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda kemik iliğinde embriyonun epiblastında bulunan çok küçük embriyonik benzeri bir kök hücre popülasyonunun olduğu da tespit edilmiştir (Körbling vd., 2001). Böylece yeni tanımlamaya göre kemik iliğinin içerdiği hücreler temelde iki ana kategoriye ayrılmıştır; HKH ve MKH (Tögel vd., 2007)

Kİ multipotent erişkin progenitör hücreleri (MAPC'ler) adı verilen nispeten az bulunan adherent bir kök hücre popülasyonu, birkaç ay boyunca belli büyüme faktörleri içeren (örn., epidermal büyüme faktörü ve platelet kökenli büyüme faktörü) büyüme ortamında kemik iliği hücrelerinin *in vitro* büyümesiyle izole edilebilirken, nispeten düşük hücre yoğunluğu $0.5-1.5 \times 10^3$ hücre/cm² muhafaza edilebilir. MAPC'ler, klasik endodermal, mezodermal ve ektodermal olarak elde edilen hücre türleri olan hepatosit, endotelyal hücreler ve nöronları *in vitro* olarak oluşturma özelliğine sahiptir. MAPC'lerin pluripotansiyalitetleri *in vivo* olarak da doğrulanmıştır; MAPC'ler, MAPC'lerin erken blastosistlere enjeksiyonundan elde edilen birçok fare dokusuna katkıda bulunabilir (bunlara beyin, retina, akciğer, miyokard, iskelet, kas, bağırsak, böbrek, dalak, Kİ, kan ve cilt dahildir). Aynı zamanda MAPC'ler subletal olarak ışınmış erişkin obez olmayan diyabet/şiddetli bileşik immünohasarlı (NOD/SCID)

farelere intravenöz olarak verildiğinde hematopoetik dokular (kan, kemik iliği ve dalak) ve akciğer, karaciğer ve bağırsakların epitelyal hücrelerini aşılabilir. Hematopoetik hücrelerden farklı olarak, farklılaştırılmamış MAPC'ler CD45, c-Kit, veya Sca-1 ifade etmezler. Bu hücreler MKH 'lerin ender bir alt popülasyonunu temsil ederler, ya da saflaştırılmaları için kullanılan uzun süreli *in vitro* kültür şartlarının bir yan ürünü olabilirler. (Dulbecco vd., 1959). Erişkin kemik iliğinden alınan hematopoetik kök hücreler iyi özelliklidir ve uzun süredir terapötik olarak kullanılmaktadır. 70 kg ağırlığındaki bir erişkinin yaklaşık 1.75 L işlevsel hematopoetik ilik hacmi vardır ve enfeksiyon ya da hemoraj gibi artan talepler halinde altı katına çıkabilir. Otolog olduklarından veya rıza gösteren bir vericiden alındıklarından dolayı bu hücrelerin kullanımıyla ilgili ahlaki bir tartışma da yoktur. Erişkin kemik iliği hücrelerinin potansiyel kullanımları mezenkimal kök hücre ile ilgili keşiflerle birlikte hız kazanmıştır.

2.5.1.4.1 Yetişkin İlik MKH'lerinin Biyolojisi

Kemik iliği MKH'lerinin farklılaşma yönü büyük ölçüde sitokinlerden etkilenmektedir. Örneğin kemik morfogenetik protein 6 (BMP-6) sadece kondrojenez ya da osteojenez yönelik farklılaşmayı etkilemez, aynı zamanda IL-6'nın hematopoez ve osteojenez üzerindeki etkileri sayesinde kemik iliği ortamının düzenlenmesine yardımcı olabilir. BMP-6'nın insan kemik iliği mikroortamındaki düzenleyici rolüne yönelik iki muhtemel mekanizma öne sürülmüştür: (i) insan MKH'lerinin osteoblastik farklılaşmasını geliştirebilir; ya da (ii) kemik iliği stromasında interlökin-6 üretimini düşürerek hematopoetik kemik iliği hücrelerinin osteoklastik farklılaşmasını azaltabilir.

2.5.1.4.2 Yetişkin Kemik İliği Kök Hücrelerinin Migrasyonu / Mobilizasyonu

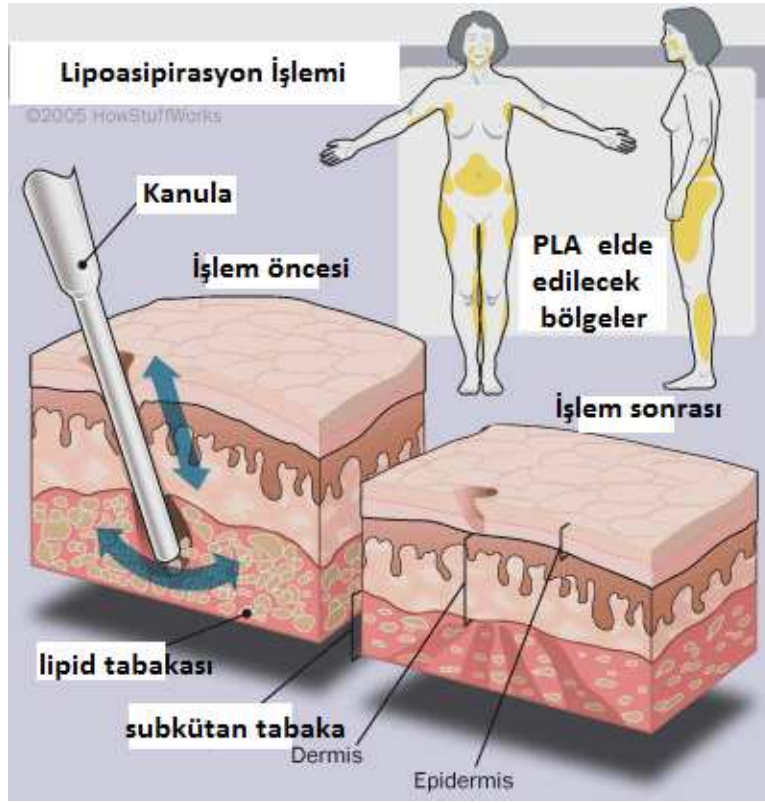
Kemik iliği kaynaklı hücreler ölümcül biçimde ışınmış immünolojik olarak uyumlu ikincil konağın hematopoetik sisteminin repopülasyonu özelliğine sahip olan kemik iliğinden izole edilen heterojen bir hücre grubudur. Bu hücreler en az iki ana kategoriye ayrılmıştır; hematopoetik ve MKH'ler. HKH'ler geleneksel olarak kanın biçimlenmiş unsurlarını oluşturan hücreler olarak görülürler ve insan kemik iliği naklinde yoğun biçimde kullanılmaktadırlar. Dolayısıyla, HKH'ler üzerinde yoğun biçimde çalışılmıştır ve yüzey antijenlerine, büyüme özelliklerine ve repopülasyon potansiyellerine göre tanımlanmışlardır. Daha az iyi tanımlananlar ise MKH'lerdir (Morton, 1970).

Hayvan modellerinde, nakledilen kemik iliği hücreleri iskelet ve kardiyak kasta, vasküler endotelyum, karaciğer, akciğer, bağırsak ve cilt epitelinde, pankreatik beta hücre adacıklarında, renal glomerüller ve nöral dokuda tespit edilmiştir. Kemik iliğinden elde edilen MKH'ler, intraserebral olarak asit sfingomyelinaz eksikliği olan farelere enjekte edildiğinde nörolojik anormalliklerin başlangıcı gecikir ve hayvanların yaşam süresi uzar. Bu hücrelerin yerel transplantasyonunun birçok vücut dokusunun – kemik, karaciğer, kardiyak kas, kalın bağırsak, cilt – popülasyonuna katkıda bulunması da farklı cinsiyetten verilen hücreleri alan hastalarda da gösterilmiştir (Smith vd., 1960).

Kemik iliği yıllar boyunca HKH'lerin “ana organı” olarak görülmüştür. Ancak son çalışmalara göre kemik iliği de HKH gibi heterojen bir HKH -dışı popülasyonu içermektedir. Kemik iliğindeki bu çeşitli kök hücre popülasyonlarının varlığının ontogenez sırasında kök hücrelerin “gelişimsel migrasyonunun” bir sonucu olduğu ve bu hücreleri kemik iliği dokusuna çeken seçici ortamın varlığı yönünde bir hipotez vardır. HKH ve HKH olmayan kemik iliği stroma hücreleri ve osteoblastlarda (örn., stromal kökenli faktör-1 [SDF-1], ve hepatosit büyüme faktörü [HGF]) mevcut olan faktörler tarafından aktif biçimde kimyasal olarak çekilir ve gebeliğin ikinci üç ayının sonu ve üçüncü üç ayının başlangıcında kemik iliğini kolonize ederler.

2.5.1.5 Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücreler

Adipoz doku tıpkı kemik iliği gibi mezenkimden köken alır ve zengin bir kök hücre kaynağıdır. Bu hücre grubuna, işlenmiş lipoaspire hücreler [processed lipoaspirate (PLA)] adı verilir. Adipoz doku kaynaklı kök hücreler yağ dokusundan genellikle yağ emme yöntemiyle lokal anestezi altında alınıp *in vitro* kültürü yapılarak elde edilen pluripotent kök hücrelerdir (Şekil 2. 12).



Şekil 2. 12 İnsan yağ dokusunun aspirasyonu

Kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücreler kadar, farklılaşma yeteneğine sahip olan yağ dokusu kök hücrelerinin elde edilmesi de kemik iliğine göre daha azacı vericidir. Lokal anestezi altında, büyük miktarlarda elde edilebilen yağ dokusundaki otolog erişkin yağ kök hücrelerinin buldukları doku ve organlarda küçük hasarların giderilmesinde rol oynadığı ve *in vitro* ortamda bu fibroblast benzeri hücre topluluğunun adipojenik, kondrojenik, myojenik, ve osteojenik farklılaşma yetenekleri gösterilmiştir (Zuk vd., 2001). Doku hasarlarında erişkin otolog kaynak olma potansiyeli sebebiyle rejeneratif tıpta farklı biyomateryaller ile birlikte de kullanılabilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Öztel vd., 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin ciddi kemik hasarlarının onarımında da kullanılabileceği öne sürülebilmektedir. Mezenkimal kök hücrelere alternatif olarak, dokumühendisliğinde farklı biyo-materyaller üzerinde farklılaştırılarak çeşitli rejeneratif tedavilerde kullanımları üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır. (İnan, S. ve Özbilgin, K., 2007)

2.5.1.6 Kalp Kası Kök Hücreleri:

Hasarlı myokardiyumun rejenerasyonunda rol oynayan kardiyak progenitor hücreler bulunduğu gösterilmiştir (Gherghiceanu ve PopEKHu, 2010; Ventura 2010). Ayrıca mezenkimal ve hematopoetik kök hücrelerin ve kahverengi yağ dokusundaki CD133+, c-Kit- ve Sca-1-, hücrelerin kardiyomyositlere farklılaştığı bildirilmiştir. (Zaruba vd., 2000).

2.5.1.7 Epidermal Kök Hücreler:

Erişkin derisindeki her bir kıl follikülü, kök hücreler içermektedir. Bu hücreler her kıl siklusunda, follikül rejenerasyonunda ve yara iyileşmesi sırasında reepitelizasyonda rol oynarlar. Kendini yenileyen ve multipotent olan kök hücrelerin bir kısmı, bazal lamina ile temasını devam ettirirken, diğerleri suprabazal yerleşimlidir. Bu hücreler, kolay elde edilebilmeleri açısından önemli bir kök hücre kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Folliküler epitel bir endodermal sinyal olan Sonic hedgehog eksprese eden epidermal plakod hücrelerinden köken almaktadır (Li vd., 2010; Reisi vd., 2009).

2.5.1.8 Sindirim Sistemi Epitel Kök Hücreleri:

Organizmanın yaşamı boyunca kök hücrelerden köken alan farklılaşmamış epitel hücreleri sindirim sisteminde hızlı hücre yenilenmesini sağlarlar. Epitel hücre yenilenmesi; epitel ve bağ dokusu arasındaki hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks etkileşiminin kontrolü altındadır. Özellikle kök hücre etrafındaki mikroçevre "niche" bu kontrolde çok önemlidir ve sindirim sisteminde görülen birçok hastalık ve kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Sindirim sistemi epitelinin yenilenmesinde rol oynayan önemli faktörler: Wnt/T-hücre faktörü-katenin (TCF/beta-catenin), Notch, Sonic hedgehog (Shh)/kemik morfogenezik protein (bone morphogenetic protein-BMP) sinyal yollarıdır.

2.5.1.9 Amniyon Sıvısı Kök Hücreleri

Fetal kök hücrelerden olan amniyon sıvısı kök hücreleri pluripotent farklılaşma özelliği gösteren kök hücrelerdir. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerin nöron, kemik, kıkırdak, adiposit ve düz kas hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahip oldukları ve OCT-4 genini ifade ettikleri gösterilmiştir (Dobrev vd., 2010; Mauro vd., 2010; Da Sacco vd., 2010; Feng vd., 2009; Siegel vd., 2009; Galende vd., 2009; Gargett, 2007).

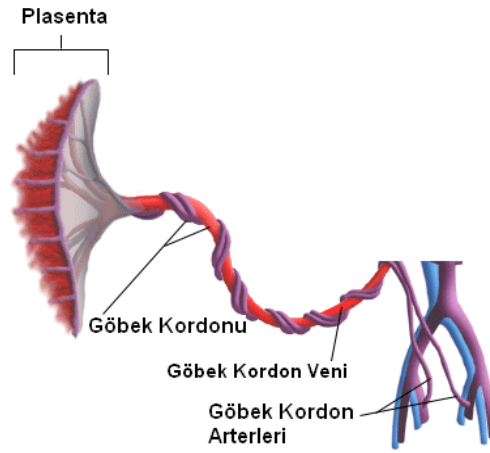
2.5.1.10 Kanser Kök Hücreleri:

Kanser progenitor hücreleri kök hücre-benzeri özellikleri olan hücrelerdir ve kanser başlangıcında, ilerlemesinde, lokal invaziv kanserlerin yaygınlaşması ve tedavisi olmayan döneme girmesinde önemli rol oynarlar. Karsinogenezde, göç eden kanser progenitor hücreleri, tümör gelişimindeki kaskadda rol oynayan hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve integrinlerden etkilenmektedir. Kanser progresyonunda, lokal kanser progresyonu ve mikrometastatik olaylar; onkojenik sinyal yolaklarını aktive eder ve tümör oluşumu kemik iliği gibi farklı alanlarda gelişir. Tedavi olarak, kanser progenitor hücrelerin seçici moleküler olarak hedef alınması çoğu lokal ve metastetik kanserin teşhis ve tedavisinde önemli olabilir (İnan ve zbilgin, 2007).

3. GÖBEK KORDONU

İnsan göbek kordonu yaklaşık 40g ağırlığında, uzunluğu yaklaşık 60–65 cm ulaşabilen, çapı 1,5 cm olan, göbek kordon epiteli olarak adlandırılan tekli/çoklu skuamöz (pullu)-kübik tabakalar ile sarılı, amniyotik epitelyumdan kaynaklandığı düşünülen bir dokudur. Bu epitelyal hücreler keratinositlerde görülen ultrayapısal ve fonksiyonel özellikler gösterir ve son zamanlarda kök hücre karakteristiğine sahip oldukları da görülmektedir. İç dokunun mimarisi iki arter ve bir venden oluşan ve başlıca hyaluronik asit gibi proteoglikanlarca zengin bir amorf madde ile içine gömülmüş mast ve özelleşmiş fibroblast benzeri hücreleri içeren mukozkonnektif bir matriks ile etrafı sarılmıştır. Göbek kordonunda kılcak damar ve lenfatikler bulunmaz. Damarlar, normalde olduğu gibi sol spirale dönüşlüdür (saat yönünde). Klinik uygulamalarda “kordon kıvrılma indeksi” ile (tüm kıvrımların sayısı toplam kordon boyunun uzunluğuna bölünür ve ortalama santimetrede 0,24 kıvrımdır) fetüsün risk altında bulunup bulunmadığı belirlenebilir (Can ve Karahüseyinoğlu, 2007).

İnsan göbek kordonu, embriyolojik gastrulasyonun 26. gününde fetüs ile plasenta arasında oluşur ve arter, ven ve allantoisi kapsayan göbek sapı ile omfalomezenterik sap ve orijinal yolk kesesi bağlantısının kalıntısını kapsayan yolk kesesinden şekillenir. Göbek kordonu, göbek kordon kanının ana rezervuarı olarak, normalde iki umbilikal atardamar ve toplardamardan oluşur (ancak, tekiz gebeliklerin %1’inde, ikizlerin %5’inde ve düşüklerin %2,5’inde tek umbilikal arter mevcuttur). Bu damarlar Wharton jel’i olarak bilinen ve proteoglikanlarca zengin bir matrisle gömülü olarak bulunurlar (Şekil 3. 1). Temel olarak iki arter, bir ven ve bu yapıları çevreleyen Wharton jelinden oluşan göbek kordonu, intrauterin dönemde oksijene kanı umbilikal ven aracılığı ile fetal portal dolaşıma ve duktus venosus’a (dolayısıyla kalbe), deoksijenize kanı ise fetal dolaşımdan maternal dolaşıma aktarılmasında görev alır (Chantler ve Baum, 1969; Sepulveda vd., 2001).



Şekil 3. 1 İnsan göbek kordon kanı

3.1 Wharton Jeli:

Thomas Wharton tarafından ilk kez 1656'da tanımlanan bu jel, poliüretan yastığı gibi, plasenta ve fetüs ile bağlantılı olan ve önemli bir iletim cankurtaranı olan kordonu korumaya yardım eden fiziksel özelliklere sahiptir. Son yıllarda kordon veninin yanında kök hücrelerin elde edilmesi için WJ'nin (Wharton jelly) de kullanılabilceği gösterilmiştir. Göbek kordonundan kök hücre elde edilmesinde sıklıkla kordon veni ya da Wharton jelin kullanılır, hücreler bu iki kaynaktan izole edilir ve kültürü yapılır. Romanov 2003'te, Mezenkimal kök hücre (MKH) benzeri hücrelerin insan göbek kordon veninin alt endothelial katmanında bulunduğunu ve başarıyla izole edilebilir, kültürü yapılabilir ve rutin teknik yöntemlerle çoğaltılabilir olduğunu bildirmiştir. Morfolojik çalışmaların ve insan göbek kordonundan elde edilerek kültürü yapılmış MKH benzeri hücrelerin immünotiplendirmesi ile bu hücrelerin kemik iliği hücrelerinden ve diğer kaynaklardan elde edilerek kültürü yapılmış mezenkimal hücreler ile benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir (Rachakatla ve Troyer, 2009; Troyer ve Weiss, 2008). Ayrıca, atılmış ya da özel olarak izole edilmemiş insan göbek kordonu perivasküler hücrelerinin, fonksiyonel mezenkimal fenotip özellik gösterme yeteneğine sahip bir alt grup (subpopulation) hücreleri de içerebildiği gösterilmiştir. McElreavey de Wharton jeli'ni bir diğer alternatif mezenkimal kök hücre kaynağı olarak bildirmiştir. Daha sonra Naughton ve Purchio göbek kordonu-WJ'nden öncü kıkırdak hücrelerini izole etmesinin ardından Mitchell benzer bir yaklaşım kullanarak WJ'den nöral hücrelere diferansiyel olabilen fibroblast benzeri hücreleri izole etti (McElreavey vd., 1991).

3.2 Göbek Kordon Kanı:

Önceleri bir ameliyat atığı olarak görülen göbek kordon kanı (GKK), hem laboratuarda hem de klinik ortamda, kemik iliği transplantasyonu ile ilgili sorunların birçoğunu ortadan kaldırmıştır. GKK hücre transplantasyonu, Fanconi anemisi hastası 5 yaşındaki bir çocuğu tedavi etmek için ilk kez 1988’de başarı ile kullanılmıştır. Daha sonra, çoğunluğu akrabalık ilişkisi olmayan donörlerden olmak üzere, 6.000’den fazla GKK transplantasyonu yapılmıştır. kemik iliği gibi, GKK kullanımı da şu ana kadar hematopoetik hastalıklar, kemik iliği hastalıkları ve bağışıklık sistemi yetersizliği hastalıklarında sınırlıdır (Çizelge 3. 1) ancak mevcut araştırmalar bunun çok daha güçlü bir klinik silah olabileceğini göstermektedir (Shlebak vd., 1999).

Çizelge 3. 1 Göbek kordon kanının günümüze dek malign ve malign olmayan hastalıklardaki klinik kullanımları (Vemuri, 2007).

Bebeklik çağı Krabbe hastalığı
Epstein-Barr virüsü
Lizozomal ve Peroksizomal depo hastalıkları
Diamond-Blackfan anemisi
Çeşitli akut ve kronik lösemiler (Akut lenfositik lösemi, Akut myelositik lösemi, kronik myelojen lösemi, Jüvenil kronik myelojen lösemi)
Nöroblastoma
Hodgkin dışı lenfoma
Hodgkin lenfoma
Orak hücre anemisi
Cooley anemisi
Hurler sendromu
Lökosit adezyon hasarı
Evans sendromu
Osteopetrosis (Mermer kemik hastalığı)
Spinal kord hasarı
Gunther hastalığı
İdiyopatik Aplastik Anemi
Kostmann sendromu
Osteoporosis
Leich–Nyhan sendromu
Thalassaemia
Neuroblastoma
Blackfan–Diamond sendromu

GKK'nin erişkin kaynaklarla karşılaştırıldığında bağıl hücresel hamlığı, eşsiz bir esneklik potansiyeli göstermektedir. Bunun kemik iliği transplantasyonuna alternatif olarak kullanımı, etki mekanizması ve geniş terapötik kabiliyetleri daha iyi bir şekilde tanımlandıkça artmaya devam etmektedir. Çizelge 3. 2'de GKK'nin, kemik iliği ve erişkin periferik kan gibi erişkin kök/progenitör hücre kaynaklarına karşı kullanımı için bilinen avantajları verilmiştir.

Çizelge 3. 2 Göbek Kordon Kanının Avantajları

Temin edilmesi kolay
Donöre zarar verme riski taşımayan,
Kemik iliği ile karşılaştırıldığında viral kontaminasyon oranı düşük,
Kriyojenik derecelerde hücre canlılığında önemli bir etki olmayacak şekilde muhafaza edilebilen,
Acil durumlarda elde edilmesi ve taşınması kolay,
GKK hücreleri allojenik antijenlere cevap veren sitotoksik T lenfositlerini üretmediklerinden yüksek immune tolerans gösteren ve ayrıca proinflamatuvar sitokin interferon- γ (IFN γ) ve tumor nekroz factor- α (TNF α)' yı da üretemeyen
GKK kemik iliği ile karşılaştırıldığında hematopoetik and nonhematopoetik kök/progenitör hücrelerin her ikisinin de yüksek miktarda (mononükleer hücrelerin ~%1'i) bulunabildiği bir kaynaktır.
Erişkin kaynaklara göre yüksek miktarda koloni biçiminde ünite-granülosit makrofaj (CFU-GM) içerir.
Temini ve kullanımı için embriyonik ve fetal dokulardaki gibi etik tartışmalara neden olmaz.

3.2.1 İnsan Göbek Kordon Kanı Hücreleri

GKK'nin hücresel bileşimi çoğunlukla lenfositler ve monositlerden oluşmaktadır. Bu, GKK'nın erişkin periferik kan ile karşılaştırıldığında benzer bir B-lenfosit popülasyonuna, daha düşük mutlak T-lenfosit sayısına (CD3⁺) ancak daha yüksek CD4⁺/CD8⁺ oranına sahip olduğunu gösterir. GKK ayrıca, daha fazla doğal katil (Natural Killer NK) hücreye ve daha düşük sayıda CD56⁺ sitotoksik T-lenfositine sahiptir. GKK'nin erişkin hücre kaynaklarına göre farklılaşmamışlığı, daha yüksek sayıda erişkin olmayan T-lenfosit oranı (CB45RA⁺)

azalan erişkin hafıza T-lenfosit ($CD45RO^+$) sayısı ile karakterize edilmektedir. GKK hücreleri ayrıca, erişkin hücre kaynaklarından daha az mutlak sitokin düzeyleri üretmektedir. Ek olarak, GKK'da ifade edilen mRNA ile ilgili olarak antienflamatuar sitokinler interferon- γ (INF- γ), interlökin (IL)-4 ve IL-10, proenflamatuar sitokin IL-2'den daha yüksek miktarda. Bu olgun immün işlev eksikliği, GKK'nın düşük GvHD insidansının göstergesidir. Bu hücresel yapı, daha zayıf GvH gerekliliklerine ve dolayısıyla, tedavi için daha kısa bekleme sürelerine yol açacaktır. Rocha, GvHD insidansının, GKK transplantasyonu geçiren çocuklarda, kaynak HLA-identik kardeş olduğu takdirde, kemik iliği alan çocuklardan daha düşük olduğunu göstermiştir. Rocha ayrıca, ilişkisiz HLA eşleşmesi olmayan GKK alıcılarında, HLA-identik kemik iliği alıcılarına göre daha düşük bir GvHD insidansı olduğunu göstermiştir (Tisato vd., 1992; Gorin vd., 2002).

GKK'nın transplantasyonlar için uygun kök hücre kaynağı olarak seçilmesi, erişkin kaynaklar ile karşılaştırıldığında bunun daha büyük bir hematopoetik kök/progenitör hücre popülasyonu içerdiğinin bulunması ile başlamıştır. Bu kolaylıkla elde edilebilen, düşük immünojenik multi-potansiyel hücre kaynaklarının, özel koşullar altında vücuttaki herhangi bir hücre türüne dönüşebilme kabiliyetine sahip oldukları düşünülmektedir. GKK'nın yaklaşık % 1 $CD34^+$ hücresi içermesi, bunun erken hematopoezdeki rolü için bir marker görevi görmesine karşın, bu hücreler, Kİ'de bulunanlardan daha ham görünmektedir. Genel olarak, bir hücrenin olgunluk düzeyi, hücrenin hücre yüzey antijenlerinin varlığı ya da yokluğu ile tanımlanır. Örneğin, GKK'deki $CD34^+$ popülasyonu, daha yüksek bir oranda pre-lenfoid hücreler için bir marker olan $CD38$ için negatif olmaları nedeniyle Kİ'de bulunanlardan daha öncül olarak tanımlanabilir. GKK'de göreceli olarak daha yüksek sayıda bulunan $CD34^+$ hücrelerin diğer bir alt kümesi, daha ilkel olan $CD133^+$ hücrelerdir. $CD133^+$ hücreleri, fetüs beyinde tanımlanmıştır ve bu alanda, nöral kök hücreler (NKH) olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte GKK'de bulunan $CD133^+$ hücrelerinin fenotipik olarak ve işlevsel olarak fetüs beyinde bulunan NKH'ler ile aynı olup olmadığı bilinmemektedir (Çizelge 3. 3).

Çizelge 3. 3 İnsan göbek kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin yüzey belirteçleri

Göbek Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yüzey Markır Profili	
GKK MKH markırları	Pozitif/ Negatif
CD10	Negatif
CD13	Positiv
CD14	Negatif
CD24	Negatif
CD29	Positiv
CD31	Negatif
CD34	Negatif
CD36	Negatif
CD38	Negatif
CD44	Positiv
CD45	Negatif
CD49d	Negatif
CD73	Positiv
CD90	Positiv
CD105	Positiv
CD106	Positiv
CD117	Negatif
CD133	Negatif
CD144	Negatif
CD166	Positiv
SSEA-4	Negatif
HLA-ABC	Positiv
HLA-DR	Negatif
β III tubulin	Positiv
MAP-2	Positiv

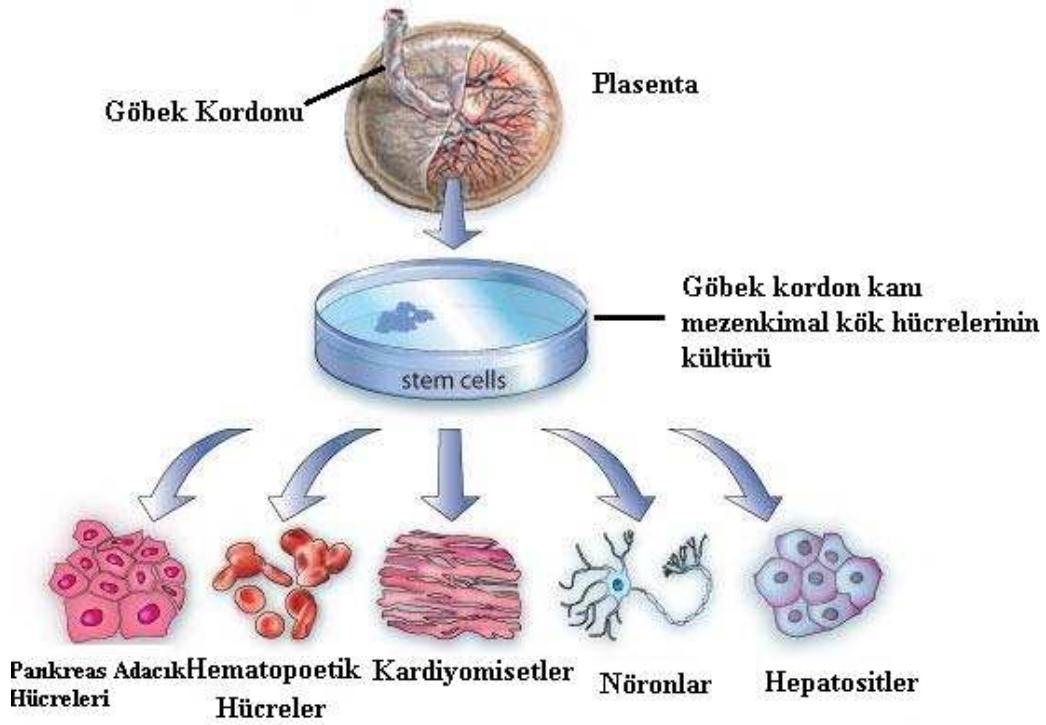
3.2.2 Göbek Kordon Kanı Kök Hücreleri:

Ekstra embriyonik dokulardan olan, plasenta ve göbek kordonu, embriyonun vücuduyla birleşik olmamasına rağmen embriyonun gelişimi için zorunlu olan ve tek bir totipotent zigot hücresinden veya fertilize yumurta hücresinden gelişen hücreleri içerirler. Bebeğin doğumunun ilk yarım saati içerisinde alınan plasenta ve göbek kordon kanı erişkin kök hücreler için önemli bir kaynaktır. Kordon kanı kök hücrelerinin avantajları: genç hücreler olmaları; yaşayabilme yeteneklerinin yüksek olması; fazla sayıda elde edilebilir olmaları ve alıcıya kolay uyum sağlamalarıdır. Kordon kanı elde edildikten sonra eritrositler uzaklaştırılarak, dondurularak, sıvı nitrojen içerisinde kordon kanı bankacılığı arşivinde saklanır. Göbek kordon kanı, kök hücre kaynağı olarak 1988 yılından beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Ayrıca, kemik iliği ve kordon kanından elde edilen kök hücre nakilleri, radyoterapi ve kemoterapi sonrasında hasar gören kan hücrelerinin yerine konulmasını sağlamak amacıyla kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Zuk vd., 2001).

Uzun yıllar bir hematopoetik kök hücre kaynağı olarak bilinen GKK'da hematopoetik olmayan mezenkimal kök hücreler (MHK) de bulunmuştur, ancak kemik iliğine göre çok daha düşük sayılardadır. GKK'dan elde edilen MHK, osteoblastlar, kondroblastlar, adipositler, hematopoetik ve nöral hücreler (astrozitler ve nöronlar) gibi çeşitli fenotipler ortaya çıkarabilmektedir. Bu hücre popülasyonunun tanımlanması, halen belirleyici bir fenotipin olmaması ve hangi yüzey antijenlerinin bu hücreyi tanımladığı konusunda bir uzlaşma olmaması nedeniyle zordur. Yang ve arkadaşları, kordon kanındaki MKH'leri, CD13, CD29, CD44, ve CD90 için pozitif markerler ve CD14, CD31, CD34, CD45, CD51/61, CD64, CD106, ve HLA-DR negatif markerler olarak tanımlamışlardır ve Robinson ve arkadaşları ise, kordon kanı MKH'leri CD73, CD90, CD105, ve CD166 için pozitif ve CD31, CD34, CD45, CD80, ve HLA-DR için negatif olarak tanımlamışlardır. Bunların GKK içindeki gerçek miktarları belirlenmeden önce bu hücrelerin fenotipleri konusunda evrensel bir anlaşmaya varılmalıdır. Buna bakılmaksızın, kemik iliğine göre GKK'de daha az MKH bulunduğu konusunda genel bir uzlaşma vardır.

GKK klinik uygulamaları, hematolojik rejenerasyona odaklanmıştır. Ancak araştırmalar, heterojen MNC popülasyonunun, osteoblastlar, kondroblastlar ve hatta nöronlar ve astrozitlere farklılaşabileceğini göstermektedir (Şekil 3. 2). GKK'nın, içerdiği yüksek kök/progenitör hücre oranı nedeniyle, çeşitli hastalıkların tedavisi için tartışmalı embriyonik ve fetal kök hücrelerin kullanımına bağımlılığın yerini alabileceği düşünülüyor. Doğru koşullar altında yönlendirildiğinde, GKK hücrelerinin multipotent niteliğini gösteren çalışmalar yayınlanmıştır.



Şekil 3. 2 Kordon kanı mezenkimal kök hücreleri uygun koşullarda *in vitro*, hepatositlere, kondrositlere, hatta nöronlar ve astrositlere farklılaşabilir

3.2.3 İnsan Göbek Kordon Kanının Klinik Uygulamaları

İnsan göbek kordonu kanı kök hücreleri (İGKK-KH), erişkin kemik iliği kök hücrelerinin (Kİ-KH) tersine, daha az olgundur ve dolayısıyla daha az immünojeniktir ve uzun ömrü ve daha uzun telomerler ile ilişkilendirilen daha yüksek bir yayılma potansiyeli vardır. Kordon kan hücreleri 15 yıldan uzun süredir klinik uygulamaların bir parçasıdır ve klinik transplantasyon konusunda belirli avantajlar sunarlar. Kordon kanının, hematopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler ve endotel prekürsör hücreleri içerdiği gösterilmiştir. (Domanskajanik vd., 2008).

Çizelge 3. 4 Hayvan Modellerinde Hastalık ve Yaralanmaları Tedavisinde başarı ile uygulanan Göbek Kordon Kanının Klinik uygulamaları (Newcomb vd., 2007).

Lou Gehrig hastalığı
Sanfilippo B tipi sendromu B
Omurilik hasarı
Travmatik beyin hasarı
Felç
Miyokardial enfarktüs

1940 yılında, yeni doğanların göbek kordonunda kemik iliğindeki kök hücrelere benzer hücrelerin olduğu fark edilmiş, bunların tedavi amaçlı olarak kullanılabilmesi düşünülmüş ve 1948 yılından itibaren tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Kordon kanı kaynaklı kök hücrelerin (hematopoetik kök hücrelerin) kan sisteminin yeniden yapılandırılmasına yönelik tedavilerde kullanılmasındaki temel çıkış noktası esas olarak üç nedene dayanmaktadır; Bu kaynaktan elde edilen kök hücreler çok gençtirler (immatür hücreler), diğer erişkin kaynaklı kök hücrelerle karşılaştırıldığında daha yüksek telomeraz enzim aktivasyonuna sahiptirler (dolayısıyla daha fazla çoğalma potansiyeline sahiptirler), yaşamışlığın yıpranmışlığı olarak da adlandırabileceğimiz yaşlanma, radyasyon, güneş ışınları, toksinler, kimyasallar ve enfeksiyonlar sonucu oluşabilen DNA replikasyonundaki hatalar dolayısıyla ortaya çıkabilecek mutasyonları içermesi olasılığı daha azdır. Kordon kanı kök hücrelerinin (KKKH) kan sistemini yerine koymayı amaçlayan tedavi protokollerinde kemik iliği ve periferik kan kök hücrelerine alternatif bir kaynak olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar artmaktadır. Son yıllarda hücre esaslı tedavilerde (rejeneratif ve reparatif tıp amaçlı) kullanılmasına yönelik girişimler de belirgin şekilde artmıştır. Bazı araştırmacılar, deneysel inme/felç (stroke) modelinde (Wistar sıçanlarda orta serebral arter oklüzyonu ile) ve deneysel musküler distrofi modelinde disferlin-noksan farelere insan KKKH'lerini uygulayarak olası tedavi edici etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta, her iki çalışmada da önemli fonksiyonel iyileşmenin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar, KKKH'lerinin *in vivo* plastisitesini ve

rejeneratif/repairatif tıptaki olası kullanım alanları gösteren önemli bir kanıt olarak sunulmuştur. Ayrıca, insan kordon kanı kök hücrelerinin NOD-SCID farelere infüzyonu sonrası, hücre füzyonu olmaksızın hepatositlere transdiferansiye oldukları tespit edilmiştir. Son olarak, Güney Kore'de 20 yıldır felçli olan bir kadının, kordon kanı kök hücreleri kullanarak yeniden yürümesinin sağlandığı bildirilmiştir (Kang vd., 2004). Omurilik sakatlanmalarının iyileştirilmesi yolunda ileriye yönelik bir adım olduğunu belirten Güney Koreli bilim adamları, bu yöntemin embriyonlardan kök hücre elde edilmesine etik ve güvenli bir alternatif olabileceğini vurgulamışlardır.

4. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürü canlı dokulardan izole edilen hücrelerin *in vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamak amacıyla kullanılan bir yöntemdir. İzole edilen hücreler, çeşitli tuzlar, tampon maddeler, aminoasitler, vitaminler, sığır veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspansiyon edilerek steril tüp veya şişelerde üretilirler.

4.1 Hücrelerin İzolasyonunda ve Kültüründe Kullanılan Maddeler

4.1.1 Besiyerleri

4.1.1.1 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)

Hücrelerin üremesi ve devamlılığının sağlanması için kullanılan temel bir besiyeridir. BSS (Balanced salt solution-Dengeli tuz solüsyonu) veya HBSS (Hank's BSS) içerisinde 12 temel aminoasit, 7 temel vitamin, glikoz, tuz, bikarbonat tampon sistemi ve fenol red bulunur. Besiyerlerinin ticari olarak 1x ve 10x solüsyonu temin edilebilir ve uzun süre saklanabilir. Bu besiyerinde L-Glutamin bulunmaz, kullanılmadan önce serum, sodyum bikarbonat ve L-Glutamin eklenmesi gerekir. Hücre kültürleri için L-Glutamin temel bir aminoasittir. L-Glutamin besiyerine son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde eklenir. Sıvı haldeki besiyerlerinde L-Glutamin bulunmazken toz haldeki besiyerlerinde genellikle bulunur. Ayrıca hücre kültürlerine bağlı olarak besiyerlerinde L-Glutamin konsantrasyonu artırılabilir. Ticari olarak satılan besiyerlerinde hücrelerin üremeleri için gerekli olan aminoasit ve vitaminler bulunmaktadır. Bazı özel çalışmalar için gerekli olduğu durumlarda ticari olarak temin edilen aminoasit karışımları besiyerlerine eklenebilir (Finegold ve Baron, 1986; Isenberg, 1992).

4.1.1.2 Dulbecco' nun Modifiye Ettiği Eagle Medyumu (DMEM)

Eagle besiyerinin literatürdeki ilk orijinal formülasyonundan beri birçok modifikasyona uğratılarak günümüze kadar geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılan modifikasyonu ise DMEM besiyeridir. DMEM Besiyeri; Eagle'ın (Basal Medium Eagle (BME)) aminoasit ve vitaminlerinin ve bunların yanında diğer destekleyici bileşiklerin de fazla bulunduğu modifikasyonudur. Orijinal DMEM formülasyonu ilk olarak fare embriyonik hücrelerin kültüründe gösterilmiştir ve 1000mg/L glukoz içerir. 4500ml/L glukoz eklenmiş olan daha gelişmiş bir modifikasyonunun da belirli hücre tipleri için daha optimum koşulları

oluşturduğu belirlenmiştir (Dulbecco ve Freeman, 1959; Smith vd., 1960; Morton, 1970; Rutzky ve Pumper 1974).

4.1.1.3 Iscove' un modifiye ettiği Dulbecco Medyumu (Iscove's Modified Dulbecco's Media) (IMDM)

Guilber ve Iscove, albumin transferrin, lesitin ve selenyum ile desteklenen serumsuz besiyerinde eritrosit ve makrofaj prekürsör hücrelerinin kültürünün yapıldığını gösterdiler. Bu medyum DMEM' in selenyum, ek aminoasitler ve vitaminler, sodyum piruvat, HEPES içerir ve ayrıca ferik nitrat yerine potasyum nitrat içeren modifikasyonudur. Önceki çalışmalar, Iscove besiyerinin fare B lenfositlerini, kemik iliği kaynaklı hematopoetik dokuları, lipopolisakkarit ile uyarılan B hücrelerini, T lenfositlerini ve hibrit hücrelerin birçok çeşidini desteklediğini göstermiştir (Iscove ve Melchers, 1978; Iscove vd. 1980).

4.1.2 Serum

Serum; albumin, globulin, üreme uyarıcıları ve üreme inhibitörlerini bulandıran son derece zengin bir kaynaktır. Hücrelerin gelişmesi için önemli olan komponentler serumda α -globulin fraksiyonunda yer alır. Serumda, hücrelerin üremesini stimüle eden insülin, glukokortikoidler (hidrokortizon, deksametazon) ve tiroid hormonları gibi hormonal faktörler ile hücrelerin yüzeye tutulmasını ve yayılmasını sağlayan fibronektin, fetuin gibi proteinler, kortizol, hormonlar, Fe^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} gibi mineraller, prostoglandinler, kolesterol ve linoleik asit gibi lipitleri taşıyan albumin ve transferrin benzeri proteinler bulunur. Ayrıca serumda DNA sentezini ve hücre bölünmesini stimüle eden fibroblast üreme faktörü ve epidermal üreme faktörü gibi faktörler bulunur. Serumun, hücrelerin kültür ortamında gelişmesine yardımcı olmasının yanında, tripsin gibi hücrelerin ayrıştırılması için kullanılan proteazların da aktivitesini inhibe etmesi, bakteri toksinleri gibi bazı inhibitör bileşiklerin detoksifikasyonu ve hücre membranından substratların transportunun sağlanması gibi görevleri vardır (Doyle vd., 1995; Murray vd., 1995).

Hanks gibi dengeli tuz solüsyonları içerisine sadece serum, laktalbumin hidrolizat ya da diğer bileşenler eklendiğinde hücre üremesinin sağlandığı görülmüştür. Serumda esansiyel aminoasitler, nükleik asit prekürsörleri, hormonlar ve yağ asitleri bulunur. Hücre üremesi için genellikle %5–15 konsantrasyonlarda, tek tabakalı hücre kültürlerinin devamı için ise %0-2 konsantrasyonlarda fetal ya da yeni doğan buzağı serumu kullanılır. İnsan, sığır ve at serumu en fazla kullanılan serumlar arasında olmasına rağmen en çok tercih edilen FBS' dur. Zor

üreyen hücreler için Fetal Sığır Serumunu (FBS) kullanılması tavsiye edilir. FBS yüksek oranlarda biyotin ihtiva eder. EMEM gibi bazı besiyerlerinde biyotin olmadığından dolayı FBS kullanımını uygun olur (Baker ve Breach, 1980).

Doku kültürlerine eklenen serumlar mikoplazma kontaminasyonu açısından en önemli kaynaktır. Bu nedenle serumların kullanılmadan önce sitotoksik etkileri yönünden kontrolünün yapılması gerekmektedir. Satın alınacak hazır serumlar hücreleri üretmesi yönünden test edilmelidir. Serumlar -70 °C'de saklanmalıdır (Freshney, 1987; Shalaby, 1991; Isenberg, 1992).

Fetal serumlar, erişkin serumlarda hücrelerin çoğalmalarını önleyen birçok enfeksiyöz ajan bulunabilme olasılığından dolayı tercih edilmez. Ayrıca serum kaynağı olarak hayvan kullanılacaksa, hayvan genç ve sağlıklı olmalıdır. Ticari olarak temin edilebilen ve hormonlar ve matriks proteinleri gibi serum yerine geçebilen bazı maddelerin kullanılmasıyla besiyerlerine eklenmesi gerekli olan FBS'un miktarı azaltılabilir. Sonuçta bu maddelerin kullanılması FBS'un kullanılmasından daha ekonomiktir. *In vitro* şartlarda organ ve hücre fonksiyonlarını düzenleyen endokrin faktörleri saptamak ve antikor purifikasyonu için ucuz ve pratik olan serumsuz kültürleri kullanmak oldukça avantaj sağlar. Ticari olarak satılan serumlu besiyerlerinin kullanımının bazı dezavantajları vardır. Serumun yapısında zamanla bozulmalar olabilir ve en fazla bir yıl saklanabilen serumlar kültürdeki hücreler üzerinde toksik etki gösterebilir. Eğer birden fazla hücre tipi kullanılacaksa bunların her biri için farklı serum gerekebilir. Bu ise, çok sayıda serumun aynı anda saklanması anlamına gelir. Sonuçta aynı anda birden fazla serum tipinin kullanılması bazı problemler yaratabilir. Serumlu besiyerlerinin kullanımının bir dezavantajı ise serumda hücrelerin üremesi üzerine inhibitör etkileri tam olarak bilinmeyen birçok maddenin bulunmasıdır (Freshney, 1987; Isenberg, 1992).

4.1.2.1 Fetal sığır serumu (FBS)

Fetal sığır ya da dana serumu (sırasıyla FBS ve FCS), içeriğindeki yüksek düzeydeki büyümeyi hızlandırıcı ve düşük düzeydeki büyümeyi yavaşlatıcı faktörler nedeniyle, hücre kültüründe en sık kullanılan bileşenlerden biridir. Kompleks ve doğal bir katkı maddesi olan FBS ve FCS'nin içeriği, üretici firmaya göre değişebildiği gibi, büyümeye etki eden esas bileşenlerin ve proteinlerin konsantrasyon ve nitelikleri de değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle üreticiler için başarılı ve sürekli yükek etki gösterebilen ürünler elde etmek zor olabilmektedir. Fetal sığır ve dana serumları için kullanılan kalite kontrol yöntemleri de,

serumların karmaşıklığı nedeniyle oldukça zor ve pahalıdır. Ayrıca bu testler için büyük miktarlarda FBS ve FCS kullanmak gereklidir. Serum üreticileri 1975'ten bu yana serum üretiminde, kimyasal, hormonal ve protein açısından büyük değişiklikler yapmışlardır. Bununla birlikte, içinde bulundurduğu faktörlerin spesifik olarak kantitasyonu yapılmamış serumların kullanıldığı deneylerin sonuçlarının ortaya konulmasıyla çeşitli önlemlerin alınması gerektiğini vurgulanmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda FBS bulunan ortamda ekstraselüler matriks ve hücre büyüme indikatörü olan çeşitli yapısal proteinlerin miktarının zamanla arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu tarz çeşitlilikler, laboratuvarları, kendi FBS/FCS taramalarını yapmaya mecbur bırakmakla birlikte, “referans gösterilmiş” malzemelerin kullanımını da zorunlu kılmaktadır. Farklı araştırmacıların elde ettikleri verileri karşılaştırmak da bu nedenle zorlaşmaktadır.

Günümüzde, kök hücre geliştirmek için kullanılan izolasyon ve çoğaltma protokollerinin çoğunda kültür ortamı, zararlı olabilecek zenojenik bileşenler içeren FBS ile desteklenmektedir. Sığır serumu proteinleri, immünojeniteyi desteklemek üzere kök hücrelere verildiğinde, bunun sonucunda viral ya da prion geçişli potansiyel problemler ortaya çıkabilir, kültür ortamındaki antijenik substrat olarak işlev yapan hücrelere bağlanan sığır proteinleri, immünolojik reaksiyonlara yol açabilirler. Örneğin, FBS desteğiyle hazırlanan kültür ortamında geliştirilmiş lenfositlerin aşılандığı hastalarda arthus benzeri reaksiyonlar gelişmiş, FBS ile geliştirilmiş iskeletsel miyoblastların kullanıldığı hücresel kardiyomyoplasti, kanserli ventriküler ritim bozukluklarına ve hastalarda ani ölümlere neden olmuş, bloke olmuş insan kalp kası içindeki FBS desteği ile geliştirilmiş MKH'lerin intrakoroner nakli dahi ventriküler ritim bozukluğunu engellemekte başarılı olamamış, adenozin deaminaz eksikliği nedeniyle klinik gen terapisi denemesi uygulanan hastalar, FBS ile desteklenmiş ortamda büyütülen otolog T hücreleri nedeniyle, FBS proteinlerine özel IgG bağışıklığı geliştirmişlerdir. Bu bilinen “yan etki”lerin dışında, serum kaynağının ve serum uygulamasının (örneğin; ısı inaktivasyonu) hücrelerin hareketliliğine olan etkisi uzun zamandır görmezden gelinmektedir. Serum kimyasal açıdan bir sorun olarak belirtildiği halde, *in vitro* kültür çalışmalarında halen vazgeçilmezdir.

Sığır serumu, hücrelere bağlanarak önemli metabolik/morfolojik değişiklikleri azaltabilen çeşitli polipeptidler içerir. Örneğin, kültür ortamında çözülmüş olarak ya da polivinil substratlarıyla kaplanmış halde bulunan FBS'nin kullanımı merkezi sinir sistemindeki nöral kök hücre potansiyeline etki ederek, hücre davranışını ve morfolojik türevlenmeyi belirgin

şekilde değiştirir. Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal progenitör hücrelerde FBS içeren kültür ortamında ısı inaktivasyonu olsun ya da olmasın değişik davranışlar gözlenmiş, FBS ile desteklenen ortamda geliştirilen otolog T hücrelerinde sığır lipoproteinlerine karşı belirgin bir antikor tepkisi görülmüş, FBS'nin düşük yoğunlukta lipoprotein içerdiği gözlemine bağlı olarak, bunların insandaki reseptörlere bağlandığı tespit edilmiş, FBS içindeki mikroveziküllerde bulunan fosfolipidlerin, insan hücreleri tarafından oluşturulan antikorlarla rekabet ederek, antikardiyolipin antikorları üreten klonların tespitini engellediği belirlenmiş, uzun vadeli büyüme ve erişkin nöral progenitör hücrelerin çoğalma oranının, N2 içeren sitokinsiz FBS kültür ortamında önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. FBS, ayrıca, yüksek konsantrasyonda, hücre büyümesi ve farklılaşması açısından biyolojik fonksiyonları oldukça geniş spektrumlu bir glikoprotein olan fetüin-A içerir, bu madde FBS destekli ortamdaki, otantik disülfür köprülü çift zincir yapılarından, matriks metalloproteinazları ve MKH ve EKH farklılaşmasının düzenlenmesinde etkili anahtar proteinazları yoluyla ayrılabilir. Tüm bu görüşler, FBS'nin, hücresele terapide kullanılacak kök hücreler için etkili bir açılım yapmaya uygun olmadığı hipotezini destekler ve hücre kültürü ortamı bileşenlerinin hayvansal ürünlerden uzak olmasını önerir niteliktedir.

Öte yandan, tamamı FBS destekli kültür ortamında geliştirilmiş insan mezenkimal kök hücrelerini (iMKH) çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanmayı deneyerek, FBS'nin önemli yan etkileri olmadığını göstermeye çalışan klinik çalışmalar da yapılmıştır. FBS, nöroprotektif fonksiyonları olan küçük molekül kütleli biyoaktif faktörler içerir (ör, serofendik asit), bunlar nöral glutamat reseptörlerce sağlanan nekrotik ve apoptik sinyallerle şiddetlenmiş olan sitotoksik sonuçların (mitokondriyal membran depolarizasyonu ve kaspaz-3 aktivasyonu gibi) azaltılmasında önemli bir rol oynar. FBS destekli kültür ortamında geliştirilen iMKH ile trombosit-lizat içerikli kültür ortamında yetiştirilen MKH arasında önemli düzeyde morfoloji, fenotip ve farklılaşma kapasitesi farkları görülmüştür. Üstelik FBS içerisindeki iMKH, alloantijen teşvikli lenfosit çoğaltmasında daha verimli olmuştur, bu da FBS destekli kültür ortamının alloreaktivite kaynaklı immünite yan etkilerin önlenmesi/araştırılması için daha uygun olduğunu gösterir. FBS kalitesi, EKH ve MKH'nin çoklu farklılaşma ve immünosupresif kapasitelerini oluşturdukları sırada çoğalmasını önemli oranda etkilerken, diğer kültür parametrelerinin (besiyeri, glukoz konsantrasyonu, stabil L-Glutamin, kök hücre ekimi, pasajlama yoğunluğu ve plastik yüzey kalitesi gibi) son ürünü etkilediği kanıtlanmıştır.

Tüm bu görüşler, tedbirli bir şekilde ilerlenmesi gerektiğini vurgular, aksi takdirde *ex vivo*

kültür fazında, kök hücrelerin biyolojisinde gizli ve beklenmeyen modifikasyonlar gözlenebilir.

4.1.2.2 HyClone Serum:

Hücre kültüründe kullanılan FBS'nin içerdiği IgG düzeyi, bazı hücre kültür uygulamaları için yüksek olabilir. Bu nedenle IgG'nin önemli ölçüde azaltılması için Protein G Kromatografisi kullanılarak hazırlanan işlenmiş, HyClone Süper Düşük IgG Fetal Bovine Serum (FBS), geliştirilmiştir. HyClone Super Düşük IgG Fetal Bovine Serum (FBS) özellikle mezenkimal kök hücrelerin kültüründe önerilen bir besiyeri bileşenidir. IgG düzeyi serumun elde edildiği hayvansal kaynağa göre farklı düzeylerde (Çizelge 4. 1).

Çizelge 4. 1 Farklı Serumların Ortalama IgG seviyeleri

Serum	IgG Seviyesi
Dana Serumu	14.09 mg/mL
Fetal Sığır Serumu	0.20 mg/mL
Doğal Düşük IgG' li Fetal Sığır Serumu	0.02 mg/mL
HyClone Fetal Sığır Serumu	<0.005 mg/mL

4.1.2.3 İnsan serumu:

Teoride, insan kanı ve türevlerinin kullanımı, FBS bileşenlerinin yan etki riskini azaltır ya da yok eder. Çeşitli görüşler, eşit miktarda insan serumu ve plazma kullanarak, koagülasyon/fibrinolitik yolların birleştirilmesi olanağını göz ardı etmemek gerektiğini belirtir. Gerçekte, rejeneratif tıp, hücre terapisine doku kaynağı olarak insan embriyonik kök hücreleri (iEKH) kullanma gerekliliği oluşturma ve yayma politikalarını “İyi Üretim Uygulamaları-Good Manufacturing Practice” kalite gerekliliklerine göre geliştirir, bununla hayvansal maddeler içeren kültür ortamlarının enfeksiyon ve immünojenlik riskini ortadan kaldırmış olur, sonuç olarak, genetik ve epigenetik açıdan normal hücre ve dokular elde edilmiş olur. İnsan serumundan elde edilmiş matriks içinde büyütülen iEKH'nin, devamlı kültürde, üç embriyonik katmanda da gözlenen gelişim ve dokusal farklılaşma potansiyelleri de dahil olmak üzere tüm embriyonik kök hücre özelliklerini taşıdığı kanıtlanmıştır. Öte yandan, iEKH hücre hatları ekstraselüler matrikse daha az bağımlı olacak şekilde adapte olmuştur, bu *in vitro* olarak hayatta kalma şansını artırır, tüm hücrelerde paralel biçimde bir

karyotip değişimi sergiler.

Ayrıca, MKH açısından, uygun FBS bileşenlerinin neler olabileceği üzerine de birçok tartışma yapılmıştır. Adiposit prekürsör hücrelerin farklılaşmasında önemli olduğu düşünölen faktörleri (büyüme hormonu ve insölin gibi) içerdieği saptanan insan plazmasından başka, otolog serumun kullanımına dikkat çeken kimi çalışmalar da yapılmıştır. Bu amaçla yayımlanan birkaç çalışmada, otolog serum ve ya plazmanın farklılaşma kapasitesini koruduğunu, daha geniş bir hücre amplifikasyonuna sebep olduğunu ve mezenkimal ve kemik iliği kök hücrelerin canlılığını teşvik ettiğini göstermiştir. Fakat, şu anda iMKH'nin yaşam süresinin, replikatif senesens ve telomerlerin kısalmasıyla alakalı olarak, *in vitro* olarak kaldığı kabul edilmektedir. Bu nedenle, otolog/otojenik plazma/serum kullanımı, özellikle kemoterapi gören hastalarda, iMKH'nin klinik kullanımını ve serum çeşitliliğini arttırmak için gerekli otolog ilavelerin miktarıyla kısıtlanmaktadır, bununla birlikte otolog stratejisi bile ayrı bir tartışma konusudur. şimdiye dek, insan plazması ve serumu arasındaki biyokimyasal farklılıklar bilindiği halde, otolog/otogenik plazma ve serumun iMKH'nin hücre özelliklerine nasıl etki edebileceğini ortaya koyan hiçbir veri elde edilmemiştir. Literatürdeki, allogenic serum ve plazma sonuçları çelişkilidir. Bazı çalışmalar heterolog serumdan iMKH izole etme ve çoğaltmakta başarılı olmuş, bazılarıysa iMKH'de çok ani senesensler ve büyümelerin durmasıyla karşılaşmışlardır. İnsan serumunun iMKH'nin *in vitro* gelişimini tam olarak desteklemediği öne sürölmüş olsa da, dondurulmuş plazma, trombosit, trombosit-lizat, trombosit açısından zengin plazma, trombositlerden elde edilmiş büyüme faktörleriyle desteklenen kültür ortamında yetiştirilmiş olan iMKH'nin, dinamik bir çoğalma ve hareket etme yeteneği, yüksek klonogenik verimlilik, immünosüpresif özellikler ve osteogenik, kondrogenik ve adipogenik olarak farklılaşma kapasitesi gösterdiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır; bu kanıtlar, serum ve plazma arasındaki farkları baz alan hipotezde bir boşluk bırakmakla birlikte, trombosit açısından zengin plazmanın, iMKH kullanarak dokusal ve hücrenel olarak işlenen ürünlerin geliştirilmesinde, güçlü ve güvenli bir FBS alternatifi olarak ortaya konulabileceğini önermektedir. Yakın zamandaki özel bir çalışma, uzun süreli kültürde, adipoz doku iMKH üzerinde, heterolog insan AB serumunun, trombinle aktive olmuş trombosit zengin plazma kadar önemli ölçüde çoğalma etkisi ve başkalaşım kapasitesi sağladığını göstermiştir. Optimal kültür şartlarının araştırmasında, minimal miktarda insan AB serumu ya da seruma alternatif olarak, bitkisel proteinler içeren insan otolog plazması karışımının iMKH'lerinin büyüme ve farklılaşmasında, FBS ya da hayvansal proteinler içeren serumla kıyaslanabilir düzeyde gelişme gösterdiği ve karışımın unit-F formasyonunda koloni

oluşumunda sinerjistik etkileri olduğu belirlenmiştir. Üstelik serum içermeyen zayıf kültür ortamında bile başlıca fenotipler belirlenebilmiştir, bununla birlikte düşük serum konsantrasyonunda hücre çoğalması sınırlandırıldığı halde, terapatik kullanım amaçlı hücrelerin çoğalması sağlanabilmiştir (Mannello ve Tonti 2007).

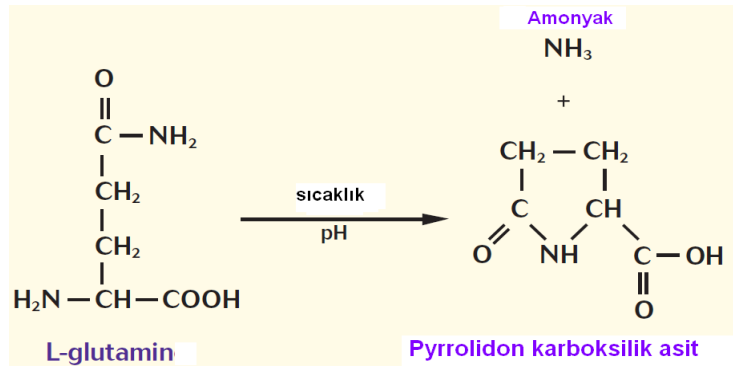
4.1.3 L-Glutamin:

4.1.3.1 L-Glutamin

L-Glutamin hücre kültüründe enerji üretimi ile protein ve nükleik asit sentezi için gerekli bir amino asittir (Tritsch ve Moore, 1962). Fakat hücre kültürü ortamında L-Glutamin ani şekilde bozulmaya uğrar. Bunun sonucunda yan ürün olarak toksik bir madde olan (Hassell vd., 1991), protein glikosilasyonuna etki edebilen (Yang ve Butler, 2002; Yang ve Butler, 2000), protein üretimini azaltarak ve glikosilasyon örneklerini değiştirerek hücre canlılığını sonlandırabilen “amonyak” oluşur. Düşük oranda amonyak konsantrasyonları, özellikle amonyak zehirlenmesine duyarlı hücrelerde yüksek verim elde etmede avantaj sağlayabilir (Christie ve Butler, 1994). Toksik olmayan düzeylerde dahi amonyak varlığına duyarlı hücrelerin gelişimi inhibe olabilir (Brand vd., 1989).

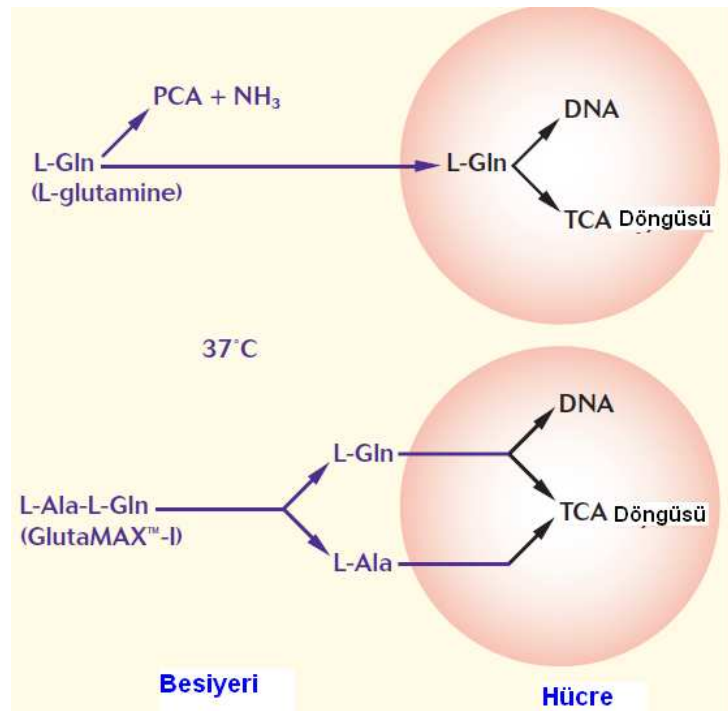
4.1.3.2 Glutamax:

Glutamax L-alanyl-L-Glutamine, hücre kültüründe L-Glutamin'e alternatif bir dipeptittir. Glutamax, memeli hücre kültüründe, minimal düzeyde ve hatta hiç şekil değişimi gözlenmeksizin, eşit mol sayısında L-Glutamin yerine direk olarak kullanılabilir. Glutamax memeli hücre kültür sistemlerinde, büyüme miktarını ve performansını artırır. Glutamax inkübasyon sırasında L-Glutamin'de gözlenen ani kırılmalardan kaynaklanan problemleri ortadan kaldırır (Şekil 4. 1).



Şekil 4. 1 Hücre kültürüne eklenen L-Glutaminde gözlenen ani kırılmalar sonucu amonyak oluşur.

Glutamax, sulu çözeltilerde büyük oranda çözünür ve ısıyla bozulma göstermez. Glutamax ilavesi, hiçbir enerji ve ya fonksiyon kaybı olmadan tekrar tekrar dondurulup çözülebilir (Butler, 1994; Christie ve Butler, 1994; Yang ve Butler, 2002).



Şekil 4. 2 Glutamax, stabilize formda L-Glutamin, dipeptid L-Alanil-L-Glutamin içerikleri ile ortam stabilitesi sağlar ve amonyak oluşumunu önler.

Glutamax, stabilize formda L-Glutamin, dipeptid L-Alanin-L-Glutamin içerikleri sayesinde uzun süreli kültürde bile bozulmayı ve amonyak oluşumunu önleyen standart kültür

ortamlarıdır. Sulu solüsyonlarda oldukça stabil olmakla birlikte, dipeptid, saklama ve inkübasyon sırasında bozulmaz. Glutamax dipeptidi aminopeptidazlarla ayrılarak L-Glutamin ve L-Alaninin serbest kalması sağlanır. Dipeptidin kullanım mekanizması, kültür sırasında, ortamdaki dipeptidin aşamalı olarak hidrolizi için gerekli olan peptidazın salgılanmasını beraberinde getirir. Sonuçta; verimli bir enerji metabolizması ve yüksek büyüme performansı meydana gelir. Glutamax dipeptidi minimal düzeyde ya da hiç şekil değişimi gözlenmeden direk olarak L-Glutamin yerine kullanılabilir. Böylece, ortamın sürekliliğini artırabilir, toksik amonyak oluşumunu en aza indirebilir ve hücre performansını maksimum düzeye çıkarılabilir.

Sonuçlar değişkenlik gösterebilse de, hücre kültüründe L-Glutamin yerine Glutamax kullanımı hücre canlılığı ve büyümeyi, verimlilik seviyesi potansiyellerini artırır. Glutamax kullanılan kültürlerdeki artan hücre sayısı, verimliliği kanıtlar. Glutamax hücre kültürü zamanını artırabilir, bu da hücre pasaj sayısını azaltır.

Glutamax ile desteklenmiş kültür ortamlarının uygulamaları, hem aderent hem de süspansiyon haldeki memeli hücre kültürlerinde şunlar için uygundur: • Besleme olmaksızın uzun süreli inkübasyon gerektiren kültür sistemleri (ör, klonlama tahlilleri) • Optimum ayarlama gerektiren uzun süreli kültür ortamları (ör, kanser hücreleri, pasajlanan uzun süreli kültürler, toksisite testleri) • Amonyaka duyarlı kültür sistemleri (ör, yüksek yoğunlukta biyoreaktörler) (Brand vd.,1989).

4.1.4 Dengeli Tuz Solüsyonu (Balanced Salt Solution; BSS)

İster HBSS (Hank's BSS), isterse EBSS (Earle's BSS) olsun BSS'leri inorganik tuzlar ve sodyum bikarbonat tampon sisteminden oluşur. BSS'ler temel besiyeri içerisinde fizyolojik şartlarda osmotik basınç ve pH'nın devam ettirilebilmesi için izotonik çözeltiler olarak kullanılır. Hatta BSS viral transport besiyerinde diluent ve komponent olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Sodyum bikarbonatın tamponlayıcı görevinin olmasının yanında besleyici görevi de vardır ve birçok hücre içinde gereklidir. BSS'da glukoz da bulunmaktadır. HBSS'li besiyerlerinde sodyum bikarbonat düşük miktarlarda bulunur ve kapalı sistemler için kullanılır. Yani burada kültür kabının ağzı sıkıca kapatılmalıdır. Açık sistemlerde ise içerisinde yüksek dozda sodyum bikarbonat bulunan EBSS besiyerleri kullanılır. Burada kültür şişesinin kapağı gevşek bırakılır ve bu kültürler % 5'lik CO₂'li ortamlarda inkübe edilmelidir. CO₂'li

ortamlarda inkübasyon sırasında kültür kapları kapaklarının gevşek bırakılmaları dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır (Freshney, 1987; Isenberg, 1992).

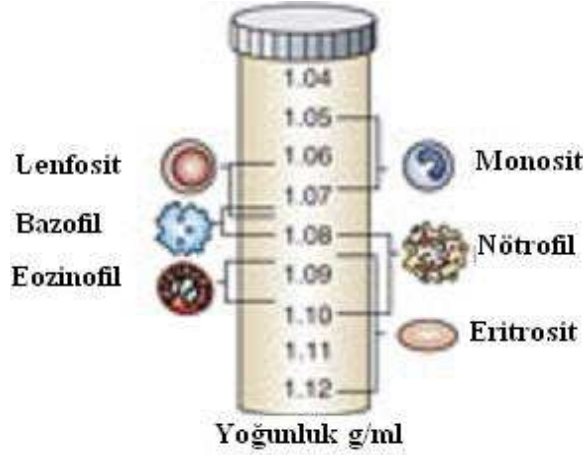
4.1.5 Antibiyotikler

Kültür ortamındaki bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek için besiyerine antibiyotikler ilave edilir. Kontaminasyon amaçlı kullanılan antibiyotikler antibakteriyel ajanlar ve antimikotikler olmak üzere iki grup altında incelenebilir. Bakteri ve mantar kontaminasyonunu kontrol edebilmek amacıyla hücre kültürü besiyerine antibakteriyel ve antimikrobiyal ajanlar katılmalıdır. Genellikle kültürlerde antimikrobiyal ajanların çeşitli kombinasyonları kullanılır. Bu antimikrobiyal kombinasyonlar steril olarak ticari şartlarda temin edilebilir. Ancak burada antimikrobiyal ajanların hücreye olabilecek toksik etkilerini de göz ardı etmemek gerekmektedir. Örneğin doku kültürlerinde penisilin kullanımı bakterilerin L-formunun ortaya çıkmasına neden olur (Baker ve Breach, 1980; Koneman vd., 1992; Doyle vd., 1995). Antibiyotik kullanımında bir başka dezavantaj ise bakteri veya mantar infeksiyonunu baskılayarak, kültürde kronik ya da latent bir infeksiyonun sürmesine neden olmaktadır. Antimikrobiyal ajanlar dokulardan hücrelerin ayrıştırılması esnasında ya da klinik numunelerin kültüre inokulasyonu gibi yüksek kontaminasyon riski olan durumlarda kesinlikle kullanılmalıdır. Ancak hücre kültürlerinin subkültürleri esnasında antimikrobiyal ajanların kullanımından kaçınılmalıdır. Böyle durumlarda mikrobiyal risk aseptik teknikler kullanılarak ortadan kaldırılmalıdır. Sonuçta mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için yüksek oranlarda antibiyotik kullanılmamalıdır. Laboratuvarlarda gelişigüzel antibiyotik kullanımı da önlenmelidir. Aksi takdirde bakteri ve mikoplazmaların direçli suşları oluşabilir. Sıklıkla geniş spektrumlu antibiyotiklerin streptomisin, penisilin ve amfoterisin B (fungizone) ya da gentamisin, ampoterisin B ve Nystatin (10U/ml) kombinasyonları kullanılmaktadır (Baker ve Breach, 1980). Laboratuvarlar da antibiyotikler koruyucu ajanlar olarak kullanılmaktadır. Rutin olarak kullanılan antibiyotiklerin kullanımına kontamine olan kültürlerin tespiti için zaman zaman ara verilmelidir.

4.1.6 Ficoll

Ficoll 1.077 g/ml yoğunlukta sodyum diatrizoat karışımından oluşan ve tek çekirdekli insan hücrelerinin hazırlanmasında kullanılan bir gradiyent yoğunluk ortamıdır. Solüsyon, kemik iliği, periferik kan ve kordon kanından elde edilen tek çekirdekli hücrelerin çok miktarda izolasyonu için kullanılan Ficoll-Paque'ı temel alır. Solüsyon, Bøyum tarafından basit bir

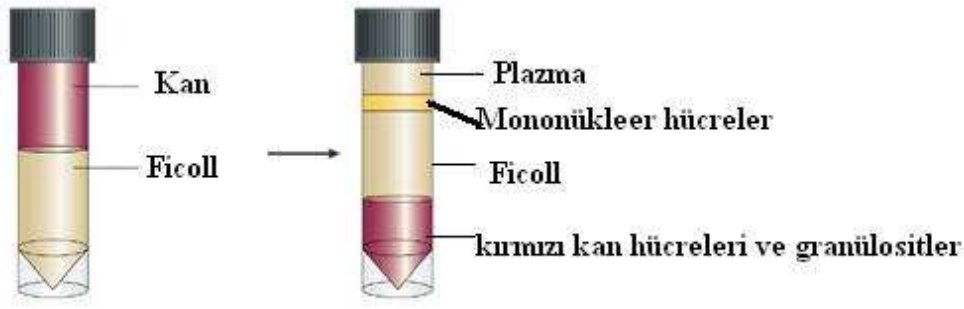
santrifüj tekniği kullanılarak izole edilen tek çekirdekli insan periferel kan hücrelerinin büyük ya da küçük ölçekte saflaştırılması için geliştirilmiştir (Şekil 4. 3) (Bøyum, 1968; Dabbah, 2004).



Şekil 4. 3 Yoğunluk farkı ile tam kanda bulunan hücrelerin ayrılması.

4.1.6.1 Ficoll ile Yoğunluk Farkı Oluşturarak Kandan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

Kan, insandaki her türlü sistemin araştırılması amacıyla kullanılabilcek olan en önemli kaynaktır. Tek çekirdekli hücrelerin ve kanda bulunan diğer elementlerin, yoğunluk farkından yararlanarak ayrılması için kullanılan Ficoll yoğunluk gradiyent santrifüj tekniğiyle saflaştırılması mümkündür. Tek çekirdekli hücreler ve trombositler, kırmızı kan hücreleri (RBC) ve granüositlere kıyasla düşük yoğunlukları nedeniyle Ficoll katmanının en üstünde kalır; kırmızı kan hücreleri ve granüositler ise Ficoll'ün oluşturduğu tabakanın en altında bulunur (Şekil 4. 4).



Şekil 4. 4 İnsan kanındaki tek çekirdekli hücrelerin Ficoll gradiyent santrifüj ile izolasyonu

Trombositler ile tek çekirdekli hücreler yıkama yoluyla ya da yalnız tek çekirdekli hücrelere nüfuz eden fetal sığır serumu (FBS) ile santrifüj yoluyla birbirinden ayrılır. Tek çekirdekli hücre örneği monositlerinden bağlanma ya da L-Leucine metil estere maruz bırakma yoluyla ayrılabilir. Bebeklerde kordon kanı ve periferel kan, tek çekirdekli hücre tabakasında önemli derecede kontaminasyona neden olabilen, çekirdekli kırmızı kan hücreleri gibi olgunlaşmamış hücreler içerir. Bu tip hücrelerin ortamdaki çıkarılması birkaç ekstra basamakla mümkündür. Bu teknik insan lenfoid hücrelerinin kullanıldığı çalışmaların birçoğunun başlangıç noktası olmuştur. Genel olarak, Ficoll-Hypaque santrifüjü, izole edilmiş tek çekirdekli hücre popülasyonunun fenotipini ya da fonksiyonlarını değiştirmez. Yine de, bu görüş çeşitli hastalardan alınan hücreler üzerindeki çalışmalarla incelenmeli ve doğrulanmalıdır (Niku vd., 1987; Boyum, 1968; Kaplan vd., 1982; Ridings vd., 1996; Thiele vd.,1983). Monosit/makrofaj yokluğunda lenfosit fonksiyonlarını ya da lenfosit yokluğunda monosit/makrofaj fonksiyonlarını çalışmak üzere tek çekirdekli hücre popülasyonundan monositler/makrofajlar çıkarılmıştır. Bebeklerden alınan kordon kanı ve periferel kan sonuçları, Ficoll-Hypaque yoğunluk ayırımıyla çeşitli sonuçlar vermiştir. Tek çekirdekli hücre tabakası, sıklıkla, tek çekirdekli yapının alt kısmına tutunan hücre kümelenmeleri şeklinde görülen eritrositlerle kontamine olmuştur. Flow sitometre analizi, olgun eritrositlerin ışık saçma temelinde dahil edilmediğinde bile kayda değer miktarda CD45⁻ hücrelerinin kaldığını gösterir. Bu hücreler, sayıca glikoprotein pozitif kırmızı hücre prekürsörleri, CD45⁻ hücrelerinden daha az olduğu halde glikoprotein pozitif kırmızı hücre prekürsörlerini barındırır (Ridings vd., 1996). CD45⁻ hücrelerinin sayısı kordon hazırlanmasında $\leq\%10$ ile $\geq\%50$ gibi bir miktarda değişkenlik gösterir. Kordon kanı ayrıca, az sayıda CD34⁺ kök hücreleri de bulundurur. Bu hücreler fenotipi belirgin şekilde değiştirmek için yeterli sayıda olmasa da

fonksiyonel hücreleri etkileyebilir. CD45⁻ hücre sayısının kırmızı hücre prekürsörlerinden tam olarak sorumlu olamayacağı, bunun sonucunda da fonksiyonel hücelere etki edebilen karakterize olmamış hücrelerin bulunabileceği gerçeği göz önünde bulundurulmalıdır.

4.1.6.2 Ficoll İle Yoğunluk Farkı Oluşturarak Kandan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonunda Kritik Parametreler ve Sorun Giderme

Periferal kandan alınan tek çekirdekli hücrelerin verimliliği, kontaminasyona neden olan granülositlerin ve trombositlerin yüzdesine ve eritrositten kurtulma verimliliğine bağlıdır. Maksimum verimlilik ve saflık için, Ficoll interfazındaki tüm materyallerin ortamdan uzaklaştırılması ve ortamda hiç Ficoll solüsyonu ya da süpernatantının bulunmadığından emin olunması gerekmektedir. Ficoll tekniğinin granülosit, süpernatantın da trombosit kontaminasyonu riskini arttıracığı göz önüne alındığında, eritrositlerin bir araya gelebileceği ve kümelenmelerine lenfositleri katabilecekleri bir ihtimaldir. Bu kümelenmeler pellette çökelti oluşturarak lenfosit verimini düşürür. Kanı, Ficoll santrifüjü öncesi PBS ile seyreltmek kümelenmeyi azaltır. Ayrıca, santrifüjün sıcaklığı da lenfosit verimini etkileyebilir. Düşük sıcaklıklarda lenfosit verimi azalır, çünkü; santrifüj süresi artar. Yüksek sıcaklıklarda ise, lenfosit canlılığı azalır ve eritrosit kümelenmesi artar. Gradyent santrifüj sırasında sıcaklık 18°C ile 20°C arasında bir sıcaklıkta sabitlenmelidir. Kimi zaman, tek çekirdekli hücreleri kan pıhtısından ayırmak gerekebilir. Bu işlem, kan pıhtısını streptokinazda çözerek başarıyla gerçekleştirilebilir. Pıhtılaşmış kandan izole edilen lenfositler, heparinli kandaki lenfosit verimi %60 civarında olduğu halde, bazı yönlerden heparinli kandan izole edilmiş hücrelerle benzerlik gösterir (Niku et al., 1987; Boyum, 1968; Kaplan vd., 1982; Ridings vd., 1996; Thiele vd.,1983).

4.1.7 Hücre Kültüründe Kullanılan Flasklar

Plastiğe yapışma hücre üretiminde son derece önemli olduğundan kullanılan hücre kültür kaplarının plastik özellikleri önem taşımaktadır. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada 4 farklı firma tarafından üretilen flasklar karşılaştırılmış ve en iyi sonucun Falcon, ikinci sırada ise Costar kültür şişelerinde olduğu rapor edilmiştir. Flasklar arasında gözlenen bu fark, bu polisitren flaskların üretimi sırasında reaktif gaz plazması oluşturarak yüksek voltajlı korona deşarjı ile sıvanması yöntemindeki farklılardan kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu işlem Falcon marka flasklarda kapalı bir kabin içinde gerçekleştiğinden hava ile teması sonucu yüzeyde gün be gün değişimin gözlenmediği bildirilmiştir. Oysaki diğer marka flaskların hazırlanması sırasında bu işlem açık hava

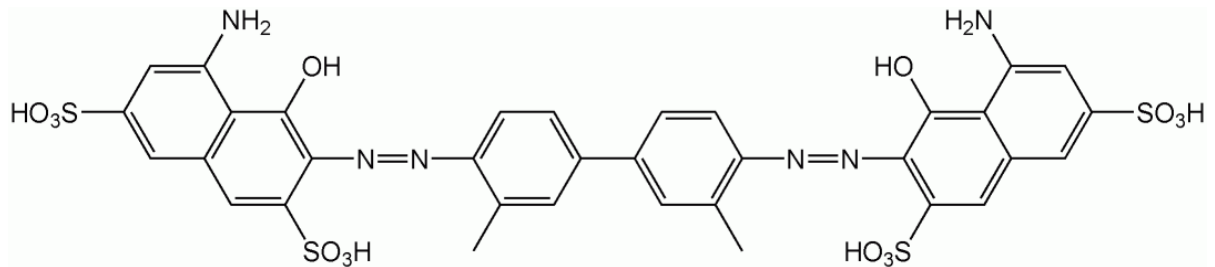
ortamında yapıldığından flask yüzeyi zamanla aşınır (Sotiropoulou vd., 2006) (Şekil 4. 5).



Şekil 4. 5 Hücre kültüründe kullanılan flasklar. A:Falcon Marka flask, B: Techno Plastic Products (TPP) Marka flask

4.1.8 Tripan Mavisi (TM):

Hücre kültüründe kullanılan Tripan mavisi molekül yapısı $C_{34}H_{23}N_6O_{14}S_4Na_4$ olan, canlı hücreleri boyamayıp, ölü hücreleri boyayan böylece canlı hücre sayısını tespit etmekte kullanılan vital bir boyadır.



Şekil 4. 6 Tripan mavisi molekül yapısı.

5. FLOW SİTOMETRE

Flow Sitometre (Akım Sitometresi); tek bir hücrenin, morfolojik özelliklerinin, hücre döngüsü ve DNA miktarının yanında hücre yüzeyinde bulunan çeşitli antijenik yapıların aynı anda incelenebilmesi imkanı veren bir sistemdir. Flow Sitometrik uygulamalar cihazı üreten firma ve cihaz özelliklerine göre farklılıklar gösterir. Sorting özelliği olan modellerde cihaza verilen örnekler incelenen özelliklere göre ayırd edilerek steril şartlarda izole edilebilir.

Flow Sitometre tekniği, süspans hücrelerin ışık demeti yayılan dedektörlerden akması sonucu çeşitli parametrelerin ölçülmesini içerir. Flow Sitometrenin ana sınırlayıcı etkeni; analizin yapılabilmesi amacıyla hücrelerin süspansiyon içerisinde teker teker bulunmasıdır. Bu gereksinim, kan ve diğer akışkanlarda kolayca sağlanabilir (Bieback, 2004; Luider, 2004; Stewart, 2005). Teknik 5000–10000 hücrenin analizine olanak sağlar.

5.1. Flow Sitometrenin Kullanım Alanları

- Heterojen hücre popülasyonlarının tanımlanması,
- Tek hücre seviyesinde analiz imkanı,
- Hücre büyüklüğü ve granülarite ölçümü,
- Hücre içi ve yüzey antijenlerinin saptanması,
- Total DNA içeriğinin ölçümü,
- Kromozomlardaki DNA içeriğinin belirlenmesi,
- Total hücre proteini miktarının belirlenmesi,
- Enzim aktivitesi ve lokalizasyonu,
- Hücre “sorting” işlemi,
- Apoptosis ölçümü,
- G0 ve G1 fazında bulunan hücrelerin ortalama DNA içeriğinin belirlenmesi,
- Hücre siklusunda her fazda bulunan hücre sayısı (Bieback, 2004; Luider, 2004; Stewart, 2005)

5.2. Flow Sitometrenin avantajları

- Hızlı sonuç verir,
- 500–5000 arası asılı süspans partikülü -ki bunlar genellikle hücrelerdir- saniye başına analiz etme özelliği sağlar,

- Multiparametrikdir. Hücreleri; fonksiyonel, biyokimyasal, morfolojik veya sitogenetik özelliklerine ayırabilir,
- Bütün hacmi değil; hücreleri teker teker bir seferde ele alır,
- Heterojen populasyonların sınıflandırılmasını mümkün kılar,
- İmmü Floresan İşaretleme yapar

Floresan antikorlar ile; spesifik yüzey reseptörlerinin yoğunluğunu ve böylece farklı hücre tiplerinin alt populasyonlarını belirlemede kullanılır (Çizelge 4. 1) (Roberts, 2004; Reyes ve Verfaillie 2001). Floresan ile kök hücreler, virüs ya da hormonların hücre yüzey reseptörlerine tutunması ölçülebilir.

Çizelge 5. 1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometrik Belirteçleri

Pozitif belirteçler	CD 105,CD 90 ,CD 73, CD 106
Negatif belirteçler	CD 45, CD 34 , CD 14(CD 11b) CD 79 α veya CD 19,HLADR
Karakteristik belirteçler	SH2, SH3, SH4,STRO-1
Reseptörler	EGF,PDGF ,NGF, IGF-1 β -1 integrin reseptörleri
Adhezyon Molekülleri	Integrinler , ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1,LFA-3, L-selectin,endoglin, CD44
Ekstrasellüler Matriks	Kollajen tip I, III, IV, V ve VI Fibronektin, laminin proteoglikanlar

İmmünfloresan işaretleme için direk ve indirek metodlar kullanılır.

1. Direk metod;

- Antikorla konjuge olmuş florokrom kullanılır.
- Florokrom maddeler olarak FITC (fluorescein isothiocyanate) ve PE (rhodamin, phycoerythrin) kullanılabilir.
- Bağlanmaların spesifik olması avantaj iken çok düşük yoğunluğa sahip yüzey antijenlerinin gösterilememesi bir dezavantajdır,
- Non-spesifik bağlanma çok azdır.

2. İndirekt metot

- Hücrelerin önce işaretsiz bir monoklonal antikora, daha sonra işaretli ikinci bir monoklonal antikorun işaretsiz monoklonal antikora bağlanmasıyla olur.
- Avantajı; çok düşük yoğunluğa sahip yüzey antijenlerinin gösterilebilmesi, dezavantajı non-spesifik bağlanmaların olmasıdır.

6. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

6.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

6.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Etüv
- pH Metre (Inolab WTW Level 1)
- Hassas Terazî (Precisa XB 220A)
- Santrifüj (Hettich ZENTRIFUGEN – EBA20)
- Vorteks (Heidolph REAX top)
- Bidistile Su Cihazı
- Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR 3001)
- Laminar-Hava Akışlı Kabin
- İnkübatör (37 °C %5 CO₂'li)
- Ters Mikroskop
- - 45 ° C Derin Dondurucu
- Sıvı Azot Tankı
- Otoklav
- Flow sitometre (Becman Coulter Cell LabQuanta SC)

6.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 6. 1 Deneylerde kullanılan sarf malzemeler

Madde adı	Üretici Firma	Katalog No
Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 4.5 g/L D-Glucose	Invitrogen	31053
HyClone Fetal Bovine, South	Thermo Scinetific	SV3016003

American Origin		
Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 1.0 g/L D-Glucose(1X)	Invitrogen	11880
Glutamax™-I (100x)	Invitrogen	35050-079
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Invitrogen	15240-062
Trypan blue (%0,5)	Biological Industry	628255
Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na, liquid	Invitrogen	25300-054
FBS	Biochrom AG	1038K
Red Blood Lysis Buffer	Roche	11814389001
Ficoll	GE Healthcare	17-1440-03
FITC antihuman CD34 (Thy1)	BioLegend	343603
PE antihuman CD90 (Thy1)	BioLegend	328109
Red Blood Cell Lysis Buffer	Roche	118 814 389 001

6.2 Deneyde Kullanılan Çözeltiler

6.2.1 PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu) Çözeltisi

Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir solüsyondur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. Ortamın

pH'ını tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar.

6.2.2 1x PBS Çözeltisinin Hazırlanması

NaCl	4 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

olacak şekilde tartıldı. Distile deiyonize su ile 800 ml'ye tamamlandı. Çözeltinin pH 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim 1 litreye deiyonize su ile tamamlandı. Otoklav da 1 atm basınçta 121 °C' de 20 dakika tutularak steril edildi.

6.2.3 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması

Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan serin proteaz tipi temel bir enzimdir. Tripsin, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmasını sağlar. Çalışmalarımızda literatürde kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin pasajınca önerilen %0,25 EDTA'lı tripsin solüsyonu kullanıldı. Tripsin-EDTA ticari solüsyonu, enzim aktivitesinin azalmaması için stok şişesi ile laboratuvara getirildikten sonra 15ml steril Falcon tüplerine bölünerek -20 °C' de saklandı.

6.3 Göbek Kordonu İçin Taşıma Ortamı Hazırlanması

6.3.1 Antikoagülant Olarak Heparin

Tek kullanımlık 50 ml' lik steril şırınga içerisine antikoagülant olarak 45µl heparin (5IU/ml) steril kabin içinde çekildi, iğnenin ağzı steril olarak tekrar kapatılarak şırınga hazırlandı.

Kordon kanı alındıktan sonra işleme konulmadan önce oda sıcaklığında tutulması gerektiğinden kapalı bir taşıma kutusu hazırlandı.

6.3.2 Antikoagülant Olarak Liquemine

Tek kullanımlık 50 ml' lik steril şırınga içerisine antikoagülant olarak 90µl liquemine steril kabin içinde çekildi, iğnenin ağzı kapatılarak hazırlandı.

6.4 Donörün Çalışma Hakkında Bilgilendirilmesi Ve Etik Kurul Onayı Alınması

Sezaryen ile doğum öncesi donör çalışma hakkında bilgilendirildi, onayı alınan gönüllü Etik Kurul Onam Formu'nu doldurup imzaladı. Ameliyatı yapacak olan doktor da konu hakkında bilgilendirildi ve işlemin herhangi bir risk taşımadığı onayı alındı. Onay alma işlemine

hastane personelinden bir kişi de şahitlik etti (Ek 1).

6.5 Göbek Kordonunun Alınması

Doğumdan sonra göbek kordonunu iki kısıkaç ile biri bebeğe diğeri plasentaya yakın olacak şekilde tutuldu (şekil 6. 1).



şekil 6. 1 Sezaryen ile doğum sonrası insan göbek kordonunun hazırlanması.

Yenidoğan ile plasenta arasındaki kordon kesildi (şekil 6. 2), göbek kordonunu kanı, doğuma katılan uzman kişilerce doğumu takiben 15 dakika içinde kordon veninden (şekil 6. 3) 50ml enjektör ile çekildi, enjektör %70'lik alkol ile silinerek kapalı pozisyona getirildi.



şekil 6. 2 Sezaryen ile doğum sonrası insan göbek kordonunun kesilmesi.



Şekil 6. 3 Göbek kordon ven ve arterleri.

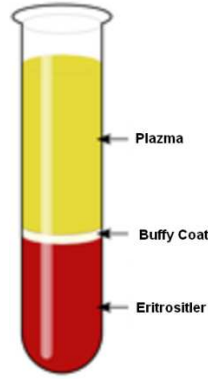
Enjektör içindeki kordon kanı laboratuara taşınana kadar hemoliz olmaması hafifçe alt-üst edilerek heparinin karışması sağlandı. Kordon kanı enjektör içinde yavaşça alt-üst edilerek 2 saat içinde laboratuara getirilerek işleme alındı.

6.6 Göbek Kordon Kanından Mononükleer Kök Hücrelerin İzolasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin kaynağından alındıktan sonra izolasyonu için çalışmamızda kullanılan 2 temel yöntem vardır. Bunlar; Yoğunluk gradienti ve santrifügasyon ile ayırma yöntemleridir.

6.6.1 Santrifügasyon İle İzolasyon Yöntemi

Yoğunluk gradient yöntemi ile izolasyonda kullanılan Ficoll'ün hücre üzerinde toksisite oluşturma olasılığı nedeniyle kullanımı tartışma konusudur. Bu nedenle özellikle klinik kullanım için mezenkimal kök hücre izolasyonunda santrifügasyon yöntemi önerilmektedir (Chang vd., 2009). Seyreltilmiş kan örnekleri santrifügasyon ile ayırım yapabilmek için 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Buffy coat tabakası steril pasteur pipeti ile çekilerek temiz bir falkon tüpüne alındı (Kawasaki vd., 2008). Kordon kanındaki mononükleer hücreler, kanın santrifügasyon ile ayrılan bufy-coat tabakasından (Şekil 6. 4) çekilerek dikkatli bir şekilde yeni santrifüj tüplerine alındı. Yeni santrifüj tüpüne aktarılan hücreler için yıkama işlemi 1x AntiAnti içeren 5ml besiyeri ile 4°C' da 1000 rpm' de 8 dakika santrifüj edilerek gerçekleştirildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet üzerine 5ml besiyeri ilave edildi. Pellet besiyeri içinde süspanse edildikten sonra yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.



Şekil 6. 4 Santrifügasyon ile ayırma işleminde tam kanda bulunan eritrositler, buffy coat tabakası ve plazmanın ayrılması

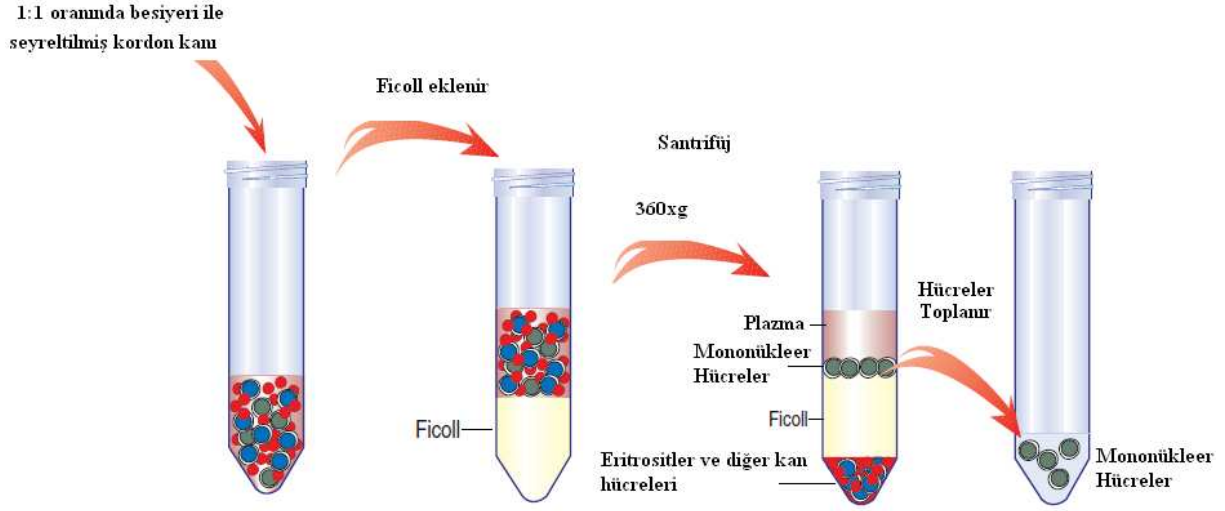
6.6.2 Yoğunluk Farkıyla Ayırma İle Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

Çalışmamızda mononükleer hücrelerin Ficoll, yoğunluk gradienti yöntemi ile ayrılmasında literatüde önerilen 2 farklı santrifüj hızı kullanıldı. Farklı zamanlarda alınan ortalama 30 donör kordon kanı, 2 farklı santrifüj hızı (360xg ve 900xg) ile 30 dakika santrifüj edildi.

6.6.2.1 Mononükleer Hücrelerinin Yoğunluk Farkıyla Ayırma İle İzolasyonunda 360xg Santrifüj Hızı

Laboratuara getirilen kordon kanı, 1:1 oranında seyreltilmek üzere 50 ml konik falkon tüplerine bölündü. Üzerine eşit hacimde 1x AntiAnti içeren besiyeri eklendi. Tüpler hafifçe alt-üst edilerek besiyeri ve kanın karışması sağlandı. Temiz 50 ml konik falkon tüplerine kan ile eşit hacimde Ficoll eklendi. Seyreltilmiş kan ve besiyeri karışımı 10ml'lik serolojik pipet yardımıyla tüpün kenarından 45°'lik açı ile Ficoll üzerinde faz oluşturacak şekilde yavaşça eklendi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak hiç sarsmadan santrifüj cihazına konuldu ve 20°C' da 360xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra mononükleer hücreler Ficoll-Hypaque (1.077 g/L yoğunlukta) solüsyonundan daha düşük yoğunluğa sahip oldukları için bu solüsyonun üzerinde bir sis bulutu halinde görüldü. Üst kısımda oluşan plazma tabakası daha sonra kullanılmak üzere pasteur pipeti yardımıyla ayrılarak temiz bir tüpe aktarıldı. Daha sonra tüm tüplerde Ficoll ile plazma arasındaki tabakasında sis tabakası gibi görünen mononükleer hücreler tek kullanımlık steril pasteur pipeti yardımıyla çekilerek 15 ml' lik steril santrifüj tüplerine alındı, üzerine 5ml 1x AntiAnti içeren besiyeri eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika 300xg'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan pellet %15 Hyclone FBS 1x AntiAnti ve 2 mM Glutamax içeren 7,5 ml tam besiyeri içinde süspanse edilerek 25cm²'lik kültür flasklarına

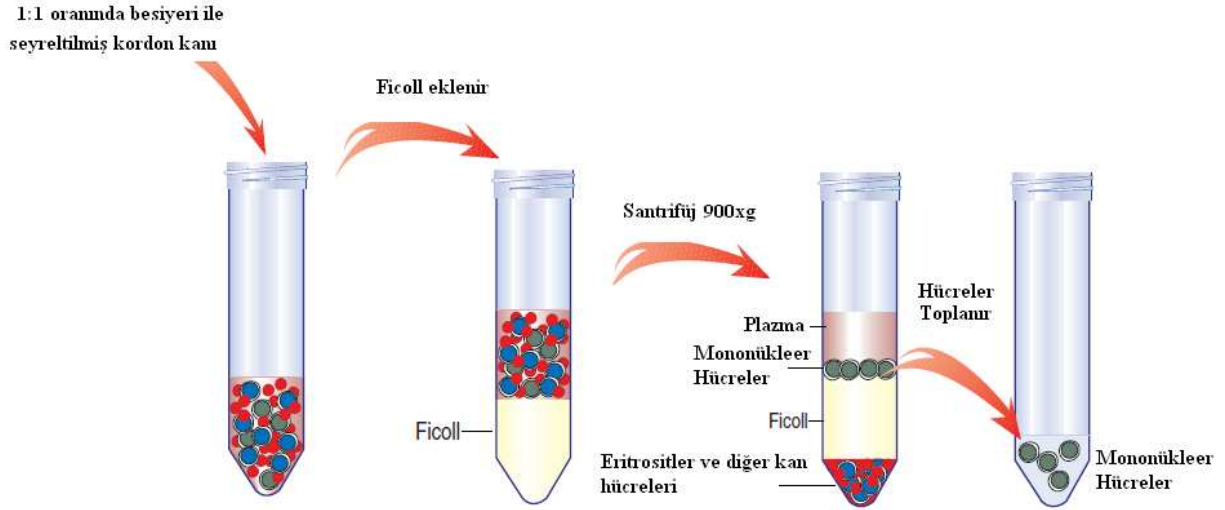
ekildi (Şekil. 6. 5).



Şekil 6. 5 Yoğunluk farkıyla kordon kanından mononükleer hücrelerin izolasyonu

6.6.2.2 Mononükleer Hücrelerinin Yoğunluk Farkıyla Ayırma İle İzolasyonunda 900xg Santrifüj Hızı

Laboratuara getirilen kordon kanı, 1:1 oranında seyreltilmek üzere 50 ml konik falkon tüplerine bölündü. Üzerine eşit hacimde 1x AntiAnti içeren besiyeri eklendi. Tüpler hafifçe alt-üst edilerek besiyeri ve kanın karışması sağlandı. Temiz 50ml konik falkon tüplerine kan ile eşit hacimde Ficoll eklendi. Seyreltilmiş kan ve besiyeri karışımı 10ml'lik serolojik pipet yardımıyla tüpün kenarından 45°'lik açı ile Ficoll üzerinde faz oluşturacak şekilde yavaşça eklendi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak hiç sarsmadan santrifüj cihazına konuldu ve 20°C' da 900xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra mononükleer hücreler Ficoll (1.077 g/L) solüsyonundan daha düşük yoğunluğa sahip oldukları için bu solüsyonun üzerinde bir sis tabakası halinde görüldü (Şekil 6. 6). Üst kısımda oluşan plazma tabakası daha sonra kullanılmak üzere pasteur pipeti yardımıyla ayrılarak temiz bir tüpe aktarıldı. Daha sonra tüm tüplerde Ficoll ile plazma arasındaki tabakasında sis tabakası gibi görünen mononükleer hücreler tek kullanımlık steril pasteur pipeti yardımıyla çekilerek 15ml' lik steril santrifüj tüplerine alındı, üzerine 5ml 1x AntiAnti içeren besiyeri eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika 300xg'de santrifüj edildi. Süpernat uzaklaştırıldı.



Şekil 6. 6 Yoğunluk farkıyla kordon kanından mononükleer hücrelerin izolasyonu

6.6.3 Eritrosit Lizis Tamponu ile Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

Laboratuara getirilen kordon kanı, 1:1 oranında seyreltilmek üzere 50 ml konik falkon tüplerine bölündü. Üzerine eşit hacimde 1x AntiAnti içeren besiyeri eklendi. Tüpler hafifçe alt-üst edilerek besiyeri ve kanın karışması sağlandı. Temiz 50ml konik falkon tüplerine kan ile eşit hacimde Ficoll eklendi. Seyreltilmiş kan ve besiyeri karışımı 10ml'lik serolojik pipet yardımıyla tüpün kenarından 45°'lik açı ile Ficoll üzerinde faz oluşturacak şekilde yavaşça eklendi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak hiç sarsmadan santrifüj cihazına konuldu ve 20°C' da 900xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra mononükleer hücreler Ficoll (1.077 g/L) solüsyonundan daha düşük yoğunluğa sahip oldukları için bu solüsyonun üzerinde bir sis tabakası halinde görüldü. Üst kısımda oluşan plazma tabakası daha sonra kullanılmak üzere pasteur pipeti yardımıyla ayrılarak temiz bir tüpe aktarıldı. Daha sonra tüm tüplerde Ficoll ile plazma arasındaki tabakasında sis tabakası gibi görünen mononükleer hücreler tek kullanımlık steril pesteur pipeti yardımıyla çekilerek 15ml' lik steril santrifüj tüplerine alındı, üzerine 5ml 1x AntiAnti içeren besiyeri eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika 300xg'de santrifüj edildi. Süpernat uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine 100µl Eritrosit Lizis Tamponu (Red Blood Cell Lysis Buffer) eklendi. Pellet pipetaj ile tampon içinde resüspanse edildi, oda sıcaklığında arada karıştırılarak 10 dakika bekletildi. 2500rpm'de 25°C'da 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.

6.7 Hücrelerin Kültüre Alınması

İzolasyonun ardından süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan pellet %15 Hyclone FBS 1x AntiAnti ve 2 mM Glutamax içeren 7,5 ml besiyeri içinde süspansiyon edilerek 25cm²'lik kültür flasksına ekildi. Çalışmamızda farklı besiyerlerinin insan göbek kordon kanı mezenkimal kök hücreleri üzerine etkisinin belirlenmesi için düşük ve yüksek glikozlu DMEM ile IMDM besiyerleri kullanıldı. Bu 3 farklı besiyeri ile hazırlanan besiyerleri ile ekimi yapılan hücreler 37°C' da %5 CO₂, %95 nem içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin besiyerleri günlük olarak değiştirildi ve morfolojileri invert mikroskop altında incelendi.

6.7.1 Mononükleer Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültüründe kullanılan farklı besiyerlerinin hazırlanması için öncelikle -20°C' da muhafaza edilen serum, Glutamax ve AntiAnti 37°C' lık etüv içinde ısıtıldı. 50 ml'lik steril falkonlar içine son konsantrasyonları %15 serum, 2 mM glutamax ve 1x AntiAnti olacak şekilde hesaplanarak eklendi. Farklı besiyerleri ile 50 ml'ye tamamlandı.

6.7.2 Mononükleer Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Serumların Hazırlanması

Çalışmamızda kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kültüründe önerilen 3 farklı serum kullanıldı. İnsan kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin kültüründe kullanılacak olan en uygun serumun belirlenmesi için literatürde önerilen Fetal Sığır Serum (FBS), düşük IgG oranına sahip HyClone Fetal Sığır Serum ve insan göbek kordon kanı otolog serumu tüm deneylerde, besiyerlerindeki son konsantrasyonu %15 olacak şekilde hazırlanarak kullanıldı.

6.7.2.1 Fetal Sığır Serum

Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültüründe kullanılan ve -20°C' da muhafaza edilen FBS stok solüsyonu 56°C' lık su banyosunda inaktive edildikten sonra besiyerindeki konsantrasyonu %15 olacak şekilde hazırlandı.

6.7.2.2 Hyclone Fetal Sığır Serum

Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültüründe kullanılan ve -20°C' da muhafaza edilen FBS stok solüsyonu 37°C' lık etüvde çözündürüldükten sonra besiyerindeki konsantrasyonu %15 olacak şekilde hazırlandı.

6.7.2.3 Otolog serum

Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kültüründe FBS'ye alternatif olarak kordon kanı

otolog serumu kullanımı ile kültürün 3 pasajına kadar FBS içeren besiyerlerine kıyasla MKH proliferasyonunun belirgin şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir. Kordon kanından otolog serumu literatürde belirtildiği şekilde tam kan örneği 15 ml Falcon tüpü içinde 1000xg' de 30 dakika 20°C'da santrifüj edildi. Üst fazda oluşan temiz serum fazı steril pasteur pipeti ile dikkatlice çekilerek steril Falcon tüp içine alındı. Serum 0.22-µm'lik steril filtreden geçirildikten sonra 56°C'da 30 dakika inaktive edildi. Besiyerindeki konsantrasyonu %15 olacak şekilde hazırlandı (Shetty vd., 2007).

6.7.3 Besiyerlerinin Hazırlanması

6.7.3.1.1 Düşük Glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM)

50 ml Falcon tüpü içerisine 41,5 DMEM eklendi üzerine 0,5 ml Anti-Anti ve 0,5 ml Glutamax ilave edildi. Son konsantrasyonu %15 olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş serum ilave edildi ve tüp yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.

6.7.3.1.2 Yüksek Glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM)

50 ml Falcon tüpü içerisine 41,5 DMEM eklendi üzerine 0,5 ml Anti-Anti ve 0,5 ml Glutamax ilave edildi. Son konsantrasyonu %15 olacak şekilde inaktive edilmiş serum ilave edildi ve tüp yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.

6.7.3.1.3 Iscove'un Modifiye Eagle Medyumu (IMDM)

50 ml Falcon tüpü içerisine 41,5 Iscove'nin modifiye ettiği Dulbecco mediumu eklendi. Üzerine 0,5 ml Anti-Anti ve 0,5 ml Glutamax ilave edildi. Son konsantrasyonu %15 olacak şekilde inaktive edilmiş serum ilave edildi ve tüp yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.

6.7.4 Hücre Kültürünün Tripsinizasyonu

İnkübasyon sonrası hücrelerle kaplanan flask içerisindeki besiyeri dökülerek flask yüzeyi 1xPBS ile yıkandı ve 1 ml %0.05'lik Tripsin/EDTA ilave edilerek 5-10 dakika inkübatörde bekletildi. Yüzeyden ayrılan hücreler 5 ml PBS ile bir falkon tüpe aktarıldı. Oda ısısında 1.000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst sıvı uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan hücre pelleti resüspanse edildi. Olgunlaşmış hücrelerin daha iyi bir gelişme göstermesi için yeni bir flask içine pasajlanarak ekimi yapıldı.

6.7.5 Mononükleer Hücrelerin Kültüründe Kullanılan Flasklar

Çalışmamızda kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültüründe Falcon ve Techno Plastic Products (TPP) marka 25cm²'lik flasklar kullanıldı.

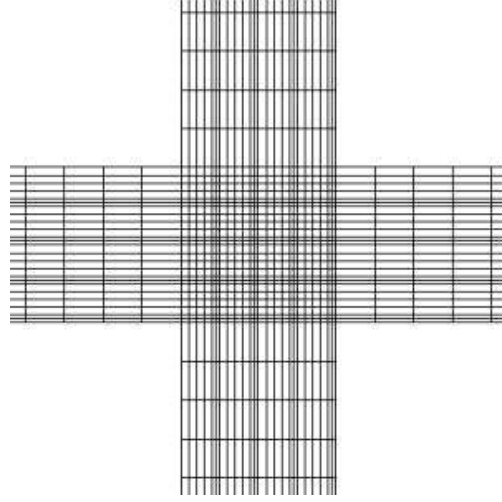
6.7.6 Morfolojik İnceleme

Kordon kanından izole edilip kültürü yapılan mononükleer hücrelerin morfolojileri invert faz kontrast mikroskobunda incelendi.

6.7.7 İzole edilen mononükleer hücrelerin Tripan Blue boyası ile canlılıklarının belirlenmesi ve Thoma lamında sayılması:

6.7.7.1 Thoma lamı:

Hücre kültüründe hücrelerin sayılması için kullanılan Thoma lamı üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan özel bir mikroskop lamıdır. Her büyük karenin alanı 1mm^2 'dir (Şekil 6. 7).



Şekil 6. 7 Thoma lamı üzerindeki yivler

Lam üzerine konulan sıvının derinliği 0,1 mm'dir. Sonuçta her büyük kare üzerindeki sıvı hacmi 10^{-4} ml'dir. Thoma lamı üzerindeki karelerin içine düşen hücrelerin sayısı, seyreltme faktörü ve thoma lamı sabiti olan 10.000 ile çarpılarak 1 ml' deki hücre sayısı bulunur. Daha sonra aşağıdaki formül ile istenilen dilüsyon yapıldı.

$$\text{Dilüsyon Miktarı} = \frac{\text{Başlangıçtaki Dilüsyon} \times \text{Ortalama Sayılan Hücre} \times 10.000}{\text{İçin Katılan Miktar} \times \text{Sayısı} \quad (\text{Sabit})}$$

ml. de İstenilen Hücre Sayısı

Örneğin ml’de 100.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu elde etmek istiyoruz. Thoma lamının bir tarafındaki 16 karede sayılan hücre sayısı 60, diğer tarafındaki hücre sayısı 40 olsun. Başlangıçtaki hücre pelleti 5 ml üretme besiyeri ile dilüye edilmiş olsun. Buna göre;

$$\text{Ortalama hücre sayısı} = 60 + 40 = 50$$

$$\text{Dilüsyon miktarı} = (5 \times 50 \times 10.000) / 100.000 = 25$$

Hücre pelleti üzerine toplam 25 ml olacak şekilde besiyeri konulursa her ml’de 100.000 hücre olacaktır. Buna göre başlangıçta 5 ml olan hücre süspansiyonuna 20 ml üretme besiyeri ilave edilmelidir.

6.7.7.2 Tripan Mavisi (TM) İle Canlı Hücrelerin Sayılması

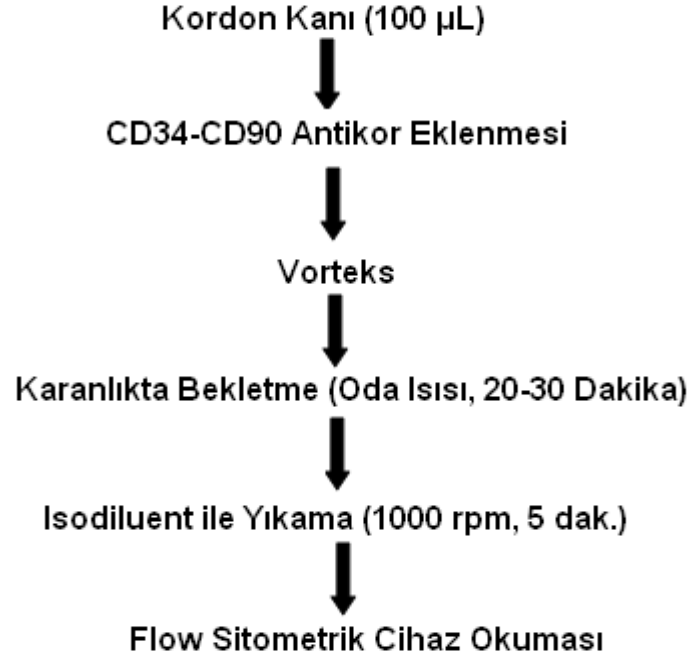
Hücrelerin sayımının kolay yapılması için 100 kat seyretme tercih edildi. Besiyeri ile yıkanarak santrifüj edilen, süpernatantı uzaklaştırılan ve ardından resüspanse edilen hücre süspansiyonundan 2 µl otomatik pipet ile çekilerek 1,5 ml’lik steril eppendorf tüpü içine aktarıldı. Üzerine 98 µl %0,4 tripan mavisi solüsyonu ve 100 µl besiyeri eklenerek iyice pipetaj yapıldı. Thoma lamının her iki bölümüne de lam ile lamel arasına 10 ar µl hücre süspansiyonundan dikkatlice yayıldı. Ters mikroskop altında tripan mavisi ile maviye boyanmamış olan hücreler sayıldı.

6.8 Flow Sitometrik analiz

6.8.1 Kordon Kanı (Tam Kan) Flow Sitometrik Analizi

Mononükleer hücre izolasyonu için göbek kordonundan, heparinli enjektör içinde, 30 mL kordon kanı 2 saat içinde laboratuara getirildi. Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotiplendirilmesinde negatif kontrol olarak CD34-FITC (BioLegend), pozitif olarak ise CD90-PE (BioLegend) immünofloresan antikorlar kullanıldı. Her bir antikordan 20’şer µl, Flow tüplerine (Beckman Coulter, ABD) eklendi. Kordon kanı örneğinden 100 µL alınarak üzerine eklenir ve 1 dakika vortekslenir. Karanlık ortamda 20–30 dakika, oda ısısında antikorların yüzey antijenlerine bağlanması için beklenir. Bekleme sonunda kordon kanı örneklerinin üzerine 500 µl isodiluent eklenerek, 5 dakika 1000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra tüplere 500 µl isodiluent eklenerek Flow Sitometre (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta, USA) cihazında okutuldu (Çizelge 6. 2).

Çizelge 6. 2 Tam kordon kanının Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması

Tam Kordon Kanı ile Flow Sitometrik Analiz Şeması**6.8.2 Periferik Kan (Tam kan) ile Flow Sitometrik Analiz**

Mononükleer hücre izolasyonu için 5 mL EDTA'lı periferik kan 2 saat içinde laboratuara getirildi. Periferik kan mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotiplendirilmesinde negatif kontrol olarak CD34-FITC, pozitif olarak ise CD90-PE immünofloresan antikorlar kullanıldı. Her bir antikordan 20'şer µl, Flow tüplerine (Bechman Coulter, ABD) eklendi. Periferik kan örneğinden 100 µl alınarak antijem üzerine eklendi ve 1 dakika vortekslendi. Karanlık ortamda 20–30 dakika, oda ısısında antikorların yüzey antijenlerine bağlanması için bekletildi. Bekleme sonunda periferik kan örneklerinin üzerine 500 µl isodiluent eklenerek, 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra tüplere 500 µl isodiluent eklenerek Flow Cytometer (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta, USA) cihazında analiz edildi (Çizelge 6. 3).

Çizelge 6. 3 Tam periferik kanın Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması

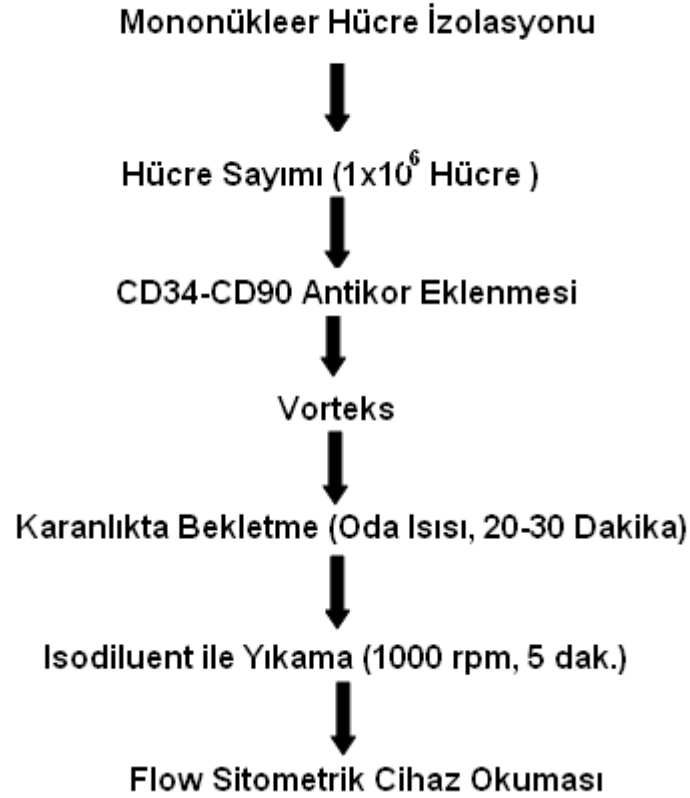
Tam Periferik Kan ile Flow Sitometrik Analiz Şeması**6.8.3 Kordon Kanı Mononükleer Hücrelerinin Flow Sitometrik Analizi**

Heparinli tüpler içinde laboratuvara getirilen kordon kanından, eritrosit liziz tamponu ve yoğunluk gradiyent ayırma yöntemleri ile mononükleer hücreler izole edildi. İzole edilen mononükleer hücrelerin Tripan Blue ile hücre sayımı yapıldı. Kordon kanı mezankimal kök hücrelerinin immünofenotiplendirilmesinde negatif kontrol olarak CD34-FITC, pozitif olarak ise CD90-PE immünofloresan antikorlar kullanıldı. Her bir antikordan 20'şer µl, Flow tüplerine (Bechman Coulter, ABD) eklendi. Sayımı yapılan mononükleer hücrelerden 1×10^6 hücre alınarak antikorların üzerine eklendi ve 1 dakika vortekslendi. Karanlık ortamda 20–30 dakika, oda ısısında antikorların yüzey antijenlerine bağlanması için beklenir. Bekleme sonunda mononükleer hücrelerin üzerine 500 µl isodiluent eklenerek, 5 dakika 1000rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra tüplere 500 µl isodiluent eklenerek Flow Cytometer (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta, USA) cihazında analiz edildi (Çizelge

6. 4).

Çizelge 6. 4 Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması

Kordon Kanı Mononükleer Hücrelerinin Flow Sitometrik Analiz Şeması



6.8.4 Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Flow Sitometrik Analizi

Kordon kanından izole edilen mononükleer hücreler düşük ve yüksek glukoz DMEM besiyerinde %5CO₂, 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan 7 gün sonra flask yüzeyine tutunan hücreler tripsinize edildi. Tripsinasyon ile ayrılan hücrelerin Tripan Blue ile hücre sayımı yapıldı. Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotiplendirilmesinde negatif kontrol olarak CD34-FITC, pozitif olarak ise CD90-PE immünofloresan antikorlar kullanıldı. Her bir antikordan 20’şer µl, Flow tüplerine (Bechman Coulter, ABD) eklendi. Sayımı yapılan hücrelerden 1 x 10⁶ hücre alınarak antikorların üzerine eklendi ve 1 dakika vortekslendi. Karanlık ortamda 20–30 dakika, oda ısısında antikorların yüzey antijenlerine bağlanması için beklendi. Bekleme sonunda hücrelerin üzerine 500 µl isodiluent eklenerek, 5

dakika 1000rpm’de santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra tüplere 500 µl isodiluent eklenerek Flow Sitometri (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta, USA) cihazında okutuldu (Çizelge 6. 5).

Çizelge 6. 5 Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültürünün Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması

Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Flow Sitometrik Analiz Şeması

Flask Yüzeyine Tutunan Hücrelerin Tripsinizasyonu

Hücre Sayımı (1×10^6 Hücre)

CD34-CD90 Antikor Eklenmesi

Vorteks

Karanlıkta Bekletme (Oda Isısı, 20-30 Dakika)

Isodiluent ile Yıkama (1000 rpm, 5 dak.)

Flow Sitometrik Cihaz Okuması

6.8.5 Periferik Kan Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Flow Sitometrik Analizi

Periferik kandan izole edilen mononükleer hücreler yüksek glukoz DMEM besiyerinde %5CO₂, 37°Cde inkübe edildi. İnkübasyondan 14 gün sonra flask yüzeyine tutunan hücreler tripsinize edildi. Tripsinasyon ile ayrılan hücrelerin Tripan Blue ile sayımı yapıldı. Periferik kan mezenkimal kök hücrelerinin immünofenotiplendirilmesinde negatif kontrol olarak CD34-FITC, pozitif olarak ise CD90-PE immünofloresan antikorlar kullanıldı. Her bir antikordan 20’şer µl, Flow tüplerine (Bechman Coulter, ABD) eklendi. Sayımı yapılan hücrelerden 1×10^6 hücre alınarak antikorların üzerine eklenir ve 1 dakika vortekslendi. Karanlık ortamda 20–30 dakika, oda ısısında antikorların yüzey antijenlerine bağlanması için beklendi. Bekleme sonunda hücrelerin üzerine 500 µl isodiluent eklenerek, 5 dakika 1000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra tüplere 500 µl isodiluent

eklenerek Flow Sitometre (Beckman Coulter, Cell Lab Quanta, USA) cihazında analiz edildi (Çizelge 6. 6).

Çizelge 6. 6 Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin kültürünün Flow sitometrik ölçüm için hazırlanması

Periferik Kan Mezenkimal Kök Hücre Kültürünün Flow Sitometrik Analiz Şeması

Flask Yüzeyine Tutunan Hücrelerin Tripsinizasyonu



Hücre Sayımı (1×10^6 Hücre)



CD34-CD90 Antikor Eklenmesi



Vorteks



Karanlıkta Bekletme (Oda Isısı, 20-30 Dakika)



Isodiluent ile Yıkama (1000 rpm, 5 dak.)



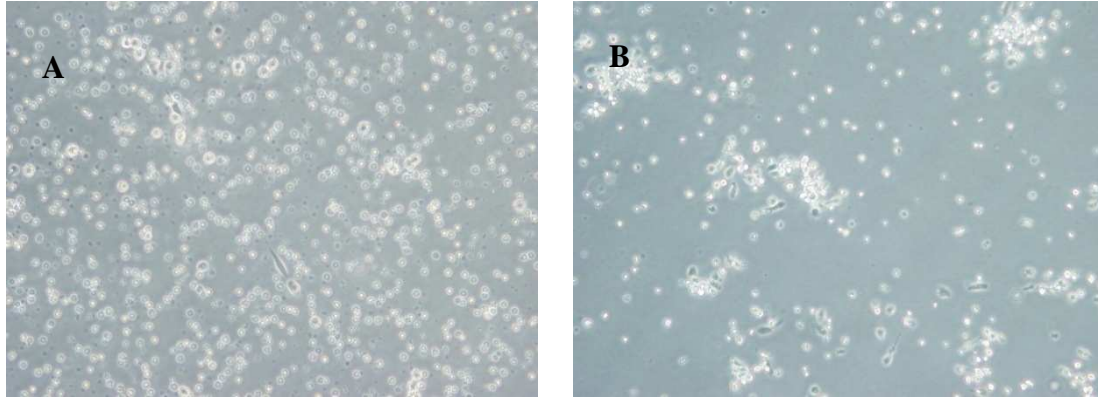
Flow Sitometrik Cihaz Okuması

7. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda 15 donörden sezaryen ile doğum sonrası insan kordon veninden enjektör ile alınan kordon kanı ve 30 donörden alınan periferik kanlar kullanıldı.

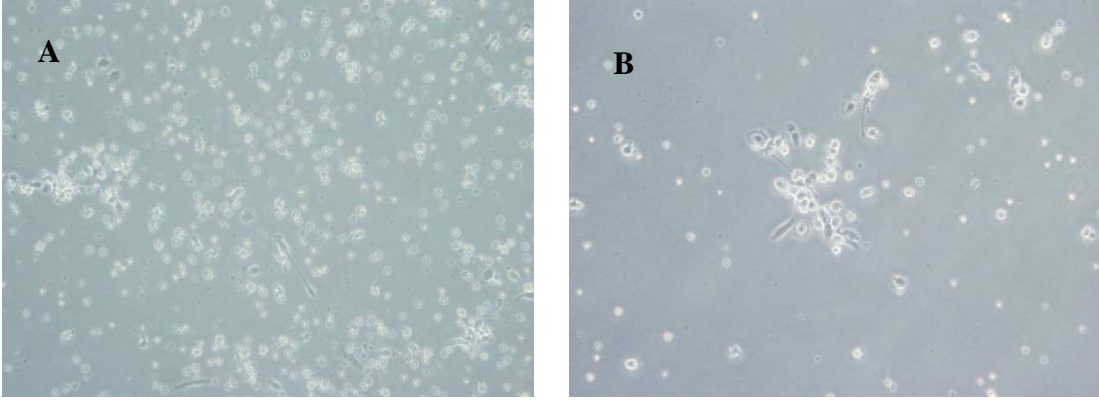
7.1 Kordon Kanından Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürünün yapılması Donör 1:

Sezaryen ile doğum sonrası kordon veninden 20 ml kan alındı. Heparin miktarının az olması sebebiyle laboratuvara getirilen kanın kısmen pıhtılaştığı görüldü. Koagüle olmuş insan göbek kordon kanı örneği bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Tüpler dikkatlice santrifüje konuldu ve 20°C'da 2200 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda Ficoll ile plazma arasında kalan orta tabakada az miktarda mononükleer hücrenin olduğu görüldü. İzolasyon sonrası kültürün 72. saatinde flasklardaki yapışmayan hücreler ve besiyerleri uzaklaştırıldı. Flaskın yüzeyine tutunan hücrelerin çok az sayıda ve yuvarlak hücre formunda olduğu görüldü (Şekil 7. 1).



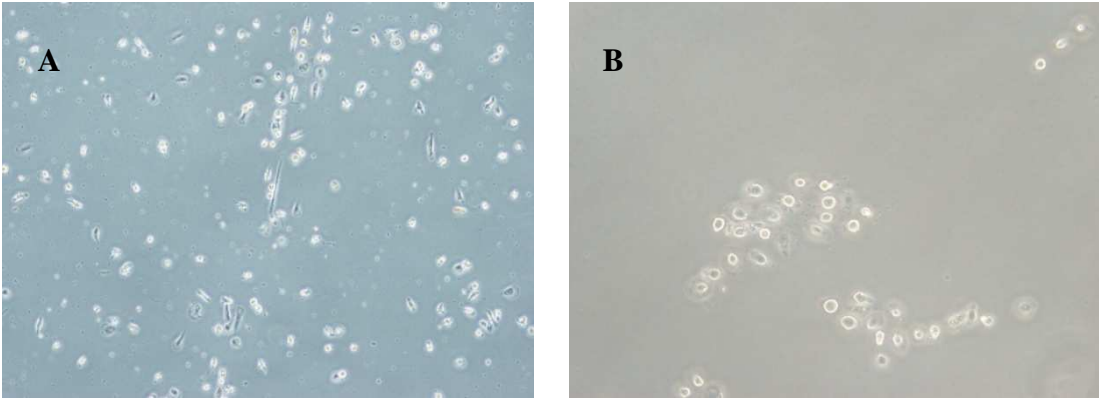
Şekil 7. 1 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (72. saat, 10x). A: DMEM+%15FBS, B: IMDM+%15FBS

Hücre yoğunluğu az olduğundan kültürdeki hücrelerin besiyerleri 48 saatte bir değiştirildi. Kültürün durumu her gün invert mikroskop altında incelendi. Besiyerlerinin hücre morfolojisine etkisi karşılaştırıldığında, DMEM besiyerinde kültürü devam eden fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücre sayısının, IMDM besiyerine göre daha fazla sayıda olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 2).

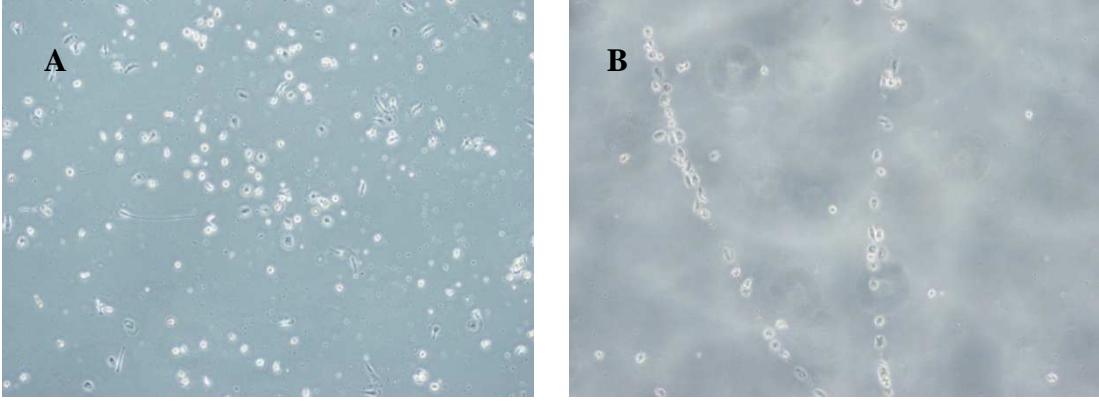


Şekil 7. 2 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (96. Saat, 10x). A: DMEM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

Kültürün ilerleyen günlerinde hücre sayısında artış, morfolojilerinde yuvarlaklaşma gözlemlendi (Şekil 7. 3; Şekil 7. 4)

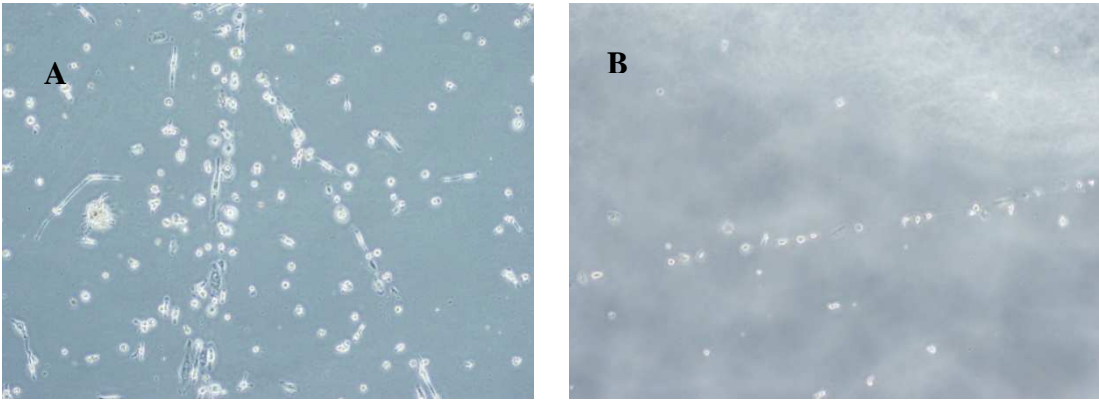


Şekil 7. 3 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (9. gün, 20x). A: DMEM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler



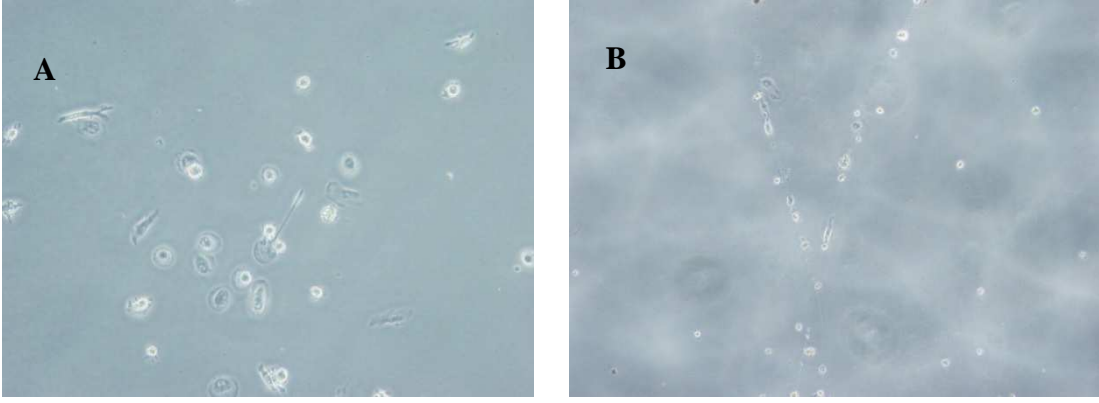
Şekil 7. 4 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (10. gün, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

İzolasyon sonrası kültürü yapılan hücrelerin 10. günden sonra sayılarında azalma görüldü. Besiyerlerine göre karşılaştırıldığında DMEM besiyerinde kültürü yapılan hücrelerin sayısının IMDM besiyerindeki hücrelerden daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 5).



Şekil 7. 5 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (12. gün, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

Kültürün 15. gününde, her iki besiyerinde bulunan hücre sayılarının azaldığı ve yüzeye tutunma özelliklerini kaybetmeye başladıkları gözlemlendi.

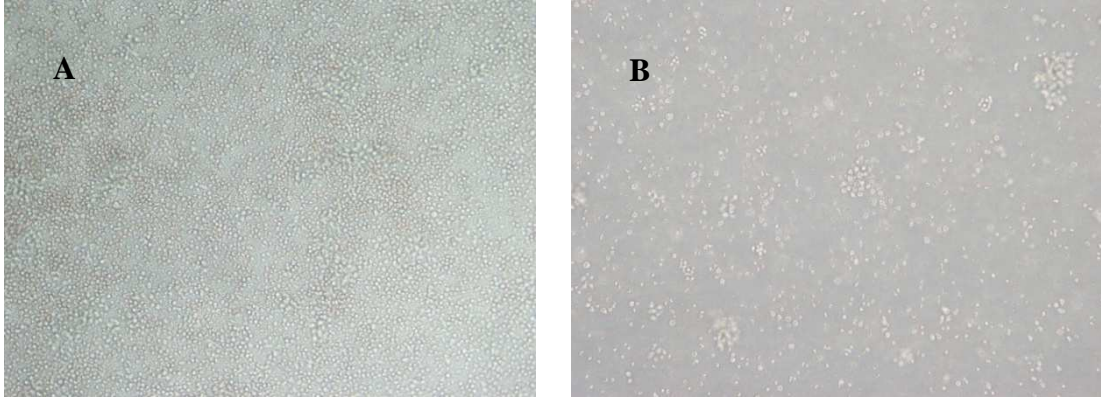


Şekil 7. 6 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (15. gün, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

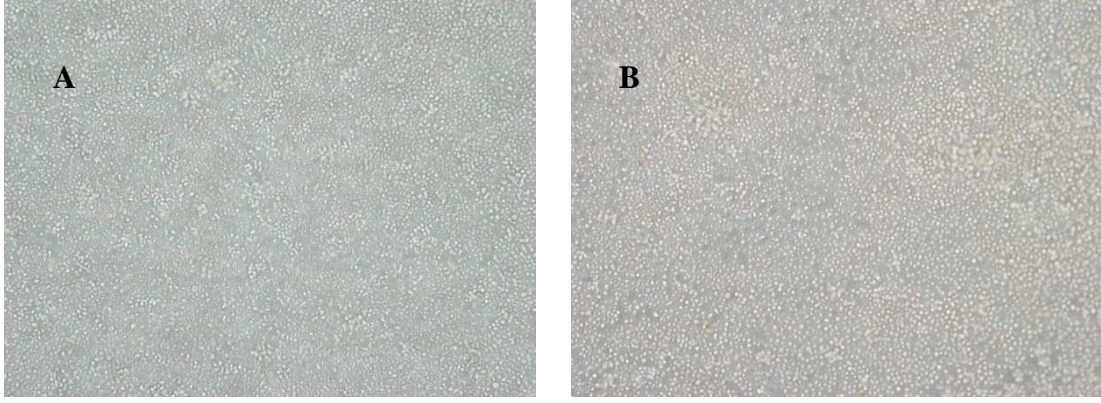
İzolasyondan sonra, kültürün 18. gününde sağlıklı hücre morfolojisine sahip hücre varlığına rastlanmadı. Donörden alınan 20 ml kordon kanı örneğinin heparin miktarının az olmasına bağlı olarak pıhtılaşmasına bağlı olarak izolasyonu yapılacak mononükleer hücrelerin zarar görmesinden dolayı uzun süreli kültürü sağlanamadığı düşünüldü.

Donör 2

Sezaryen ile doğum sonrası kordon veninden steril enjektör içinde 40 ml kan alınarak 2 saat içinde laboratuvara getirildi. İnsan göbek kordon kanı örneği, bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin izolasyonu için önceki örneklerden daha yüksek olan 2500 rpm santrifüj hızı uygulandı. Santrifüj sonunda Ficoll ile plazma arasında kalan orta tabakada sis bulutu görüntüsünde mononükleer hücrelerin oluştuğu görüldü. Süspanse edilen hücre pelletinin hacminin yarısı %15 Hyclone FBS, 2 mM Glutamax ve 1x AntiAnti içeren DMEM diğer yarısı ise %15 Hyclone FBS, 2 mM Glutamax ve 1x AntiAnti içeren IMDM besiyerleri ile kültüre alındı. Flasklar invert faz kontrast mikroskobu altında günlük incelendi. Hücrelerin tutunabilmesi için 96 saat boyunca besiyeri değiştirilmedi. Ortamda çok sayıda tutunmayan hücre ve Ficoll kalıntısı kaldığından flaskların içindeki hücrelerin net görüntüleri elde edilemedi (Şekil 7. 7, 7. 8)

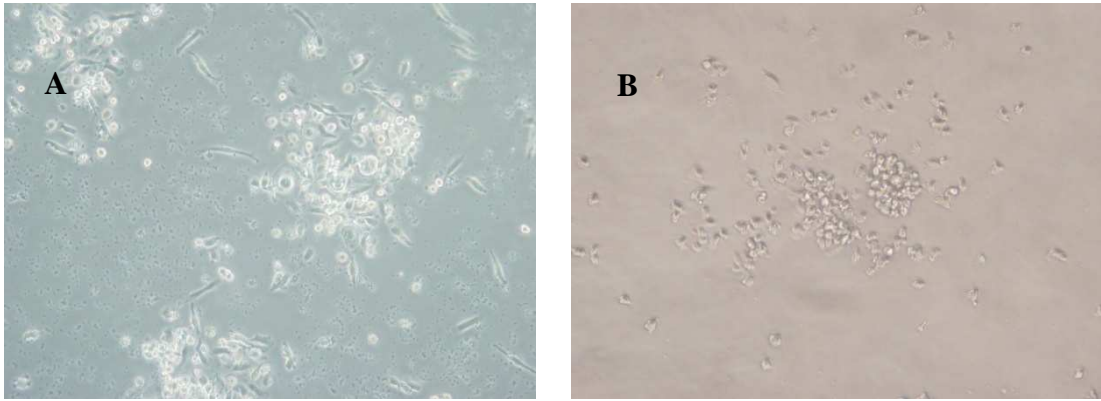


Şekil 7. 7 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (24. saat, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler



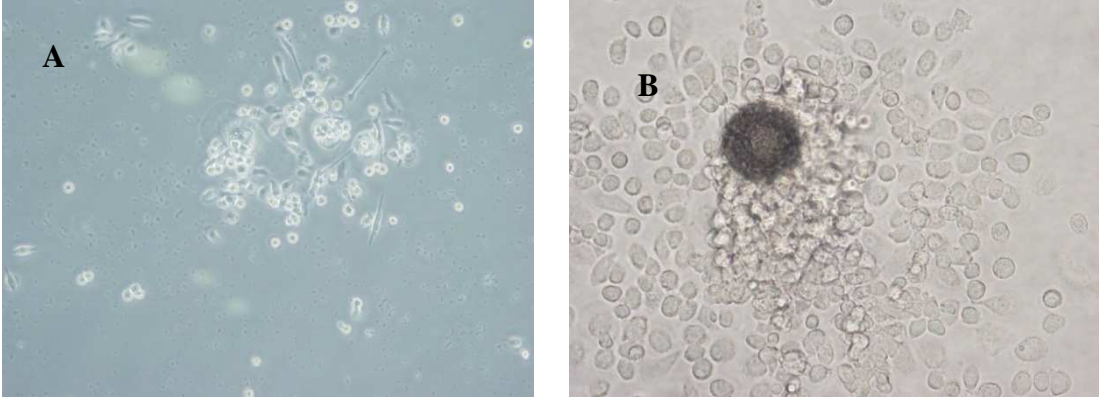
Şekil 7. 8 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (48. Saat 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

İzolasyonun 96. saatinde flask yüzeyine tutunmayan hücreler, besiyeri değiştirilerek uzaklaştırıldı. Tutunan hücrelerin bir kısmının küçük fibroblast benzeri, bir kısmının ise yuvarlak hücre formunda olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 9).



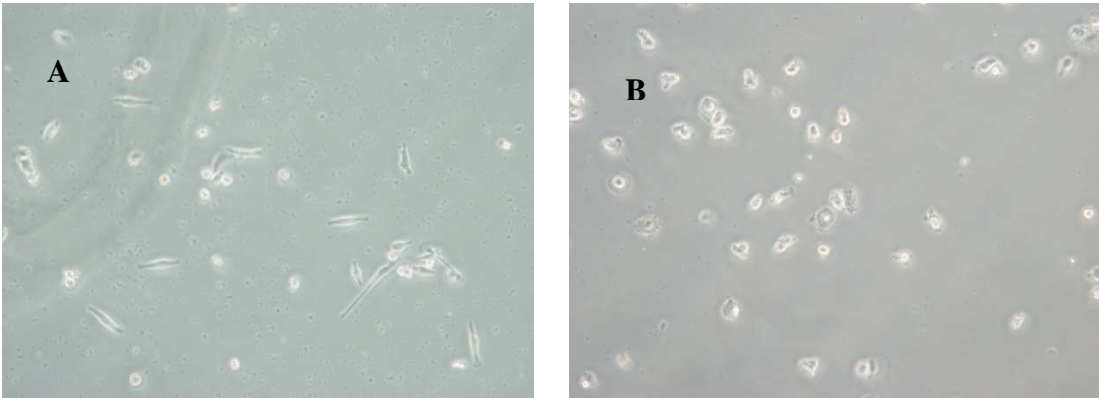
Şekil 7. 9 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (96. saat, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

İzolasyondan sonra kültürün 6. gününde DMEM besiyerinde fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücre sayısının, IMDM besiyerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

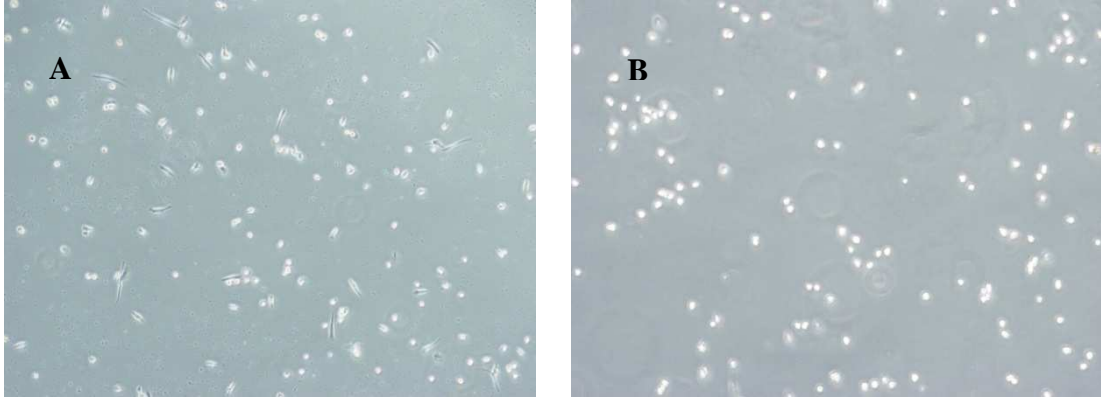


Şekil 7. 10 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (6. gün, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

Kültürün 7. ve 8. gününde DMEM besiyeri içindeki fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücre sayısının arttığı gözlemlendi. IMDM besiyerinde ise fibroblast benzeri morfolojiye sahip az sayıda hücre görüldü (Şekil 7. 11, 6. 12).

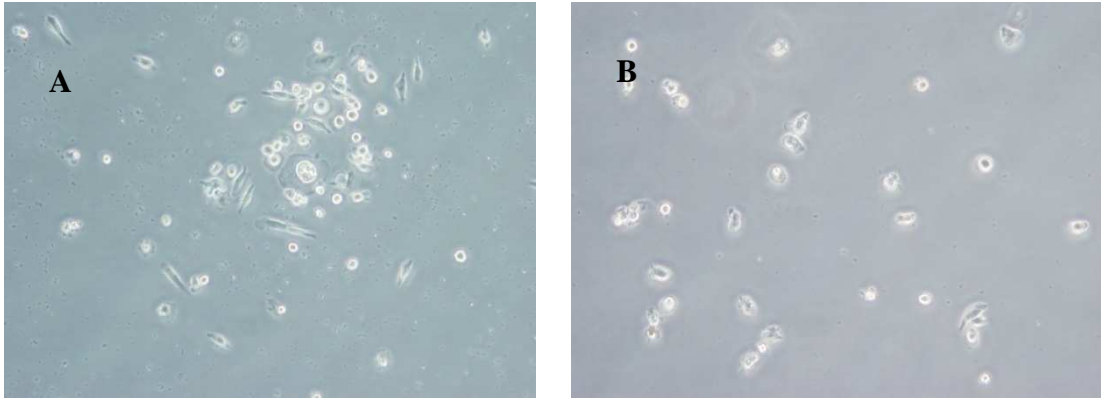


Şekil 7. 11 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (7. gün, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler



Şekil 7. 12 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (8.Gün10x).A: DMEM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

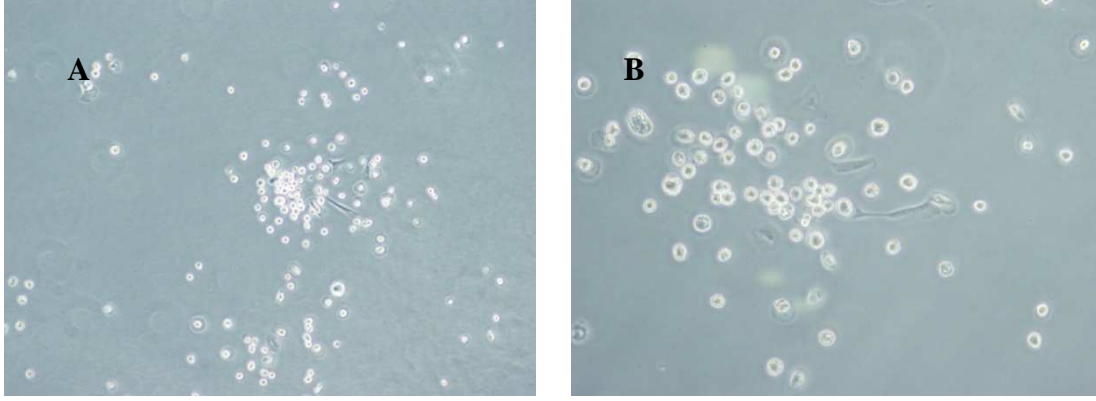
Kültürün 9. gününde IMDM besiyerinde ise fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin varlığına rastlanmadı (Şekil 7. 13).



Şekil 7. 13 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (9. Gün, 20x).A: DMEM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

Kültürün 14. gününde tutunan hücreler pasaj yapılmak üzere Tripsin-EDTA ile muamele edildi ancak flask yüzeyinden tüm hücrelerin ayrılması sağlanamadı. Flask yüzeyinden ayrılabilen hücreler 25 cm²'lik flaska ekildi. Flask yüzeyinden ayrılmayan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklendi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. 24 saat sonra Hyaluronidaz enzimi ile hücreleri flask yüzeyinden ayırma işlemi tekrar denendi ancak yine hücrelerin ayrılması sağlanamadı. Flask yüzeyinden ayrılan hücreler tekrar yeni flaska ekilerek kültüre devam edildi. Tripsinizasyon ile ayrılıp pasajı yapılan hücrelerin olduğu flasklarda 3-4 gün sonra

sağlıklı morfolojiye sahip hücre varlığına rastlanmadı. Tripsinizasyon ile ayrılmayan ve üzerine tekrar taze DMEM besiyeri eklenen hücrelerin bulunduğu flasklarda 17. günde fibroblast benzeri hücre sayısının azaldığı gözlemlendi (Şekil 7. 14).



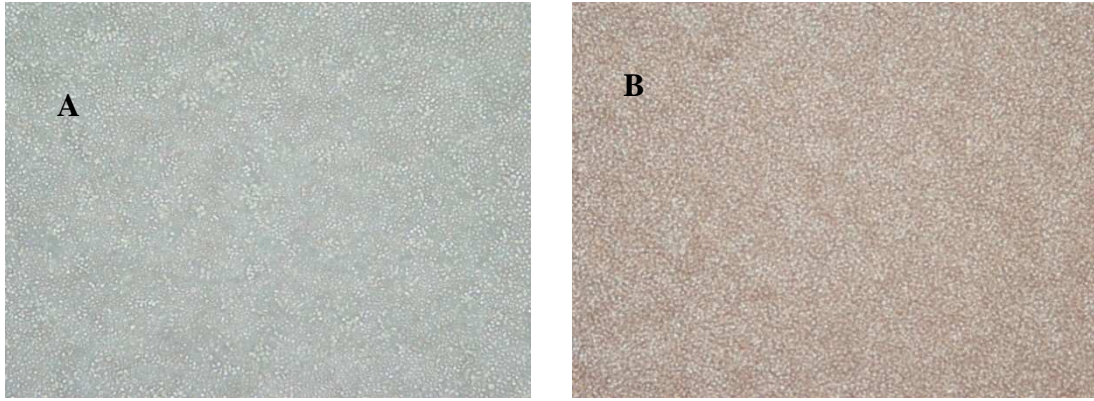
Şekil 7. 14 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin DMEM+ %15 FBS besiyerindeki mikroskopik görünümü, 17. gün (A: 10x, (B: 20x).

Kültürün 21. gününde DMEM besiyerinde kültürü devam eden flasklarda sağlıklı hücre morfolojisine sahip, adezyon gösteren hücre varlığına rastlanmadı.

Kordon kanı mononükleer hücrelerinin izolasyonundan sonra, literatürde ilk kültür fazı için 96 saatlik hücrelerin tutunma süresi önerilmektedir. Ancak kültür ortamındaki yüksek serum konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin uzunluğu, kültür ortamında mezenkimal kök hücrelerin dışında diğer mononükleer hücrelerin de tutunmasına neden olmaktadır. Böylece homojen bir hücre popülasyonu elde edilememektedir. Ayrıca uzun süreli kültürü sağlanamayan mononükleer hücrelerin kültür ortamından uzaklaştırılması için yapılan pasajlar sırasında hücrelerin tripsin ile flask yüzeyinden ayrılmalarının mümkün olamamasından dolayı hücreler tripsine uzun süre maruz kaldı. Tripsinin hücreler üzerine bilinen toksik etkisinin de bu uzun süreli inkübasyon sebebiyle kültür ortamında hücrelerin gelişimini etkilemesine bağlı olarak ve kültürün devamlılığının sağlanamamasına neden olabilir.

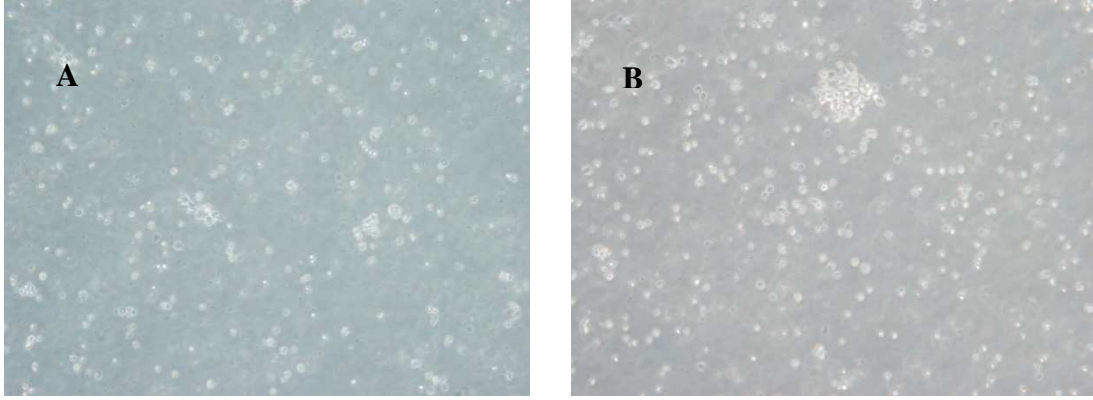
Donör 3

Sezaryen ile doğum sonrası kordon veninden steril enjektör içinde 48 ml kan alındı ve 2 saat içinde laboratuvara getirildi. İnsan göbek kordon kanı örneği, bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin izolasyonu için 20°C'da 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Ficoll ile plazma arasında oluşan, mononükleer hücrelerin bulunduğu sis tabakasının yoğunluğunun oldukça az olduğu görüldü. Toplam kordon kanından ayrılan mononükleer hücrelerin 2 ayrı besiyerinde kültürü yapıldı. Besiyerleri ayrı ayrı %15 Hyclone FBS, 2 mM Glutamax ve 1x AntiAnti içerecek şekilde hazırlanan DMEM ve IMDM besiyeri kullanılarak hazırlandı. Flasklar invert faz kontrast mikroskobu altında günlük olarak incelendi. Kültür ortamında çok sayıda adezyon göstermeyen hücre ve Ficoll kalıntısı kaldığından hücrelerin net görüntüleri elde edilemedi (Şekil 7. 14)



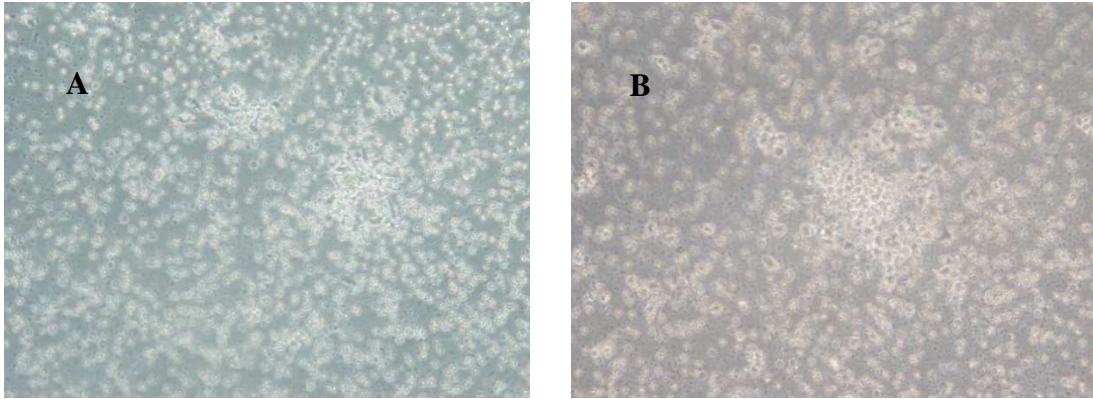
Şekil 7. 15 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (24.saat, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

İzolasyonun ardından kültüre alınan hücrelerin 48. saatinde adezyon göstermeyen hücre ve besiyerleri uzaklaştırıldı. Her iki besiyeri bulunan ortamda da fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin sayısının oldukça az olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 16).



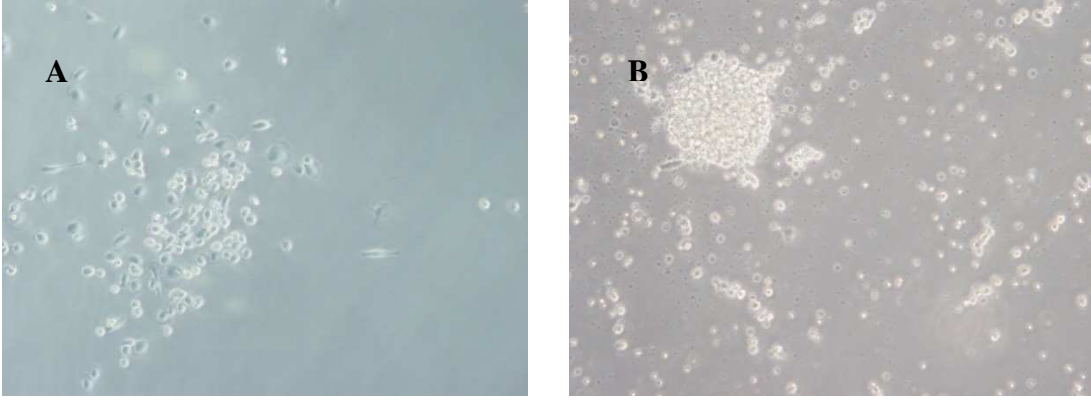
Şekil 7. 16 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (48.saat, 10x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

İzolasyonun ardından devam eden kültürün 5. gününde hücrelerin proliferasyonuna gözlendi. Hücrelerin besiyerleri günlük olarak değiştirildi (Şekil 7. 17).



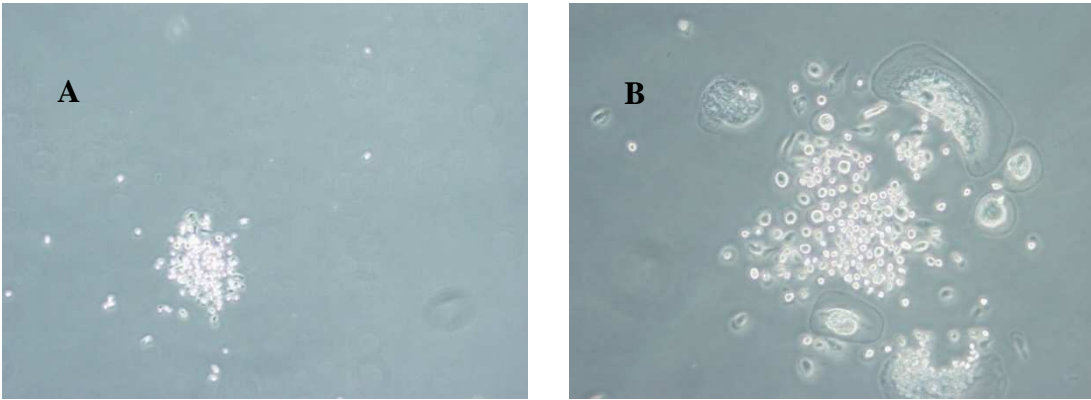
Şekil 7. 17 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskopik görünümü (5. Gün, 20x). A: DMEM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

Besiyerlerinin günlük olarak değiştirilmesiyle flask yüzeyine tutunmayan hücreler kültür ortamından uzaklaştırıldı, böylece invert faz kontrast mikroskobu altında daha homojen bir hücre görüntüsü elde edilebildi. 2 farklı besiyerinde kültürü devam eden hücrelerin morfolojileri karşılaştırıldığında, fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin DMEM besiyerinde, IMDM içeren besiyerine göre daha fazla sayıda olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 18).



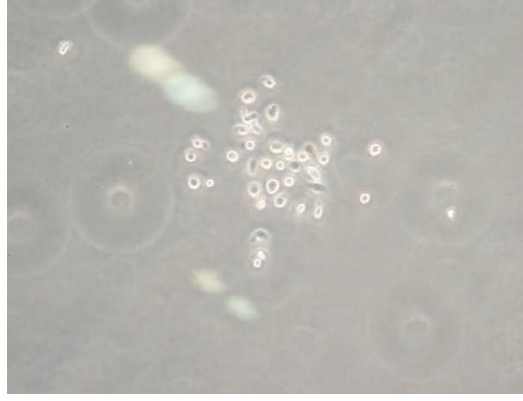
Şekil 7. 18 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü (6. gün, 20x). A: DMEM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

İzolasyondan sonra kültürün 7. gününde DMEM besiyerinde hücrelerin, yuvarlak hücre formunda olduğu ve mezenkimal kök hücrelerin de özelliği olan koloni görüntüsüne sahip hücre kümeleri oluşturdukları gözlemlendi (Şekil 7. 19).



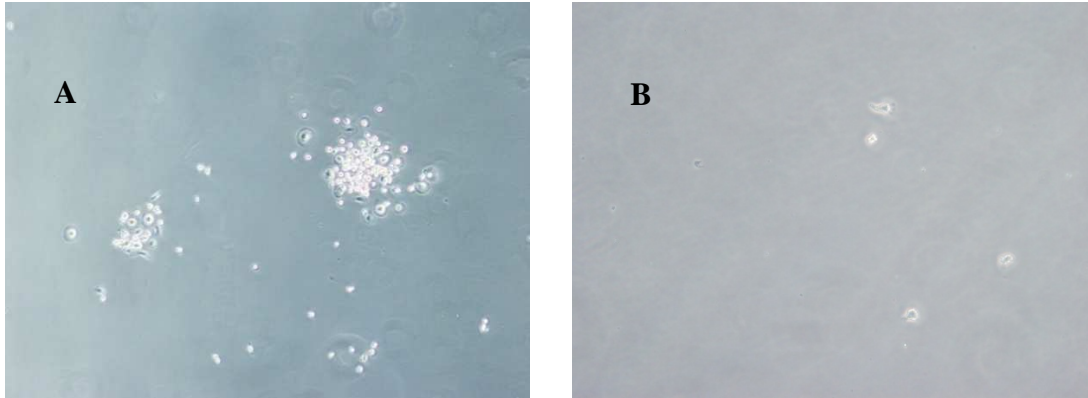
Şekil 7. 19 İnsan kordon kanı mononükleer hücrelerinin farklı besiyerlerindeki mikroskobik görünümü, DMEM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler (7. gün, A: 10x, B: 20x).

İzolasyondan sonra kültürün 7. gününde IMDM besiyerinde, hücrelerin yuvarlak hücre formunda olduğu ve koloni formunda hücre kümeleri oluşturdukları gözlemlendi (Şekil 7. 20).



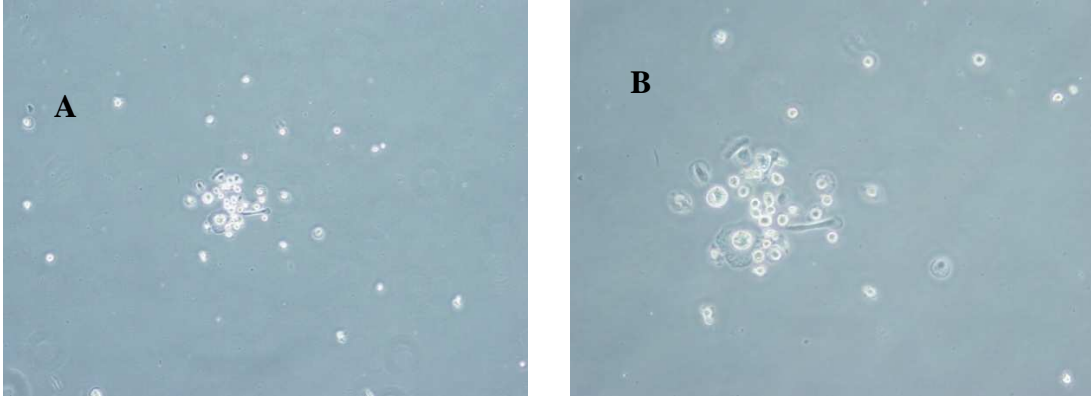
Şekil 7. 20 İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. IMDM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler (7. gün, 20x).

İzolasyondan sonra devam eden kültürün 8. gününde IMDM besiyerinde kültürü yapılan hücrelerin sayısında azalma olduğu gözlemlendi. DMEM besiyerinde kültürü yapılan hücrelerin ise yuvarlak hücre morfolojisine sahip oldukları ve küme formlarını koruyarak canlılıklarını devam ettirdikleri gözlemlendi (Şekil 7. 21).



Şekil 7. 21 İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. (8. gün, 10x). A: DMEM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: IMDM+% 15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler

İzolasyondan sonra devam eden mononükleer hücrelerin kültürününün 10. gününde IMDM besiyeri ile kültürü yapılan hücrelerin sağlıklı hücre morfolojisine sahip olmadıkları gözlemlendi. DMEM besiyeri ile kültürü yapılan hücrelerin çoğunun yuvarlak hücre morfolojisine sahip olduğu ancak mezenkimal kök hücrelerin morfolojik özelliği olan fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin de varlığı görüldü (Şekil 7. 22).



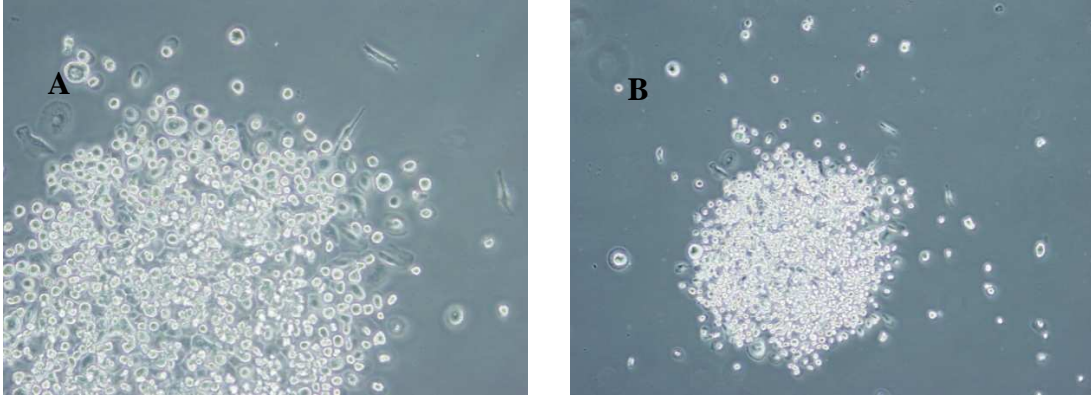
Şekil 7. 22 İnsan kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. DMEM +%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler (10. gün, A: 10x, B: 20x).

DMEM içeren besiyerinde kültürü yapılan kordon kanı mononükleer hücrelerin bulunduğu kültür ortamında 2. hafta sonunda kültürü devam eden flaskların içinde fibroblast benzeri hücre varlığına rastlanmadı. Kültürün besiyeri günlük olarak değiştirilmeye devam etti. Kültürün 33. gününde kültürdeki hücrelerin çoğaldıkları görüldü (Şekil 7. 23).



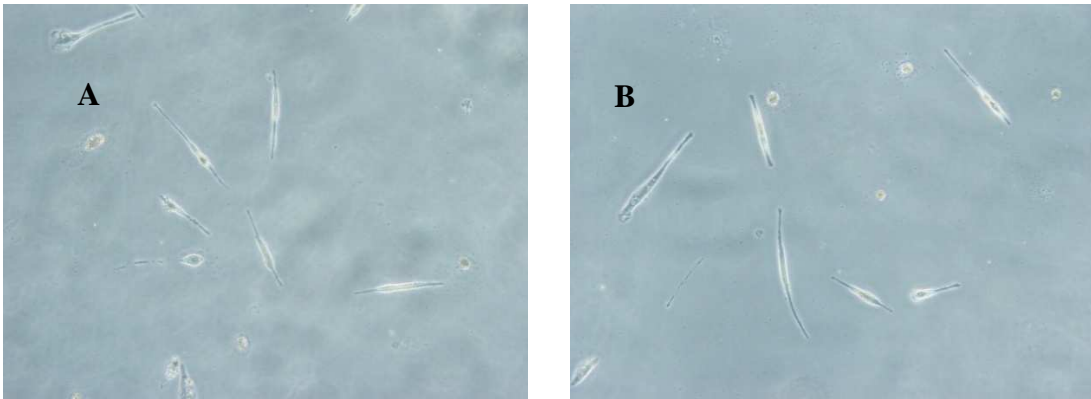
Şekil 7. 23 İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. DMEM +%15FBS besiyerinde kültüre edilen mononükleer hücreler (30. gün; 20x).

Hücrelerin besiyerleri günlük olarak değiştirildi ve hücreler invert faz kontrast mikroskobu altında gözlemlendi. DMEM besiyeri ile kültürü devam ettirilen hücrelerin proliferasyonunda gözlemlendi (Şekil 7. 24).



Şekil 7. 24 İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM +% 15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. (36. gün, A: 10x, B: 20x).

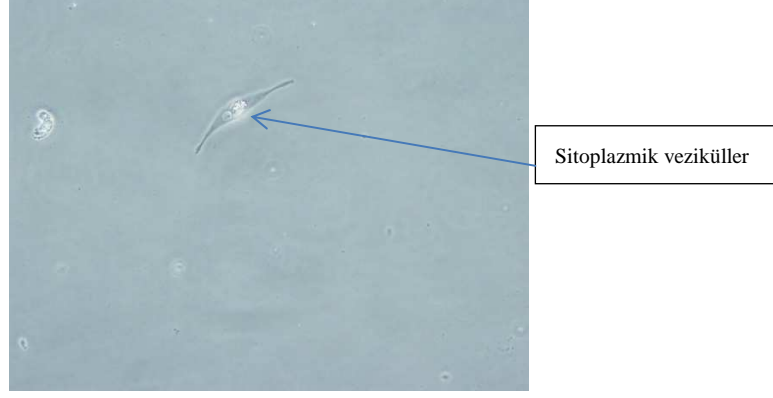
Yaklaşık %50 yüzey kaplaması yapan hücreler %0,25 EDTA'lı tripsin ile flask yüzeyinden ayrılarak pasajlandı. Pasaj sonrası 4 hafta boyunca 48 saatte bir hücrelerin besiyeri değiştirildi, 4 hafta sonunda kültürde fibroblast benzeri hücrelerin oluştuğu görüldü (Şekil 7. 25).



Şekil 7. 25 İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. DMEM+% 15FBS besiyerinde devam ettirilen kültür. (68. gün, 20x).

Fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin 69. günde sağlıklı hücre görüntüsünü kaybetmeye başladığı gözlemlendi. Kültürde fibroblast morfolojisine sahip çok az sayıda hücre bulunduğu için, bu hücrelerin uzun süre pasajı yapılmadı. 69. günde hücreler tripsin ile muamele edilerek pasajlandı. Pasaj sonrası yeni ekilen flask içinde oldukça az sayıda hücre

varlığı gözlemlendi. Zamanla DMEM+%15FBS besiyerinde devam ettirilen kültürde bulunan az sayıda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında veziküllü yapı oluşumları gözlemlendi (Şekil 7. 26).

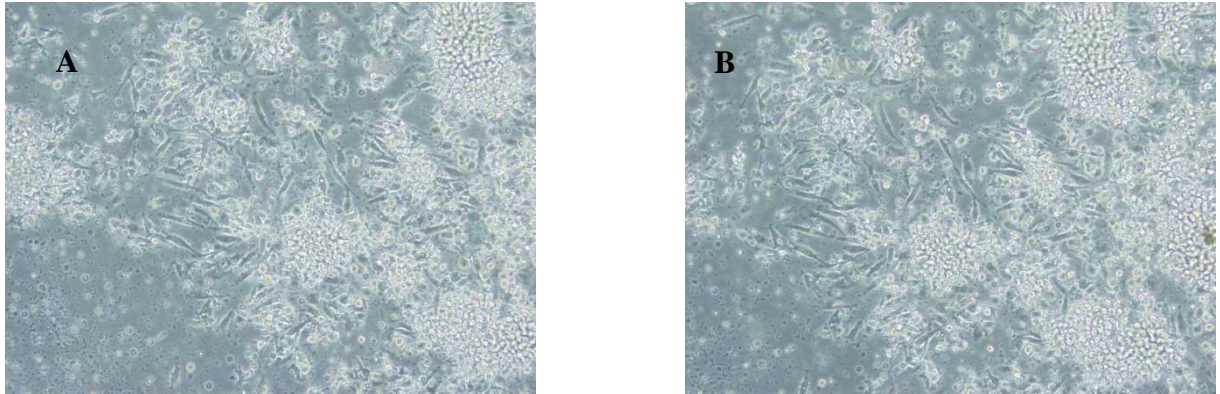


Şekil 7. 26 İnsan kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. DMEM+%15FBS besiyerinde devam ettirilen kültür (72. gün, 20x).

DMEM +%15 FBS içeren besiyerinde kültürü devam eden hücrelerin sitoplazmalarında oluşan veziküllerin sayısının arttığı gözlemlendi. Bir süre sonra flask içinde sağlıklı hücre morfolojisine sahip hücre varlığına rastlanmadı. Vezikül oluşumunun nedeninin, uzun süre pasajlanmadan kültürü yapılan az sayıdaki hücrelerin pasaj sırasında tripsinden zarar görmüş olabileceği düşünüldü. Kordon kanından 2 farklı besiyeri kullanılarak izole edilen ve aynı besiyerleri ile kültürü devam ettirilen mononükleer hücrelerin kültüründe kullanılan DMEM ve IMDM besiyerleri karşılaştırıldığında, mezenkimal kök hücrelerin de morfolojik özelliği olan fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin, DMEM besiyerinde IMDM besiyerine göre daha fazla yüzey kaplaması yaptıkları görüldü. Ayrıca, DMEM besiyerinde bulunan kültür ortamında proliferasyon edilecek hücrelerin daha uzun süre adezyon özelliklerini koruması, literatürde önerilen mezenkimal kök hücreler için DMEM besiyerinin kullanılmasının daha iyi sonuç verdiği bulgularını desteklemektedir.

Donör 4:

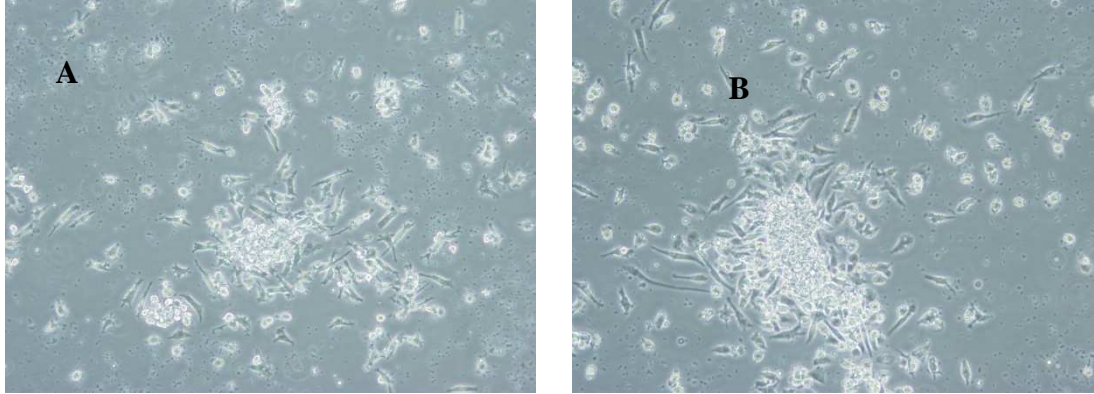
Sezaryen ile doğum sonrası kordon veninden alınan 25 ml kordon kanı 2 saat içinde laboratuvara getirildi ve bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin izolasyonu için 20°C'da 30 dakika yapılacak olan santrifüjün hızı 900xg olarak ayarlandı. Santrifüj sonunda filcoll ile plazma arasında yaklaşık 1 ml hacimde, mononükleer hücrelerin bulunduğu sis bulutu tabakası gözlemlendi. Mononükleer hücrelerin bulunduğu hücre pelleti, üzerine 1x AntiAnti içeren DMEM eklenerek 20°C'da 300g'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Elde edilen mononükleer hücre pelleti %15 Hyclone FBS, 2 mM Glutamax ve 1x AntiAnti içeren DMEM besiyerinde resüspanse edildi. Hücreler 2 fasklı marka flask içinde kültürü yapılmak üzere Falcon ve TPP marka flasklar içinde kültüre alındı. Total kan miktarı yüksek olmadığından, hücre kaybı olmaması için mononükleer hücreler 96 saat inkübe edildi. İzolasyonun ardından yapılan kültürün 96. saatinde, her iki marka flasklardaki besiyerleri ve flask yüzeyine tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı. İki farklı marka flaskta da flask yüzeyine adere olmuş fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücre varlığı görüldü (Şekil 7. 27)



Şekil 7. 27 İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (96. Saat, 20x). A: Falcon Marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: TPP Marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler

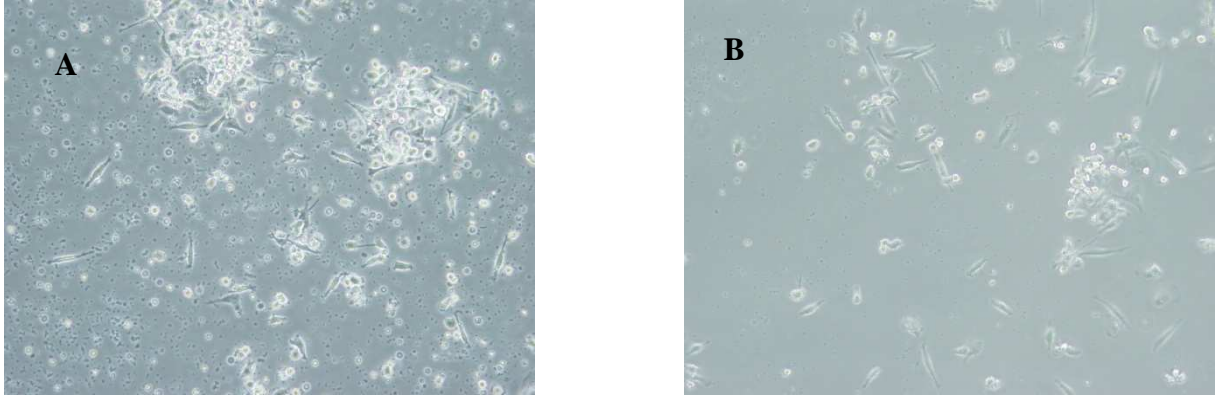
Her iki marka flask içinde kültürü devam ettirilen hücrelerin besiyerleri 24 saatte bir değiştirildi. Her iki marka flask içinde kültürü devam ettirilen hücrelerin morfolojileri invert

faz kontrast mikroskopunda günlük olarak incelendi. Mononükleer hücrelerin kültürünün devam ettirildiği her iki marka flask içindeki hücrelerin de benzer morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 7. 28).



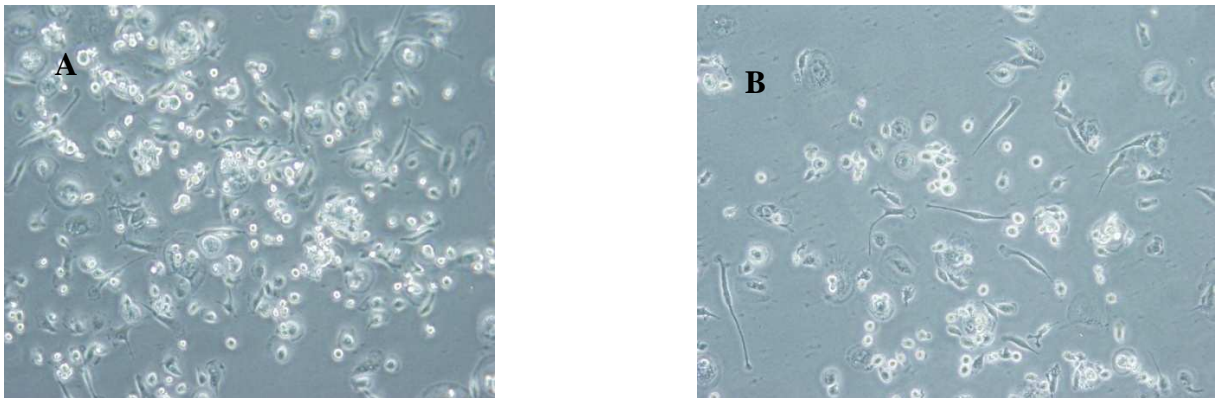
Şekil 7. 28 İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (5. gün, 20x). A: Falcon Marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: TPP Marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler

İzolasyondan sonra kültürde devam ettirilen mononükleer hücrelerin kültürünün 6. gününde her iki farklı marka flask yüzeyinde adezyon gösteren fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin flask içinde kapladıkları yüzey alanlarının azaldığı ve yuvarlak hücre morfolojisine sahip hücrelerin flask içinde kapladıkları yüzey alanlarının ise arttığı görüldü. İki farklı marka flask içinde kültürü devam eden hücrelerin hüsey kaplaması ve morfolojik özelliklerine göre karşılaştırıldığında, Falcon marka flask içinde yüzeye yapışma gösteren hücrelerin daha fazla sayıda olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 29).



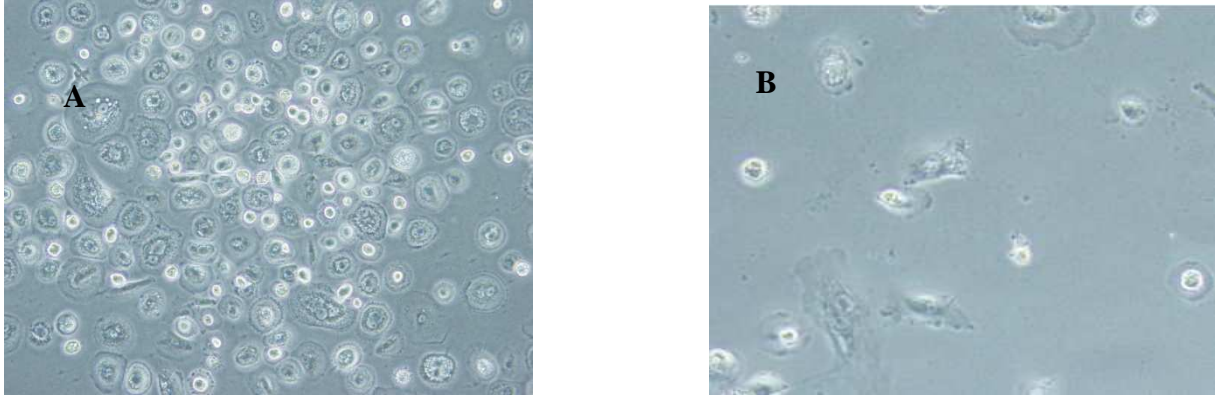
Şekil 7. 29 İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü (6. gün, 10x). A: Falcon Marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: TPP Marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler.

Fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin kültürünün devam ettirildiği her iki marka flasklardaki besiyerleri 48 saatte bir taze hazırlanmış besiyeri ile değiştirildi. İzolasyonu takiben kültürün 9. gününde fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin yüzeyi kapladığı alanlarda azalma gözlemlendi. Ancak Falcon marka Flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin flask içinde kapladıkları yüzey alanı TPP marka flask içinde devam eden kültürdeki yüzey alanından daha geniş olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 30).



Şekil 7. 30 İnsan kordon kanından izole edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskobikgörünümü (9. gün, 20x). A: Falcon marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: TPP Marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler.

Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültürünün 17. gününde mononükleer hücrelerin kültürünün yapıldığı her iki marka flask içinde de mezenkimal kök hücre morfolojisi olan fibroblast benzeri morfoloji gösteren hücre varlığına rastlanmadı (Şekil 7. 31).

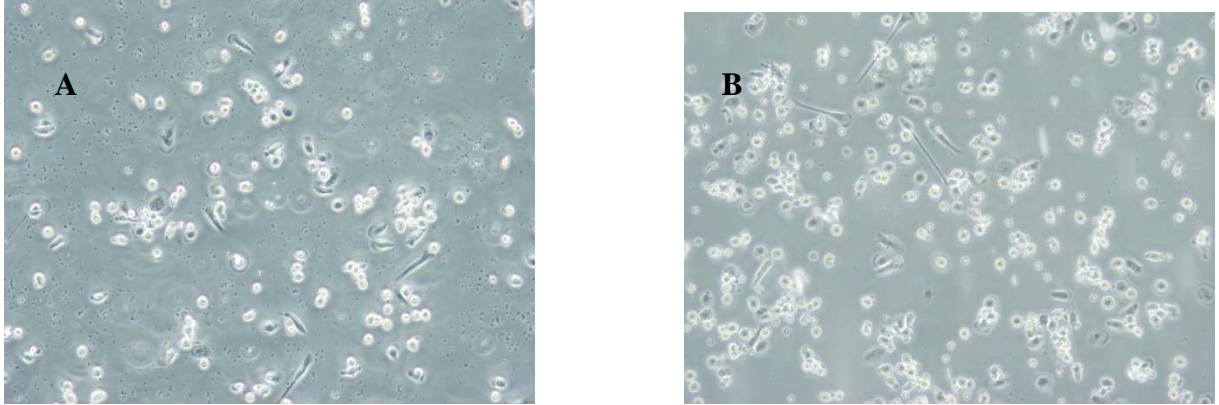


Şekil 7. 31 İnsan kordon kanından elde edilen ve DMEM+%15FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. (17. gün, 40x). A: Falcon marka flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler, B: TPP Marka Flask içinde kültüre edilen mononükleer hücreler

Kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültüründe, IMDM besiyerine göre daha uzun süre hücre sağlıklı morfolojiye sahip hücrelerin gelişebildiği DMEM besiyeri, hücre kültürü için ticari olarak satılan 2 farklı kültür flaskı kullanıldı. Kültürün ilk günlerinde yapılan morfolojik gözlem sonuçlarına göre hücrelerin yüzey kaplamaları arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Ancak kültürün ilerleyen günlerinde Falcon marka içinde kültürü devam ettirilen hücrelerin TPP marka flask içindeki hücrelerden daha geniş yüzey kaplaması yaptıkları gözlemlendi. Kültürün ilerleyen günlerinde yapılan pasajlarda Falcon marka flask içinde fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin varlığı gözlemlendi. TPP marka flaskta devam eden kültürde ise az sayıda yüzeye tutunan hücrelerin yuvarlak hücre morfolojisinde oldukları ve sağlıklı hücre morfolojilerini uzun süre devam ettiremedikleri gözlemlendi. Bu çalışma ile literatürde belirtilen Falcon marka flaskların MKH'lerin gelişimi için daha uygun olduğu sonucu desteklendi.

Donör 5:

Sezaryen sonrası kordon veninden steril enjektör ile 48 ml kan alınarak 2 saat için laboratuara getirildi ve bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin izolasyonu için santrifüj hızı 360xg, süresi 30 dakika olarak ayarlandı ve 20°C'da santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda Ficoll ile plazma arasında mononükleer hücrelerin bulunduğu sis bulutu tabakası gözlemlendi. Mononükleer hücrelerin bulunduğu faz toplanarak steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 1x AntiAnti içeren DMEM eklenerek 20°C'da 300g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen mononükleer hücre pelleti %15 Hyclone FBS, 2 mM Glutamax ve 1x AntiAnti içeren DMEM besiyerine ekilerek 2 farklı marka flask içinde kültürü yapıldı. İzolasyonun 96. saatinde her iki marka flasklardaki besiyerleri ve flask yüzeyine tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı. Tutunan hücreler içinde fibroblast benzeri morfoloji gösteren hücrelerin sayısının az olduğu görüldü (Şekil 7. 32)

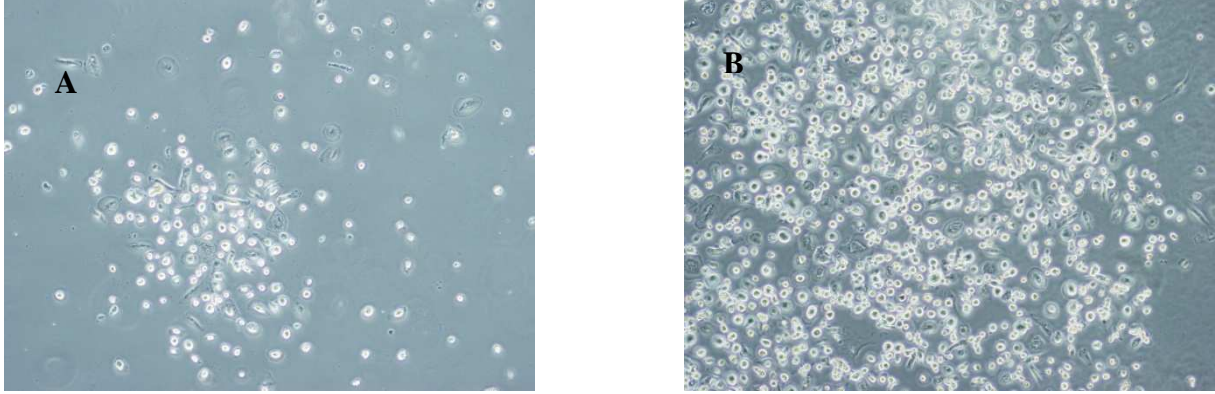


Şekil 7. 32 Kordon kanından elde edilen ve DMEM besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü. (96. saat, 20x). A: Falcon marka Flask, B: TPP Marka Flask

İzolasyonun 12. gününde tutunan hücrelerin olduğu flasklarda küre morfolojisi gösteren hücrelerin sayısında artış olduğu gözlemlendi.

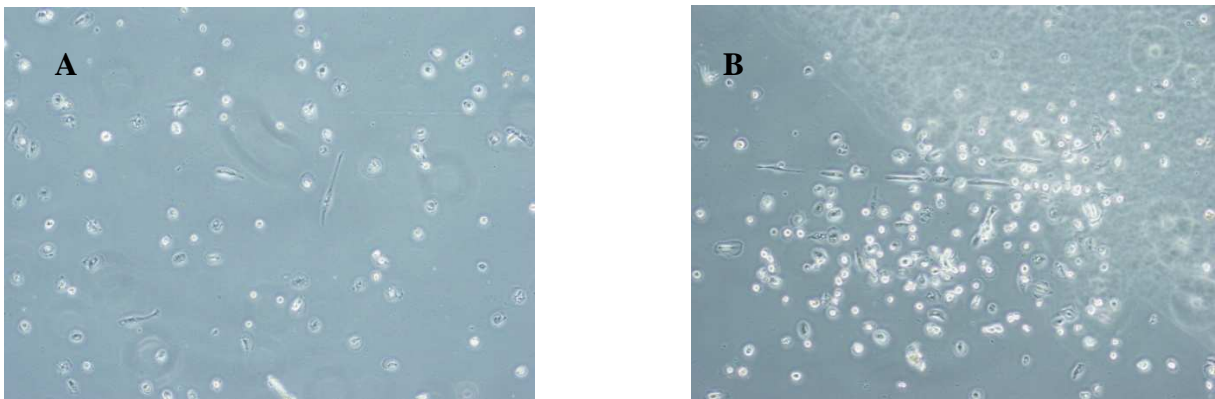
Hücreler Tripsin-EDTA ile 15 dakika muamele edilerek hücrelerin bir kısmı flask yüzeyinden kaldırıldı. Ayrılmayan hücrelerin üzerine taze hazırlanmış %15 Hyclone FBS, 2 mM Glutamax ve 1x AntiAnti içeren DMEM eklendi. Flaskların içindeki hücrelerin besiyerleri 24

saatte bir değiştirildi. Yüzey kaplaması %60' a ulaşan falkon flask içindeki hücreler haftada 1 kez pasajlandı. İkinci pasaj sonrasında TPP marka flask içinde kültürü devam eden hücrelerin yapılan hücrelerin fibroblast benzeri morfoloji gösteren hücre varlığına rastlanmadı.



Şekil 7. 33 Kordon kanından elde edilen ve DMEM besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (19. gün 20x). A: Falcon marka Flask, B: TPP Marka Flask

Toplam 4 pasaj yapılan hücrelerin besiyerleri 24 saatte bir değiştirildi. Hücrelerin durumu invert mikroskopta 24 saatte bir gözlemlendi. Hücrelerin sayısında azalma olduğu görüldü. Her iki marka flask içindeki canlı hücre morfolojisine sahip hücrelerin küre formunda oldukları gözlemlendi (Şekil 7. 34).



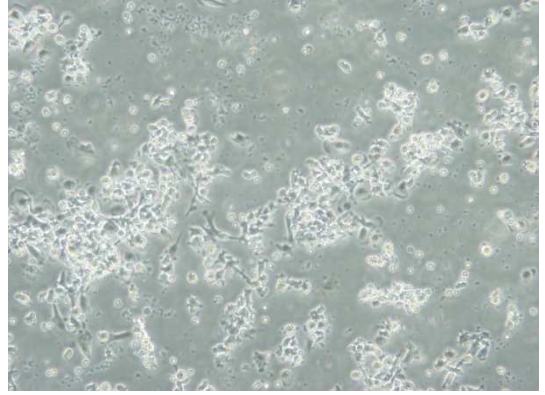
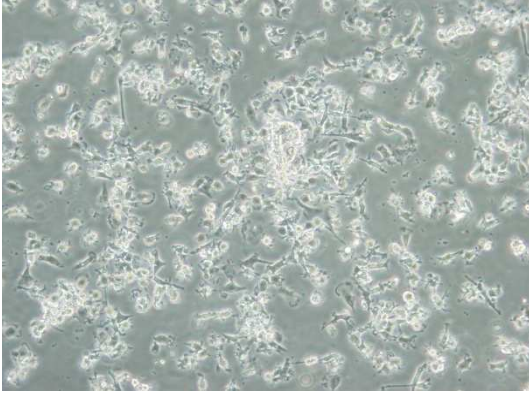
Şekil 7. 34 Kordon kanından elde edilen ve DMEM besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (25. Gün, 20x). A: Falcon marka Flask, B: TPP Marka Flask

İzolasyonun 35. gününde flaskların içinde sağlıklı hücre morfolojisine sahip hücreye rastlanmadı.

Kordon kanından mononükleer hücrelerin yoğunluk farkı ile izolasyonunda literatürde önerilen 300xg santrifüj hızı kullanılarak elde edilen mononükleer hücrelerin kültürü ticari olarak satılan 2 farklı marka kültür flaskı içinde yapıldı. Sonuçta, literatürde belirtilen ve yaptığımız önceki çalışmalarda da desteklenen Falcon marka flask içinde kültürü yapılan hücrelerin kültür ortamında daha uzun süre sağlıklı hücre morfolojilerini korudukları bilgisi bir kez daha desteklendi. Düşük santrifüj hızı ile tam kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin yüksek santrifüj ile elde edilenden daha fazla olması, kültür ortamına daha fazla sayı ve farklı türde tek çekirdekli hücre ekilmesi ile sonuçlandı. Bunun sonucu olarak da kültür ortamında yeterli sayıda ve homojen yapı ve morfolojiye sahip hücrelerin elde edilmesi için hücrelerin haftada 1 kez pasajı yapıldı. Ancak her pasaj sonrası mezenkimal kök hücrelerin morfolojik özelliklerine sahip fibroblast benzeri hücrelerin sayısında azalma görüldü. Zamanla her iki marka flask içinde kültürü devam ettirilen mononükleer hücrelerin içinde canlı hücre morfolojisine sahip hücre sayısı azaldı ve izolasyonun 35. gününde kültürde sağlıklı hücre morfolojisine sahip yüzeye tutunan hücre varlığına rastlanmadı. Yapılan bu çalışmaya göre literatürde önerilen yüksek santrifüj hızının, yine literatürde önerilen düşük santrifüj hızı ile kordon kanından mononükleer hücre izolasyonu ile yapılan ayırmaya göre homojen hücre popülasyonunun sağlanması açısından daha pozitif sonuç vereceğini gösterdi.

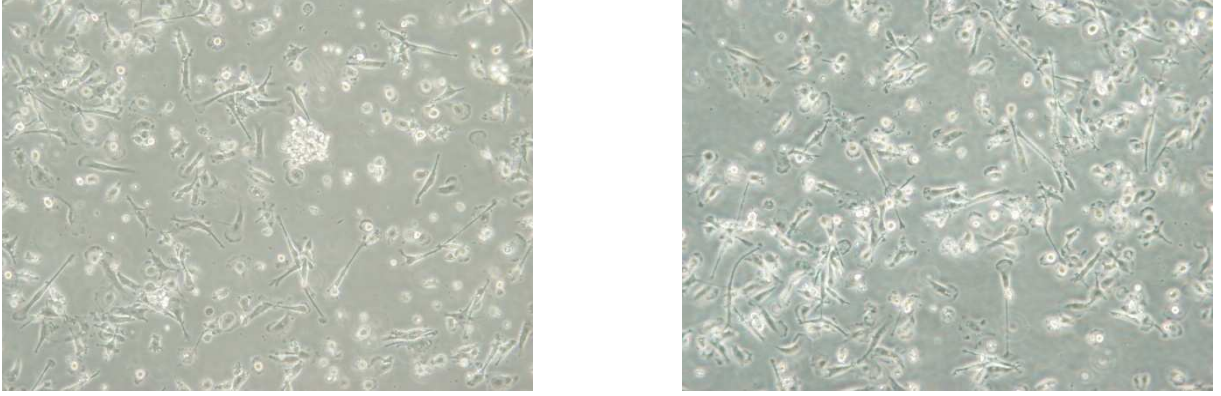
Donör 6

Sezaryen ile doğum sonrası kordon veninden alınan 28 ml kordon kanı, 2 saat içinde laboratuvara getirildi ve bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin izolasyonu içinsantrifüj hızı 900xg, santrifüj süresi 30 dakika olarak ayarlandı ve 20°C'da santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda filcoll ile plazma arasında mononükleer hücrelerin bulunduğu sis bulutu tabakası gözlemlendi. Mononükleer hücrelerin bulunduğu ara faz toplanarak steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücrelerin üzerine 1x AntiAnti içeren DMEM eklenerek 300xg'de 20°C'da 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Elde edilen mononükleer hücre pelleti %15 Hyclone FBS, 2 mM Glutamax ve 1x AntiAnti içeren DMEM besiyerin ekilerek Falcon marka flask içinde hücrelerin kültüre alındı. Tüm flasklar mikroskop altında incelendi. Flaskların kapakları gevşetilerek 37°C' da %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. İzolasyonun 5. gününde flasklardaki tutunmayan hücrelerin bulunduğu besiyerleri uzaklaştırıldı. Flasklardan sadece birinde tutunmuş fibroblast benzeri hücrelerin varlığı görüldü (Şekil 7. 35).



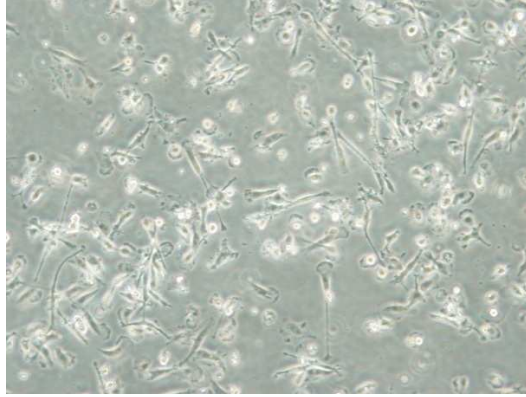
Şekil 7. 35 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (5. gün, 20x).

Her 24 saatte bir besiyerinin değiştirilmesi ile kültür ortamında tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı. Hücreler invert mikroskopta incelendi ve fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin varlığı görüldü (Şekil 7. 36).



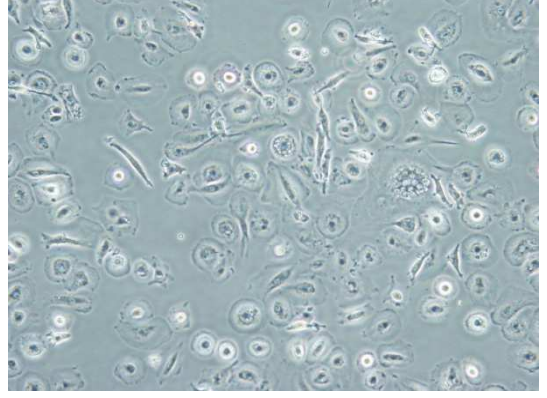
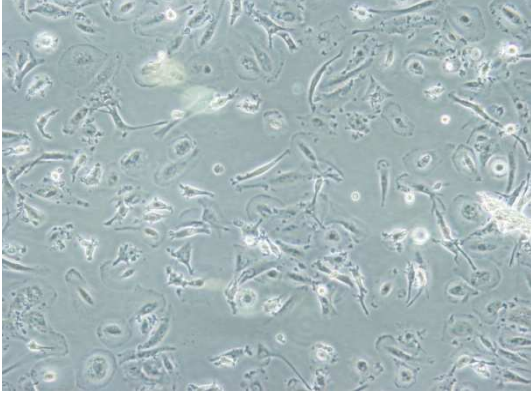
Şekil 7. 36 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (6. gün, 20x).

Fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin bulunduğu flaskın yüzeyine tutunan ve mezenkimal kök hücrelerin de sahip olduğu fibroblast benzeri morfoloji göstermeyen hücrelerin uzaklaştırılması için izolasyonun 7. gününde hücreler pasajlandı. Pasaj sonrası 24. saatte kültür ortamında fibroblast benzeri ve küre morfolojisinde hücreler gözlemlendi (Şekil 7. 37).



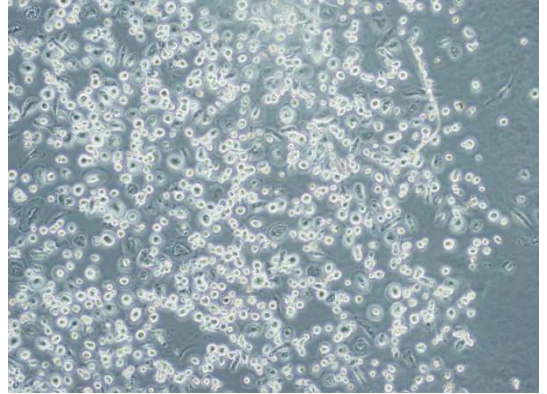
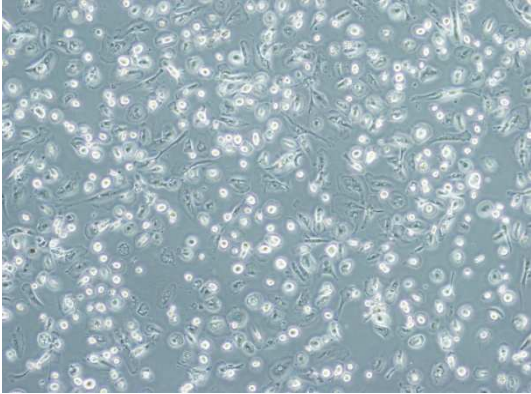
Şekil 7. 37 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (8. gün, 20x).

Hücrelerin haftada 1 kez pasajı yapıldı ve invert mikroskop altında incelendiğinde fibroblast benzeri hücrelerin morfolojilerinin değişmeye başladığı osteoklast benzeri hücre formuna dönüştükleri gözlemlendi (Şekil 7. 38).



Şekil 7. 38 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (11. gün, 20x).

Her 24 saatte bir besiyeri değiştirilen kültür ortamında, izolasyonun 31. gününde fibroblast benzeri morfoloji gösteren hücre varlığına rastlanmadı (Şekil 7. 39).

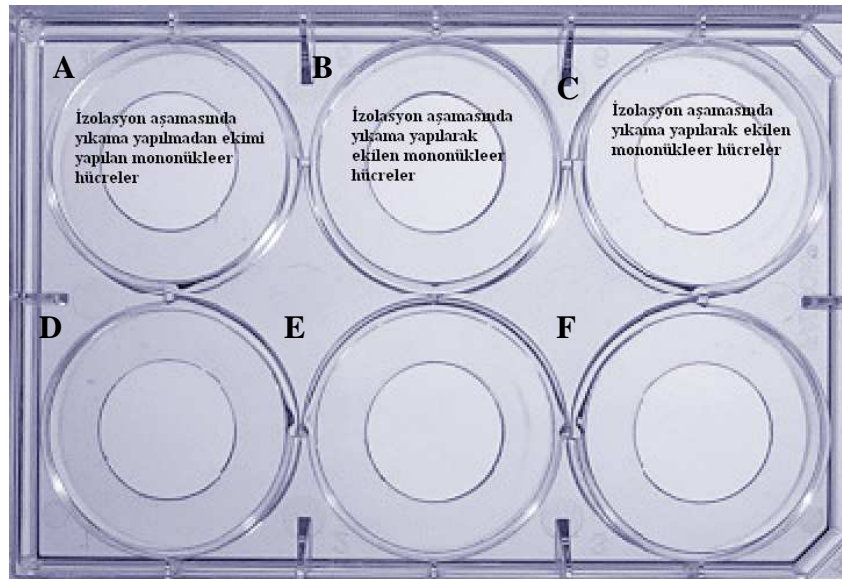


Şekil 7. 39 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve Falcon marka flask içinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (31. gün, 20x).

Hücrelerin besiyerleri 48 saatte bir değiştirilmeye devam etti. Bir süre sonra flaskların içinde homojen morfolojide hücre varlığına rastlanmadı. İnsan göbek kordonundan 28 ml kan alınarak izole edilen mononükleer hücreler, buffy coat tabakasında görülen az miktarda hücrenin tutunması için 96 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin uzun olması nedeniyle kültürde fazla sayıda hücrenin tutunduğu gözlemlendi. Farklılaşarak kök hücre özelliğini kaybeden hücrelerin uzaklaştırılması için erken yapılan pasaj işlemi sebebiyle, mezenkimal hücre morfolojisine sahip hücrelerin kültüründe başarı sağlanamamış olabilceği düşünüldü.

Donör 7

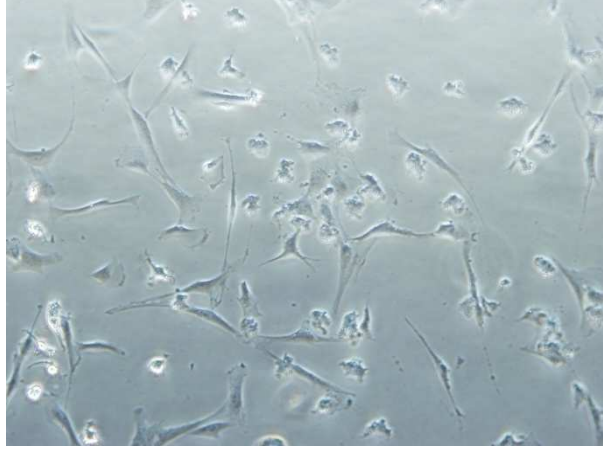
Sezaryen ile doğum sonrası kordon veninden alınan 20 ml kordon kanı 2 saat içinde laboratuvara getirildi ve bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin izolasyonu için santrifüj hızı 900xg süresi 25 dakika olarak ayarlandı ve 20°C'da santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda Ficoll ile plazma arasında mononükleer hücrelerin bulunduğu sis bulutu tabakası gözlemlendi. Mononükleer hücrelerin bulunduğu faz toplanarak steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüm hacmin 3/1' i yıkama işlemi yapılmadan 6 kuyulu plate içine ekildi. Geriye kalan mononükleer hücre pelleti üzerine 1x AntiAnti içeren DMEM eklenerek 300xg'de 20°C'da 10 dakika santrifüj yapıldı. Elde edilen mononükleer hücre pelleti %15 Hyclone FBS, 2 mM Glutamax ve 1x AntiAnti içeren DMEM besiyerinde 6 kuyulu plate içine ekilerek 37°C' da %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı (Şekil 7. 40).



Şekil 7. 40 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde ve 6 kuyulu plate içinde kültürü yapılan mononükleer hücreler. A: İzolasyondan sonra yıkama yapılmadan ekilen hücreler, B:İzolasyon sonrası yıkama yapılarak ekilen hücreler, C:İzolasyon sonrası yıkama yapılarak ekilen hücreler

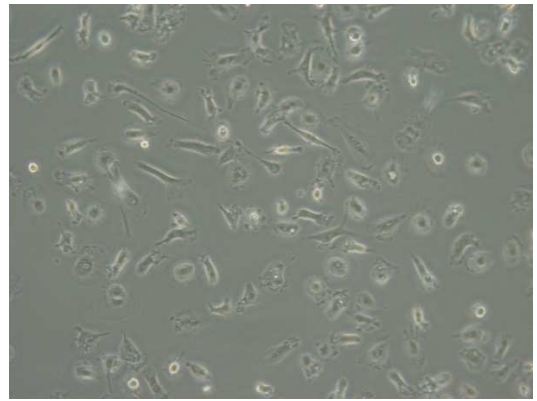
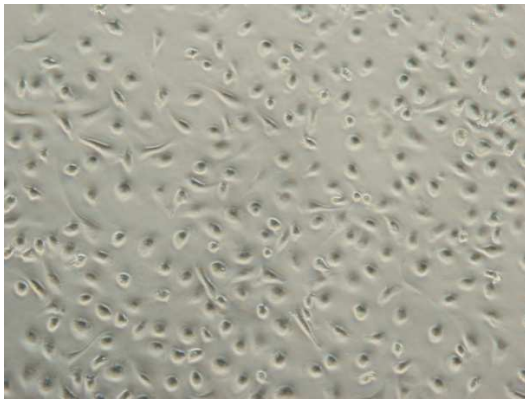
Yıkama yapılarak ekilen mononükleer hücrelerin bulunduğu 2 kuyucuktan birinin üst sıvısı 24. Saatte alınarak 6 kuyulu platein D kuyucuğuna eklendi. Üst sıvısı uzaklaştırılan

kuyucuğun üzerine taze hazırlanmış besiyeri eklendi ve invert mikroskop altında görüntüledi. Fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 41)



Şekil 7. 41 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (24. Saat, 20x)

İzolasyonun 5. gününde izolasyonda yıkama yapılan ve yapılmadan ekilen mononükleer hücrelerin bulunduğu birer kuyucuktaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Kuyular invert mikroskop altında incelendiğinde izolasyon sırasında yıkama yapılmadan ekilen mononükleer bulunduğu kuyucukta daha fazla sayıda yüzeye tutunan hücre bulunduğu gözlemlendi (Şekil 7. 42).



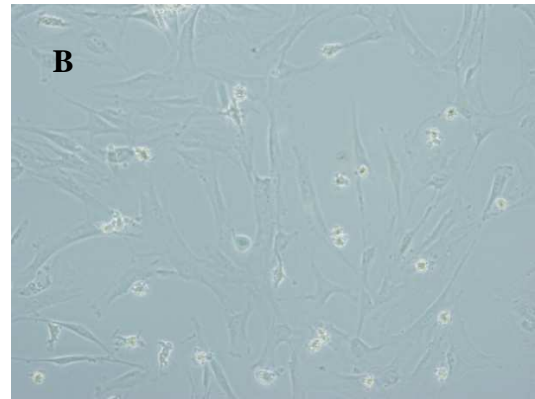
Şekil 7. 42 Kordon kanından izole edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (5. gün, 20x)

İzolasyonun 5. gününde izolasyon aşamasında yıkama yapılarak ekilen hücreler invert mikroskop altında incelendiğinde fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin varlığı görüldü (Şekil 7. 43).



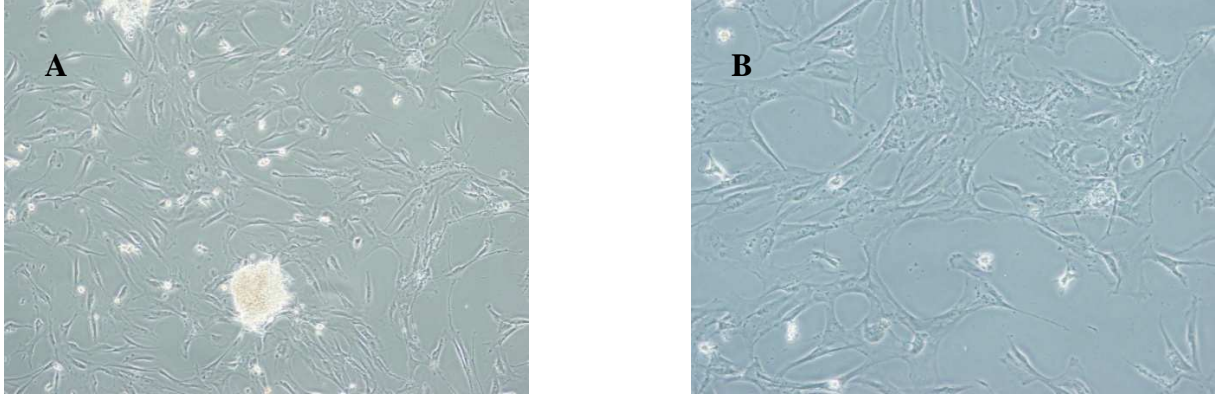
Şekil 7. 43 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü (5.gün, 20x)

İzolasyon aşamasında yıkama yapılarak ekilen mononükleer hücrelerin bulunduğu kuyucuk içindeki hücrelerin besiyeri 24 saatte bir değiştirildi. İzolasyonun 14. gününde hücrelerin sayısında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 44).



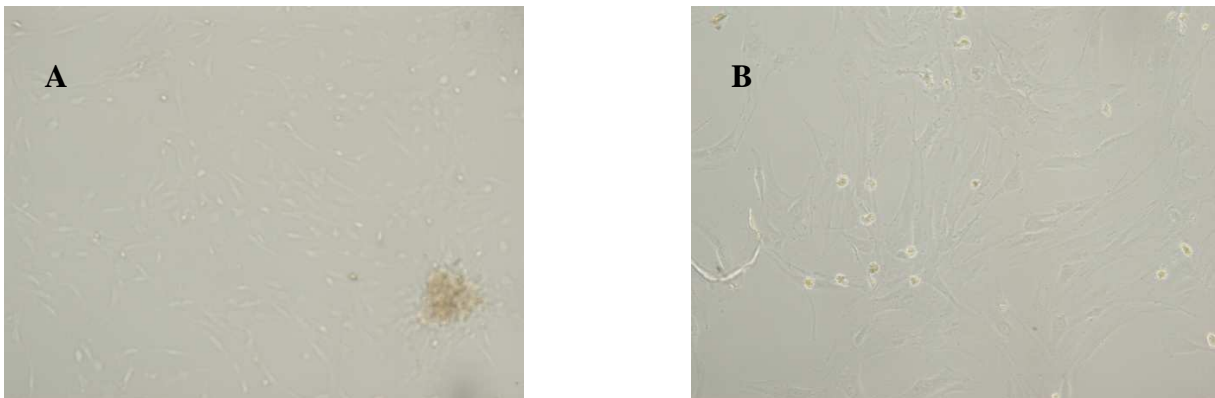
Şekil 7. 44 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskobik görünümü (14.gün, A: 10x, B: 20x)

İzolasyonun ardından 24. saatte besiyeri uzaklaştırılarak kültürü yapılan mononükleer hücrelerin de fibroblast benzeri morfolojiye sahip oldukları ve 15. günde sitoplazmalarının genişlediği gözlemlendi (Şekil 7. 45).



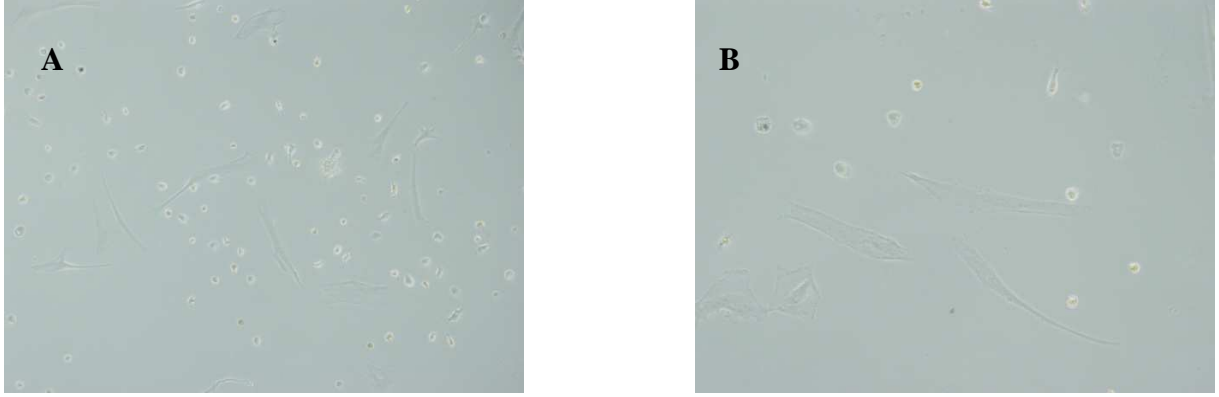
Şekil 7. 45 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (15. gün, A: 10x, B: 20x)

Hücrelerin besiyeri 24 saatte bir değiştirildi. Hücreler invert mikroskop altında hergün incelendi. Fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin pasaj sırasında kaybedilmemesi için hücrelerin pasajı 3. haftaya kadar yapılmadı. Pasajlanmayan hücrelerin sitoplazmalarında genişlemeler gözlemlendi ve hücrelerin çoğalması yavaşladı (Şekil 7. 46)

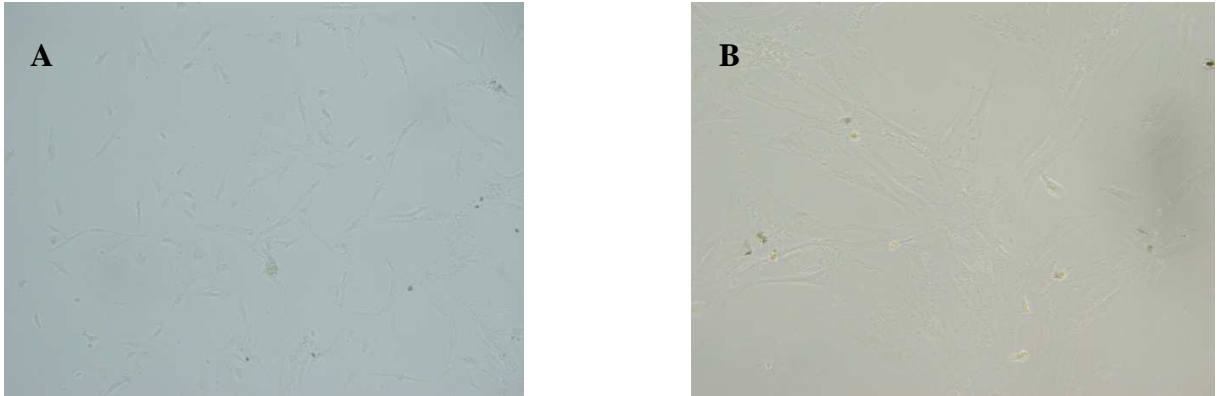


Şekil 7. 46 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (18.gün, A: 10x, B: 20x)

İzolasyonda yıkama basamağı yapılmayan mononükleer hücrelerin bulunduğu kültür ortamında fibroblast benzeri morfolojiye sahip olmayan küre şeklinde hücrelerin sayısının arttığı gözlemlendi (Şekil 7. 47, Şekil 7. 48).



Şekil 7. 47 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (18.gün, A: 10x, B: 20x)



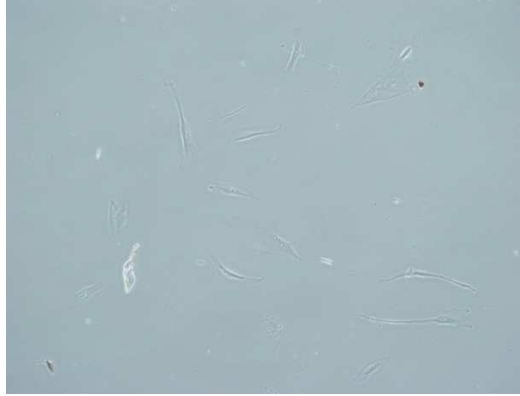
Şekil 7. 48 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (18.gün, A: 10x, B: 20x)

İzolasyonda yıkama yapılan hücrelerin 20. gündeki morfolojilerinin geniş sitoplazmaya sahip hücre formunda devam etmeleri ve bölünmelerinin yavaşlaması sebebiyle hücreler tripsin ile muamele edilerek pasajlandı (Şekil 7. 49).



Şekil 7. 49 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (20.gün, 20x)

Hücrelerin yavaş büyüme hızları ve sayılarının az olması göz önünde bulundurularak 1. pasajı yapılan hücrelerin inkübasyonu için 1cm² alana sahip centerwell kültür kapları kullanıldı. ilk pasajın 24. saatinde center well içinde tutunan hücreler incelendiğinde, geniş sitoplazmaya sahip fibroblast benzeri morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 7. 45)



Şekil 7. 50 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (21.gün, 10x)

Pasaj sonrası yüzeye tutunan hücrelerin gelişimleri her 24 saatte bir invert mikroskopta gözlemlendi. Hücrelerin koloni oluşturduğu ve kültürde yavaş gelişim gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 7. 51, 6. 52)



Şekil 7. 51 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü 1. Pasaj sonrası (26. gün, 10x)

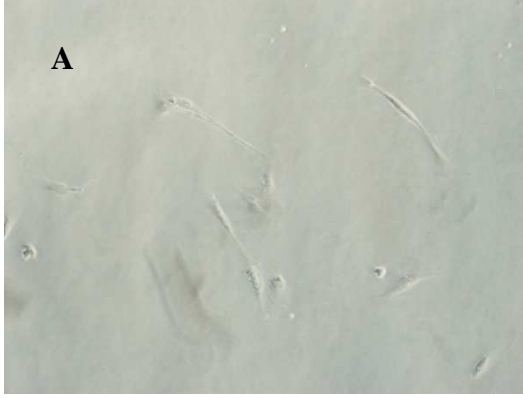


Şekil 7. 52 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (30. gün, 10x)

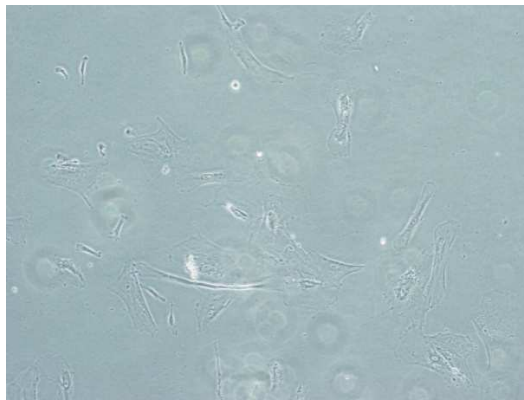
Kültürün 34. gününde (1. Pasajdan 2 hafta sonra) kültürde büyük oranda genişleme görülmediğinden Tripsin-EDTA ile pasajı yapılan hücreler tekrar center well içine ekildi. Kültürün durumu her gün izlendi, sitoplazmalarının geniş olarak canlılıklarını korudukları görüldü (Şekil 7. 53, 6. 54, 6. 55).



Şekil 7. 53 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (35. gün, 20x)



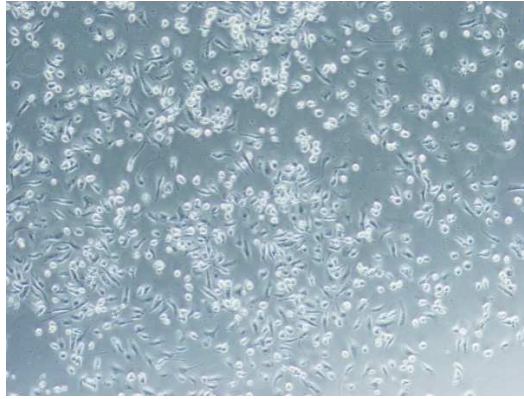
Şekil 7. 54 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (36. gün, 20x)



Şekil 7. 55 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (39. gün 10x) center well

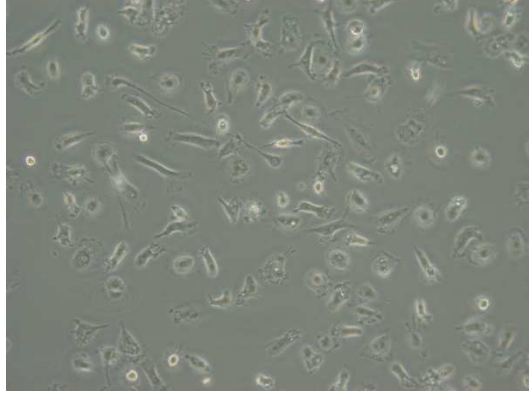
Centerwell içindeki az sayıda ve koloni formunda çoğalan fibroblast benzeri hücreler izolasyonun 45. gününde 3. kez pasajlandı. Pasajlanan az sayıda hücre yeni bir centerwell içine ekilerek kültür devam ettirildi. 3. pasajı yapılan hücreler invert mikroskopta incelendiğinde fibroblast benzeri morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi.

Mononükleer hücre izolasyonu aşamasında yıkama basmağı uygulanmadan 6 kuyulu plate içinde kültürü yapılan hücrelerin invert mikroskopta morfolojileri incelendiğinde, çok sayıda yuvarlak hücre morfolojisine sahip hücrelerin varlığı gözlemlendi (Şekil 7. 56).



Şekil 7. 56 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (4. gün 10x)

Mononükleer hücre izolasyonu aşamasında yıkama basmağı uygulanmadan 6 kuyulu plate içinde kültürü yapılan hücrelerin invert mikroskopta morfolojileri incelendiğinde, az sayıda fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin varlığı görüldü (Şekil 7. 57).



Şekil 7. 57 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (4. gün 20x)

Kordon kanından Ficoll ile izolasyonunda yıkama basamağı uygulanmadan ekimi yapılan mononükleer hücrelerin kültrünün 12. gününde kültürde fibrblast benzeri morfolojiye sahip hücre varlığı gözlenmedi. Kültürün besiyeri; 24 saatte bir değiştirildi. Kültürün 20 gününde kuyucuk içinde sağlıklı hücre morfolojisine sahip, yüzeye tutunan hücre varlığına rastlanmadı.

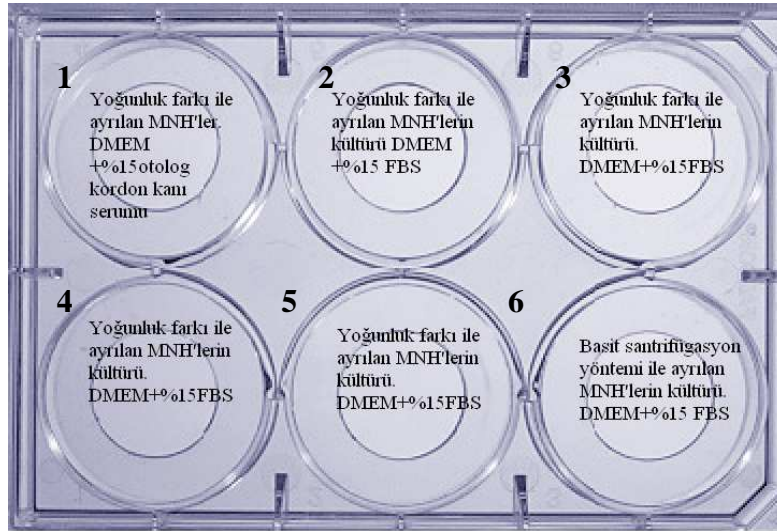
İzolasyon sırasında yıkama işlemi uygulanarak ekilen mononükleer hücrelerin bulunduğu centerwell içindeki hücreler fibroblast benzeri morfolojilerini koruyarak halen canlılıklarını sürdürmektedirler.



Şekil 7. 58 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (60. gün 20x)

Donör 8

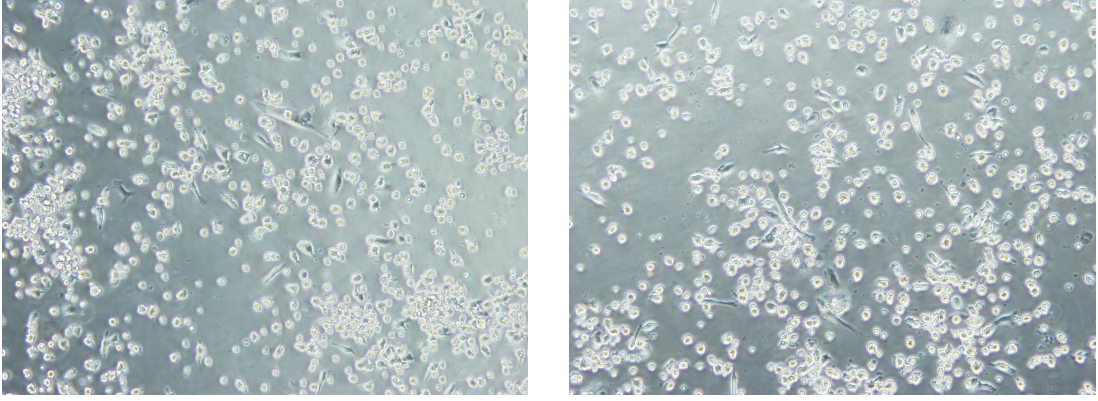
Sezaryen ile doğum sonrası kordon veninden alınan 50 ml kordon kanı 2 saat içinde laboratuvara getirildi. Toplam kordon kanının 1/5'i bölüm 5.6.1' de belirtilen mononükleer hücrelerin ayrılmasında kullanılan santrifügasyon yöntemi ile ayrıldı. Ayrılan mononükleer hücreler, %15 HyClone serum içeren DMEM besiyeri ile 6 kuyulu platein 6 numaralı kuyusuna ekildi. Geri kalan 40 ml kordon kanı bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin yoğunluk farkı ile izolasyonunda 900xg santrifüj hızı uygulandı. Santrifüj sonunda üst fazda bulunan otolog serum bölüm 6.4.2.3' te belirtildiği şekilde hazırlandı. Ficoll ile ayırımı yapılan mononükleer hücrelerin 3/4'ü 6 kuyulu platein diğer 4 kuyusuna, %15HyCloneFBS içeren DMEM besiyerinde ekimi yapıldı. Geriye kalan mononükleer hücreler bölüm 5.7.2.3' de anlatıldığı şekilde hazırlanan %15otolog serum içeren DMEM besiyerinde 6 kuyulu platein 1 numaralı kuyusuna ekildi. Hücreler 37°C' da %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı(Şekil 7. 59).



Şekil 7. 59 Kordon kanı mononükleer hücrelerinin ayrılmasında farklı izolasyon yöntemleri ve kültüründe farklı serum kullanılması. Yoğunluk farkı ile ayrılan kordon kanı mononükleer hücrelerinin %15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü (2, 3, 4, 5). Yoğunluk farkı ile ayrılan kordon kanı mononükleer hücrelerinin %15 HyClone FBS içeren besiyerinde kültürü (1). Santrifügasyon yöntemi ile kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerin kültürü (6).

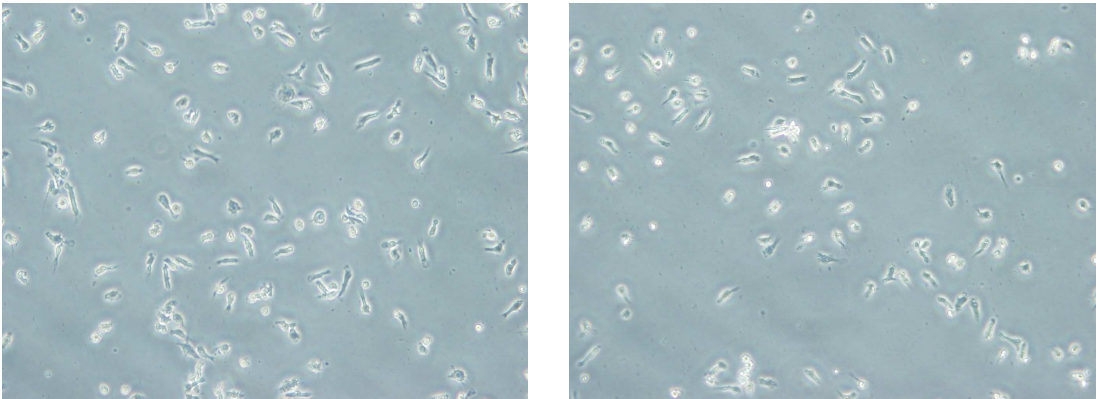
Kordon kanından izole edilen ve %15 otolog serum ile kültürü yapılan mononükleer hücrelerin bulunduğu kuyucuk içerisindeki tutunmayan hücreler, kültürün 96. saatinde uzaklaştırıldı.

Hücrelerin morfolojileri invert faz kontrast mikroskobundan incelendi. Yüze tutunan hücrelerin büyük çoğunluğunun yuvarlak hücre morfolojisine sahip oldukları gözlemlendi. Ancak az sayıda fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrenin de yüze tutunduğu gözlemlendi (Şekil 7. 60)

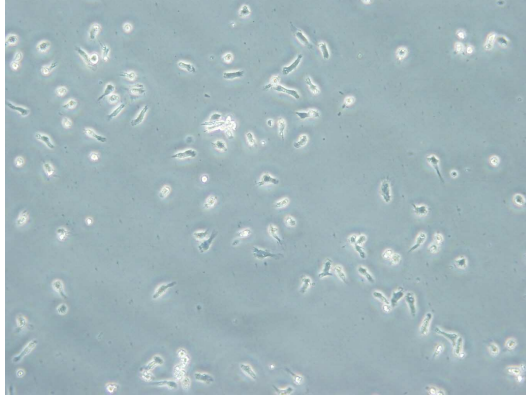


Şekil 7. 60 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (96. saat 10x)

Kültürün 7. gününde yüze tutunan mononükleer hücrelerin sayısının azaldığı gözlemlendi. Yüze tutunan hücrelerin yuvarlak hücre morfolojisine sahip oldukları ve az sayıda fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrenin var olduğu gözlemlendi.

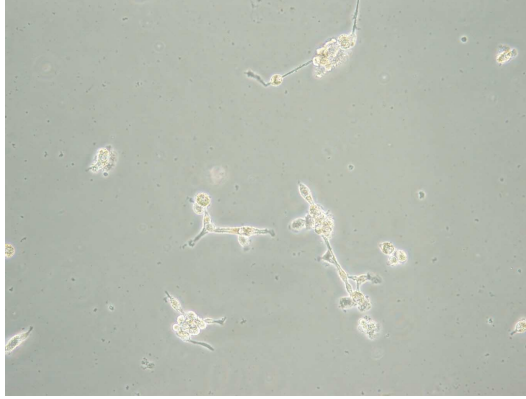


Şekil 7. 61 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (7. gün 10x)



Şekil 7. 62 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (14. gün 10x)

Hücrelerin besiyeri 24 saatte %15 otolog serum içeren DMEM besiyeri ile değiştirildi. Kültürün 20. gününde az sayıda hücrenin canlı hücre morfolojisine sahip olduğu gözlemlendi.

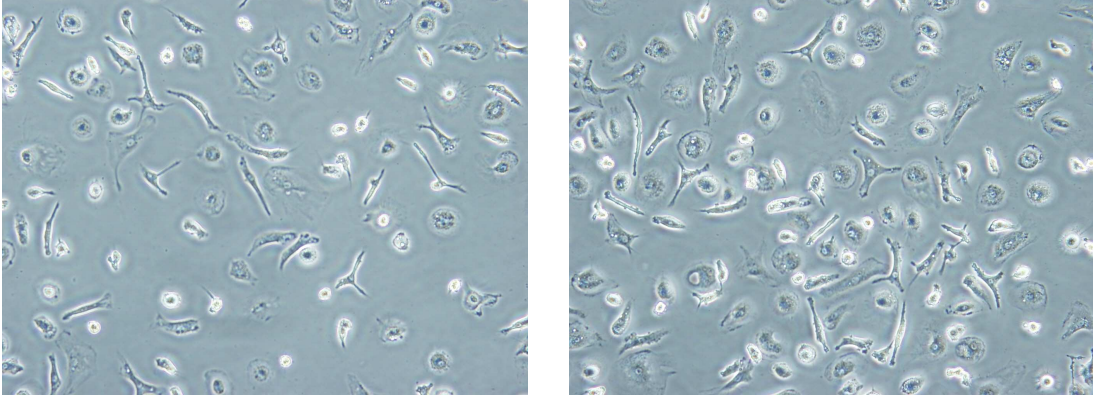


Şekil 7. 60 Kordon kanından elde edilen, DMEM+%15 otolog serum içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (20. gün 10x)

Kültürün 30. gününde yüzeye tutunan ve sağlıklı hücre morfolojisine sahip hücre varlığına rastlanmadı.

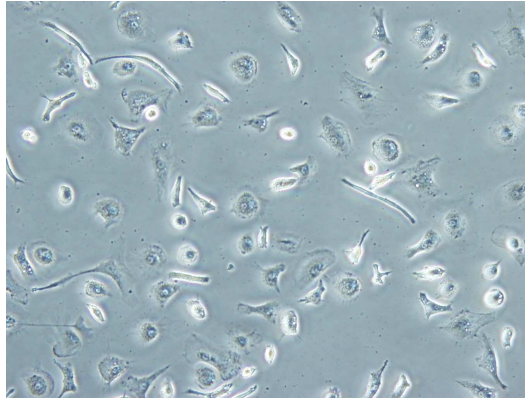
Yoğunluk farkı ile ayrılan ve %15 HyClone FBS içeren DMEM besiyerinde kültürü yapılan hücrelerin 96 saatlik inkübasyonun ardından besiyeri değiştirildi. Hücrelerin morfolojileri

invert faz kontrast mikroskopta incelendi. Yüzeğe tutunan hücrelerin yaklaşık yarısının yuvarlak hücre morfolojisine sahip hücre formunda olduğu, diğer yarısının ise küçük fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 61).



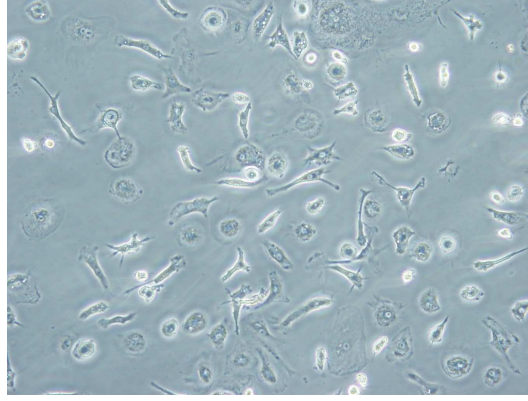
Şekil 7. 61 Kordon kanından elde edilen, DMEM+% 15 FBS içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (96. Saat, 20x)

Kültürdeki hücrelerin besiyeri 24 saatte bir değiştirildi. Hücreler her gün invert faz kontrast mikroskop altında incelendi. Kültürün 10. gününde fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin sayısının azaldığı gözlemlendi (Şekil 7. 62).



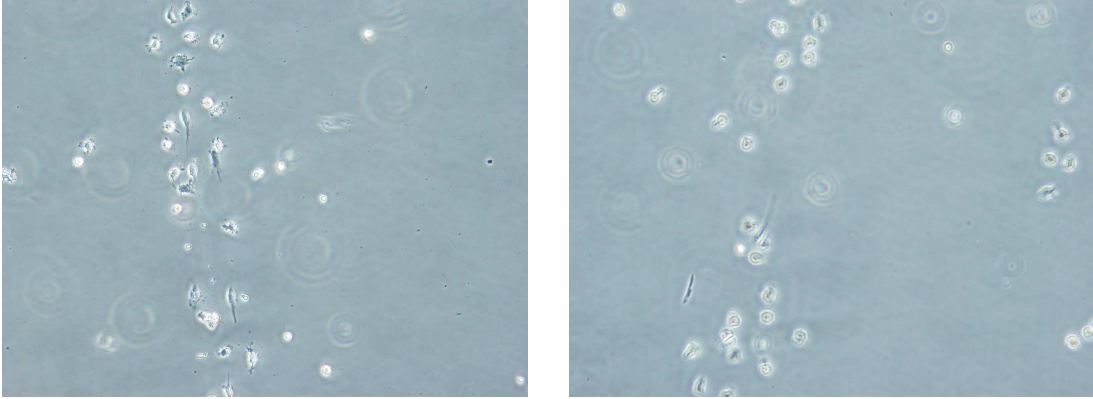
Şekil 7. 62 Kordon kanından elde edilen, DMEM+% 15 FBS içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (10. gün, 20x)

Kültürün 14. gününde fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin sayısının azaldığı. Tutunan hücrelerin sitoplazmalarının genişlediği gözlemlendi (Şekil 7. 63).



Şekil 7. 63 Kordon kanından elde edilen, DMEM+% 15 FBS içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (14. gün, 20x)

Kültürün 21. gününde hücrelerin sayısının azaldığı, yüzeye tutunan hücrelerin ise yuvarlak hücre morfolojisine sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 7. 64).



Şekil 7. 64 Kordon kanından elde edilen, DMEM+% 15 FBS içeren besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü (21. gün, 20x)

Kültürün 26. gününde sağlıklı hücre morfolojisine sahip hücre varlığına rastlanmadı.

Donör 9

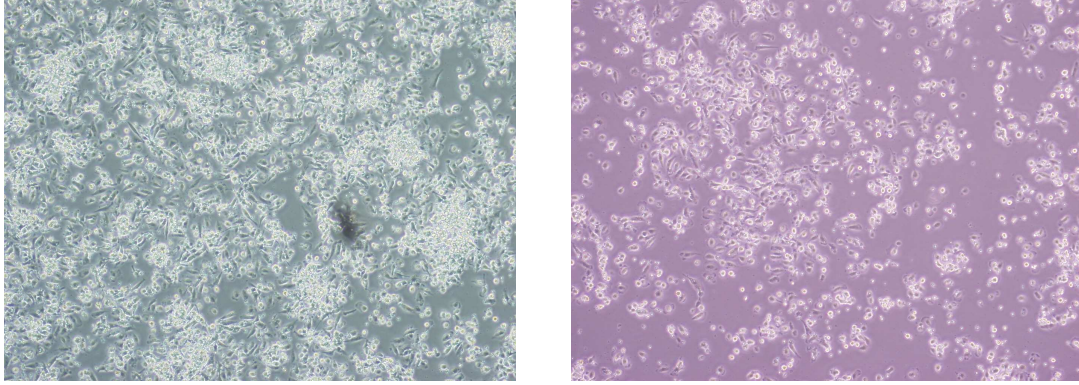
Sezaryen ile doğum sonrası kordon veninden alınan 25 ml kordon kanı 2 saat içinde laboratuvara getirildi ve bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin yoğunluk farkı ile izolasyonunda 900xg santrifüj hızı uygulandı. Santrifüj sonunda mononükleer hücreler toplandı. Toplam hacim belirlendi. Toplam hacim 2 ye bölünerek 2 adet 15 ml'lik steril falcon tüpü içinde toplandı. Tüplerden birinin üzerine 1x AntiAnti içeren 5 ml düşük (1g/L) glukoz içeren DMEM, diğerine 1x AntiAnti içeren 5 ml yüksek glukoz (4,5g/L) içeren DMEM besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu 300xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre pelletleri %15 FBS içeren düşük ve yüksek glukozlu DMEM besiyerleri içinde resüspanse edildi. Hücreler 6 kuyulu plate içinde 37°C' da %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı (Şekil 7. 65).



Şekil 7. 65 Kordon kanından izole edilen hücrelerin, düşük (1g/L) ve yüksek (4,5g/L) glukoz içeren DMEM+%15 FBS besiyerinde kültürü

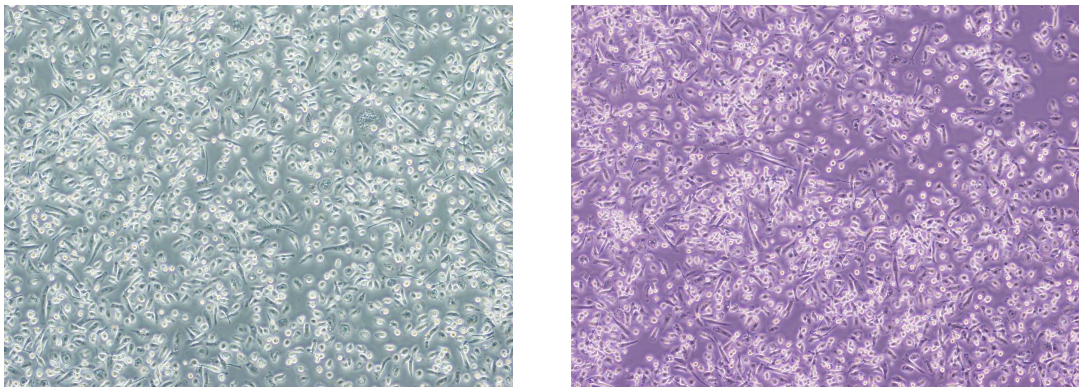
Kordon kanından izole edilen ve %15 serum ile kültürü yapılan mononükleer hücrelerin bulunduğu kuyucukların içerisindeki tutunmayan hücreler, kültürün 96. saatinde uzaklaştırıldı. Hücrelerin morfolojileri invert faz kontrast mikroskopundan incelendi. Yüzeğe tutunan hücrelerin büyük çoğunluğunun yuvarlak hücre morfolojisine sahip oldukları ancak

fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrenin de yüzeye tutunduğu gözlemlendi. İzolasyondan sonra düşük glikozlu DMEM besiyerinde kültürü yapılan kordon kanı mononükleer hücrelerinin, yüksek glikozlu DMEM besiyerinde kültürü yapılan hücrelerden daha fazla sayıda oldukları gözlemlendi (Şekil 7. 66)



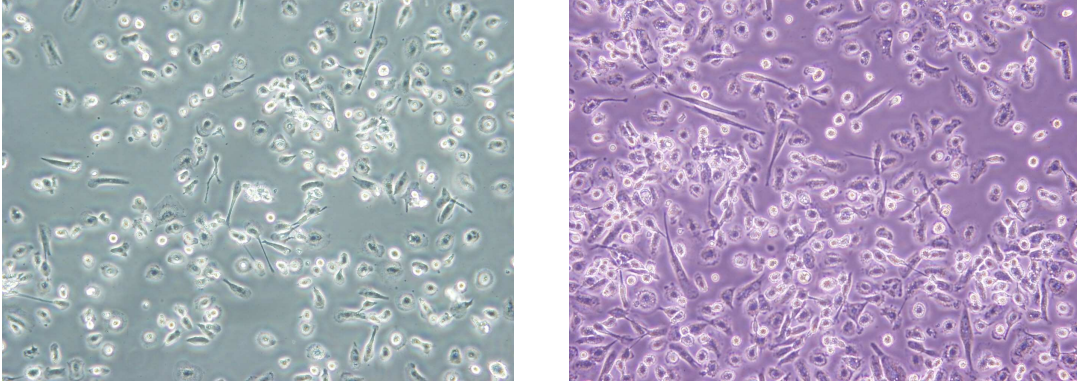
Şekil 7. 66 Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü A: Düşük glikozlu DMEM+%15 FBS B: Yüksek glikozlu DMEM+%15 FBS (96. saat 10x)

Hücrelerin uygun besiyeri ile 24 saatte bir değiştirildi. Tüm kuyular invert mikroskop altında incelendi. İzolasyondan sonra kültürün 7. gününde düşük glikozlu DMEM besiyerindeki hücrelerin, yüksek glikozlu DMEM besiyerinden daha fazla yüzey kaplaması yaptıkları gözlemlendi (Şekil 7. 67).



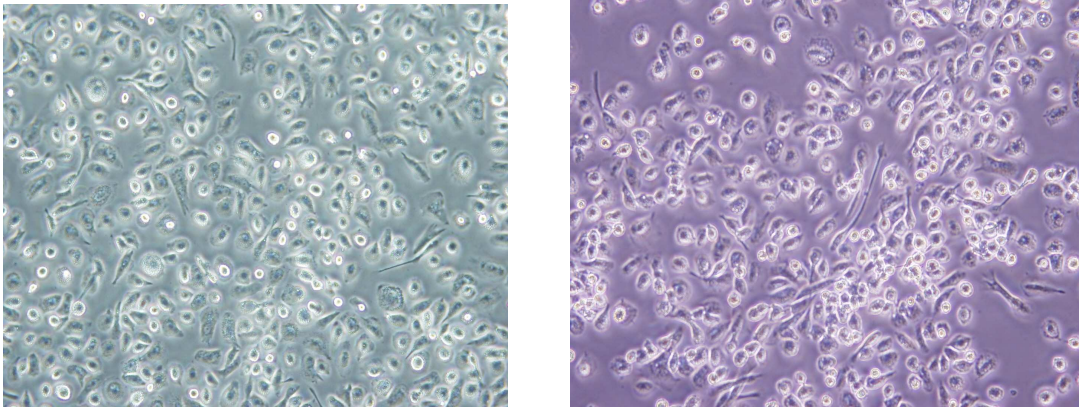
Şekil 7. 67 Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü A: Düşük glikozlu DMEM+%15 FBS B: Yüksek glikozlu DMEM+%15 FBS (7. gün 10x)

Kültürün 14. gününde düşük glikozlu DMEM besiyerindeki fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin, yüksek glikozlu DMEM besiyerinden daha fazla oldukları gözlemlendi (Şekil 7. 68).



Şekil 7. 68 Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü A: Düşük glikozlu DMEM+% 15 FBS B: Yüksek glikozlu DMEM+% 15 FBS (14. gün 10x)

Kültürün 21. gününde düşük glikozlu DMEM besiyerindeki fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin, yüksek glikozlu DMEM besiyerinden daha fazla oldukları ve düşük glikozlu DMEM besiyerindeki hücrelerin daha fazla proliferasyon yaptıkları gözlemlendi (Şekil 7. 69).



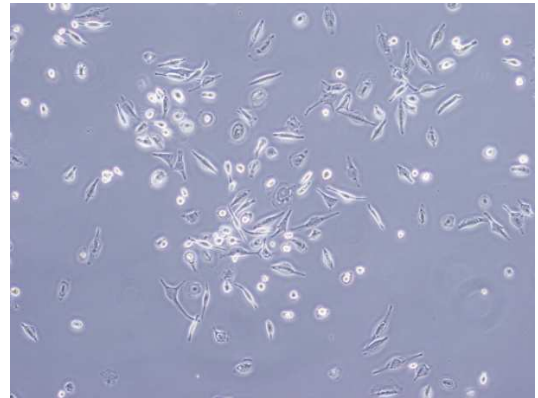
Şekil 7. 69 Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin mikroskopik görünümü A: Düşük glikozlu DMEM+% 15 FBS B: Yüksek glikozlu DMEM+% 15 FBS (14. gün 10x)

Kordon kanından izole edilen, düşük ve yüksek glikozlu DMEM besiyerinde kültürü yapılan mononükleer hücrelerin kültüründe, yapılan morfolojik inceleme sonucu düşük glikoz içeren DMEM besiyerindeki mononükleer hücrelerin yüzey kaplamasının ve proliferasyonunun daha

fazla olduğu gözlemlendi. Tripsinizasyon ile yüzeyden ayrılan hücrelerin Flow sitometrik incelemeleri de elde edilen bu morfolojik sonuçları destekledi.

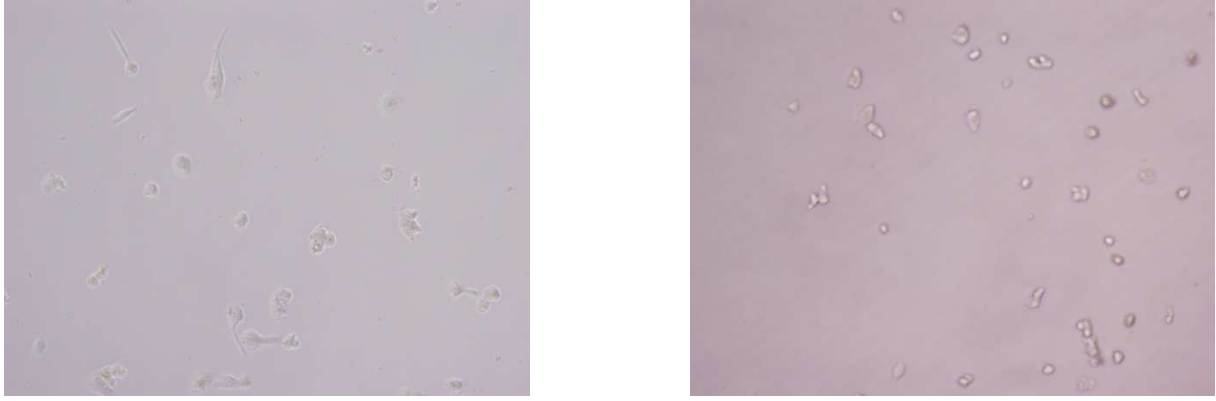
7.2 Periferik Kandan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürünün Yapılması

Çalışma hakkında bilgilendirilip onayları alınan gönüllü donörlerden alınan 5 ml periferik kan 2 saat içinde laboratuvara getirildi ve bölüm 5.3.3.2' de belirtildiği şekilde mononükleer hücrelerin ayrılması için hazırlandı. Mononükleer hücrelerin yoğunluk farkı ile izolasyonunda 900xg santrifüj hızı uygulandı. Santrifüj sonunda mononükleer hücreler 2 adet 15 ml'lik steril falcon tüpü içinde toplandı. Tüplerden birinin üzerine 1x AntiAnti içeren 5 ml düşük glukoz içeren DMEM, diğerine 1x AntiAnti içeren 5 ml yüksek glukoz içeren DMEM besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu 300xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre pelletleri %15 FBS içeren düşük ve yüksek glikozlu DMEM besiyerleri içinde resüspanse edildi. Hücreler 6 kuyulu plakeler içinde 37°C' da %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı (Şekil 7. 65). İzolasyonun 96. saatinde tüm kuyucuklardaki tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı. Tüm kuyulara taze hazırlanmış besiyeri eklendi. Hücreler invert mikroskop altında incelendi. Toplam 30 farklı donörden alınan periferik kan örneklerinin sadece 5'inde kültürde yüzeye tutunmuş fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrenin var olduğu gözlemlendi (Şekil 7. 70).



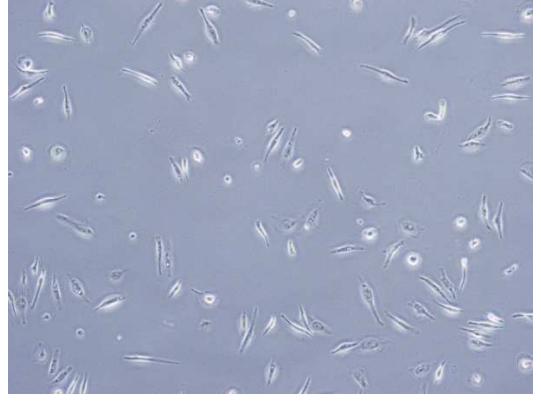
Şekil 7. 70 Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin IMDM+%15 FBS besiyerinde kültürünün mikroskopik görüntüsü (96. saat, 10x)

Hücreler 24 saatte bir invert mikroskop altında incelendi. Hücrelerin besiyerleri 48 saatte bir değiştirdi. Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin kültüründe yüzeye tutunan hücrelerin büyük bölümünün yuvalak hücre morfolojisine sahip hücreler olduğu gözlemlendi. Yuvarlak hücre morfolojisine sahip hücrelerin, kültürün ilerleyen günlerinde sitoplazmalarının genişlediği gözlemlendi. Sitoplazmaları genişleyen hücrelerin kültürün 3. haftasından sonra sağlıklı hücre morfolojilerini kaybetmeye başladıkları gözlemlendi. Kültürün 5. haftasında kültürdeki tüm hücrelerin yüzeye tutunma özelliklerini ve sağlıklı hücre morfolojilerini kayb ettikleri gözlemlendi (Şekil 6. 71).



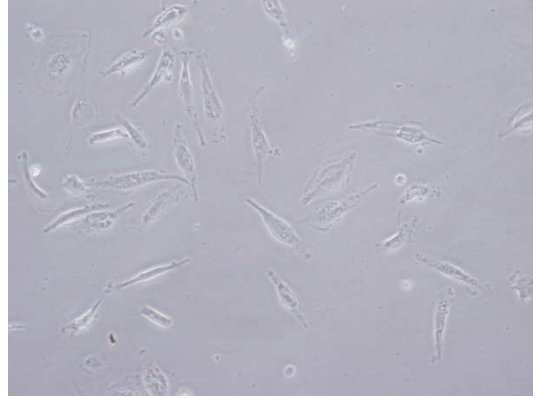
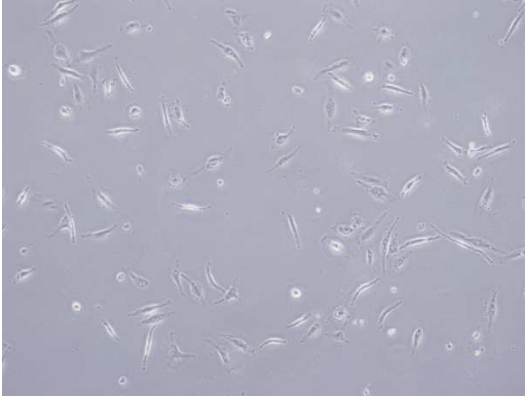
Şekil 7. 71 Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin IMDM+% 15 FBS besiyerinde kültürünün mikroskopik görüntüsü (96. saat 10x)

Fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler, kültürün 14. gününde tripsin-EDTA ile pasajı yapıldı. Tripsin-EDTA ile muamele sonrası kuyucukların yüzeyinden az sayıda hücrenin ayrıldığı gözlemlendi. Flask yüzeyinden ayrılan hücreler yine 6 kuyulu plate içine ekildi. Pasaj sonrası 24. saatte plate yüzeyi incelendiğinde, fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücrelerin yüzeye tutundukları gözlemlendi. Kültürün besiyeri 24 saatte bir değiştirildi. Hücreler invert faz kontrast mikroskop altında günlük olarak incelendi. Kültürün ilerleyen günlerinde yüzeye tutunan hücrelerin proliferasyon yaptıkları gözlemlendi (Şekil 7. 72).



Şekil 7. 72 Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin IMDM+%15 FBS besiyerinde kültürünün mikroskopik görüntüsü (14. gün 10x)

Yüzey kaplaması %60' a ulaşan hücreler kültürün 20. gününde Tripsin-EDTA ile pasajlandı. Plate yüzeyinden az sayıda hücrenin ayrılabilirdiği gözlemlendi. Ayrılan hücreler 6 kuyulu plate içine ekildi. Hücrelerin besiyeri 48 saatte bir değiştirildi. Hücrelerin morfolojileri 24 saatte bir incelendi. Hücrelerin fibroblast benzeri morfoloji gösterdikleri belirlendi (Şekil 7. 73).



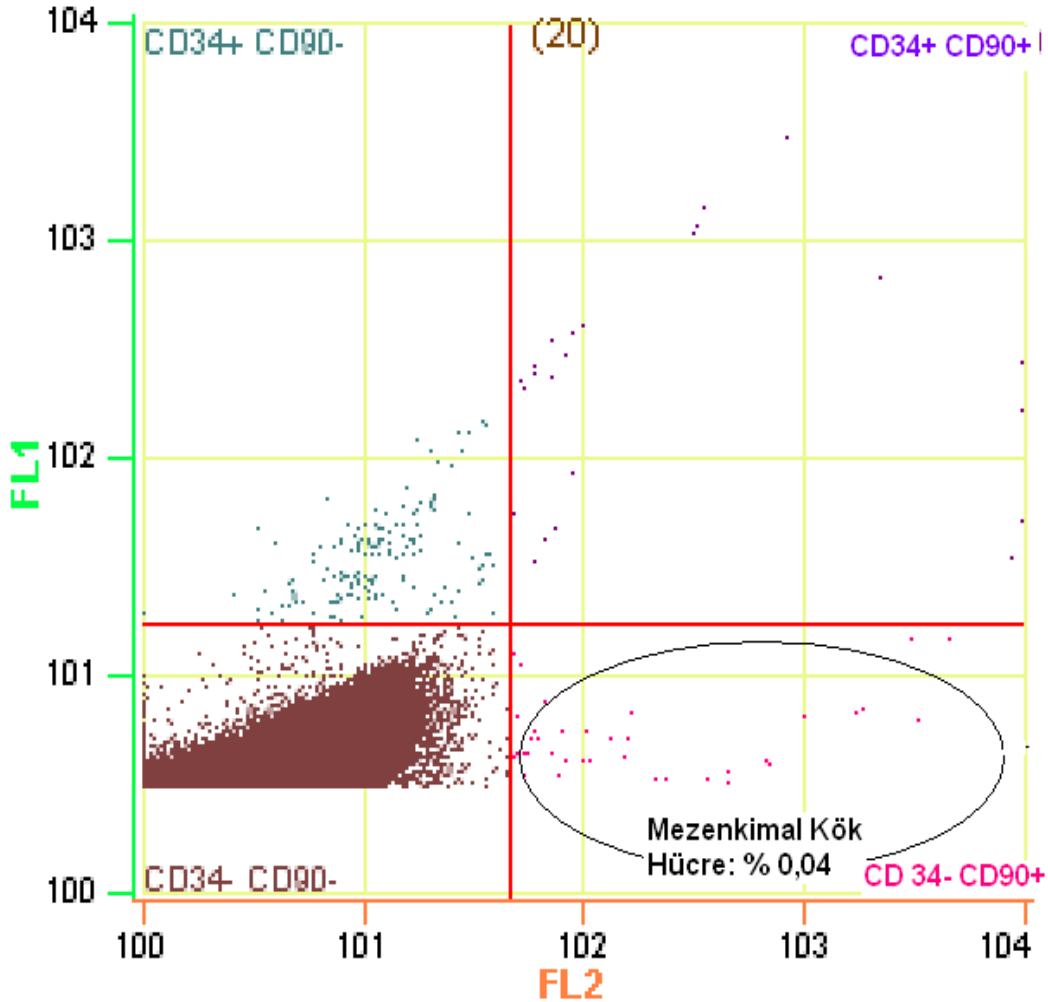
Şekil 7. 73 Periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin IMDM+%15 FBS besiyerinde kültürünün mikroskopik görüntüsü (21. gün 10x)

Böylece periferik kandan Ficoll gradient yöntemi ile izole edilen mononükleer hücrelerin %15 FBS içeren IMDM besiyerinde devamlı kültürü sağlandı.

7.3 Flow Sitometrik Analiz Sonuçları

7.3.1 İnsan Göbek Kordon Kanı (Tam Kan) Flow Sitometrik Analiz Sonuçları

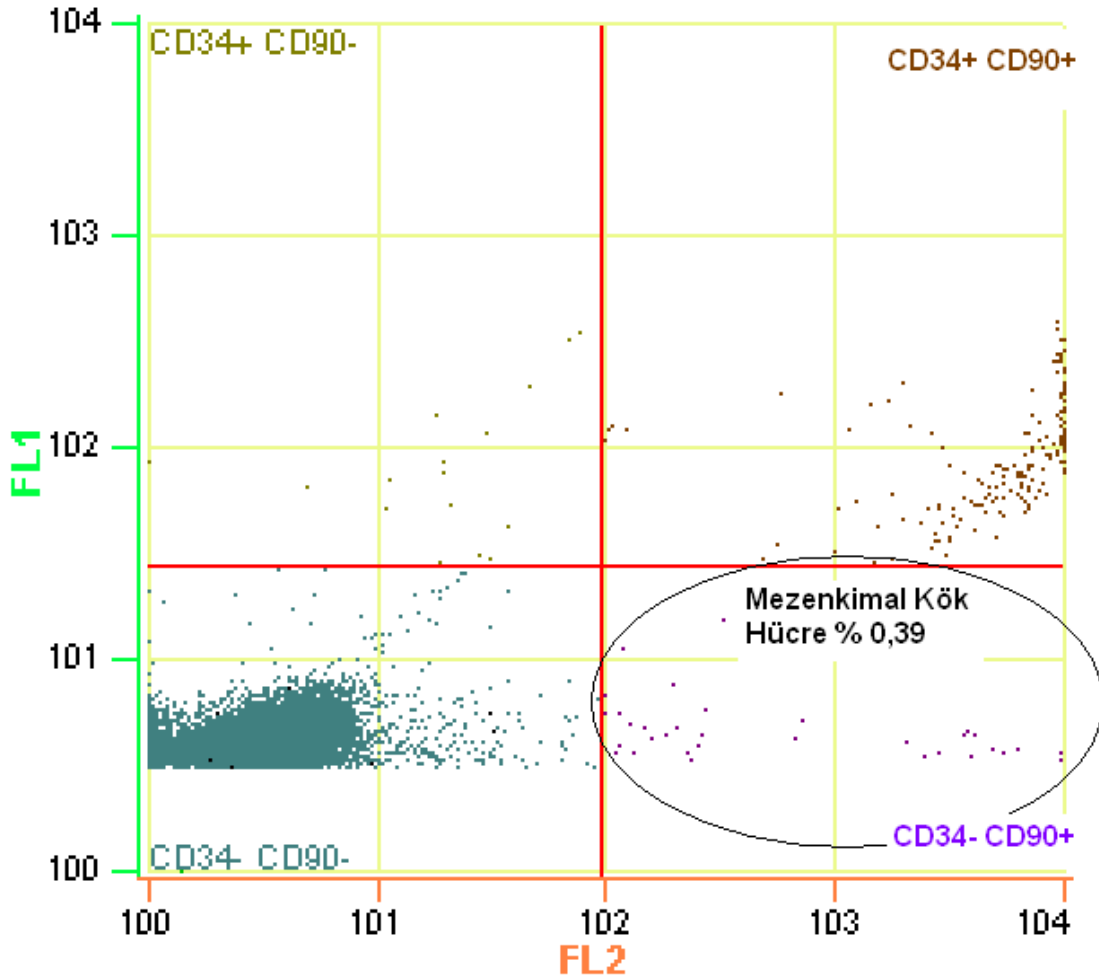
Kordon kanından mononükleer hücre izolasyonu yapılmadan önce, tam kordon kanının içerdiği mezenkimal kök hücre miktarı Flow sitometrik olarak analiz edildi. Bu amaçla kordon kanı mezenkimal kök hücreleri tarafından eksprese edilmeyen CD34 yüzey antijenleri (negatif seleksiyon) ve kordon kanı mezenkimal kök hücreleri tarafından eksprese edilen CD90 yüzey antijeni (pozitif seleksiyon) için kullanıldı. Flow Sitometrik analiz sonucunda tam kordon kanında hücrelerin % 0,04'ünün CD34 antikorları ile negatif, CD90 antikorlarıyla ise pozitif olduğu belirlendi (Şekil 7. 74).



Şekil 7. 74 Mononükleer hücre izolasyonu öncesi tam kordon kanındaki mezenkimal kök hücre oranı

7.3.2 İnsan Göbek Kordon Kanından Eritrosit Lizis Yöntemi ile İzole Edilen Mononükleer Hücrelerin Flow Sitometrik Analiz Sonuçları

Kordon kanından mononükleer hücre izolasyonu sırasında eritrositlerin ortamdan uzaklaştırılması için eritrosit lizis tamponu kullanıldı. Yapılan izolasyondan sonra mononükleer hücreler kültüre alınmadan önce içerdikleri mezenkimal kök hücre miktarı Flow Sitometrik olarak analiz edildi. Flow Sitometrik analiz sonucunda eritrosit lizis tamponu kullanılarak izole edilen mononükleer hücrelerin % 0,39'unun CD34 antikoru ile negatif, CD90 antikoruyla ise pozitif olduğu belirlendi (Şekil 7. 75).

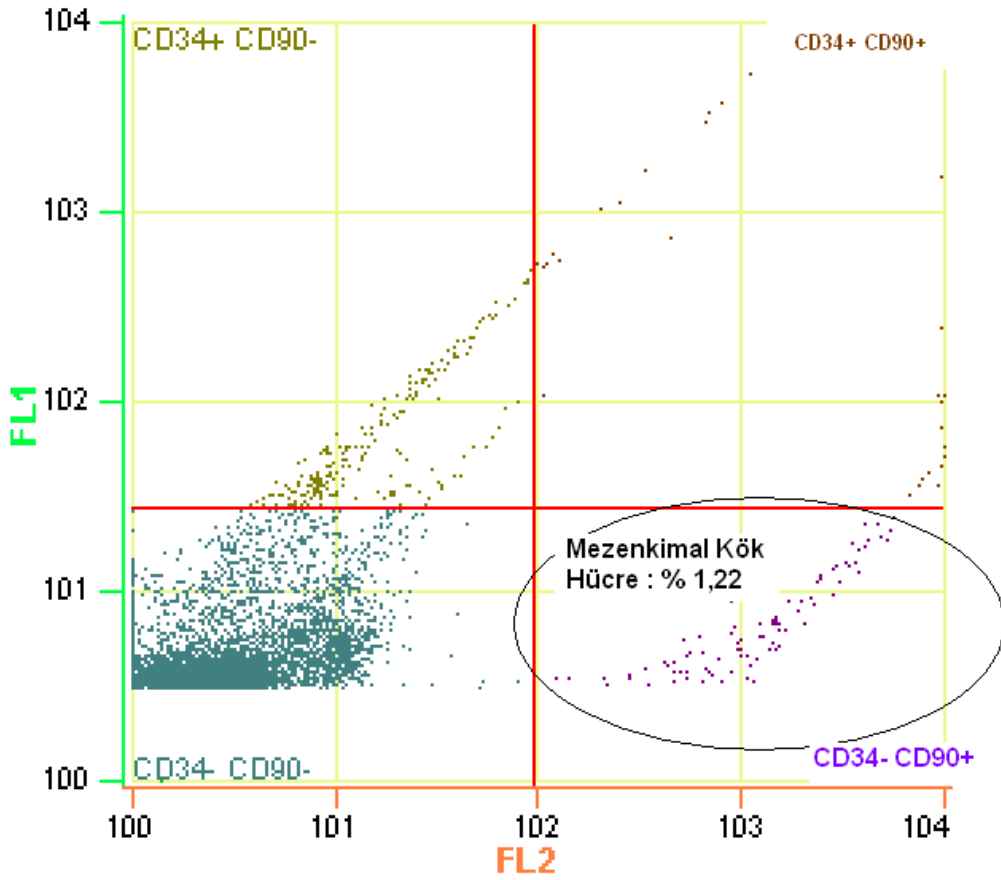


Şekil 7. 75 Eritrosit lizis tamponu kullanılarak yapılan mononükleer hücre izolasyonu sonrası kordon kanındaki mezenkimal kök hücre oranı

Eritrosit lizis tamponu kullanılarak izole edilen mononükleer hücrelerin Flow Sitometrik olarak immünofenotiplenmesinde 10.000 hücre kullanılmıştır.

7.3.3 İnsan Göbek Kordon Kanından Eritrosit Lizis Yöntemi ile İzole Edilen Mononükleer Hücrelerin Flow Sitometrik Analiz Sonuçları

Kordon kanından mononükleer hücreler yoğunluk farkıyla ayırma yöntemi ile izole edildi. Yapılan izolasyondan sonra mononükleer hücreler kültüre alınmadan önce içerdikleri mezenkimal kök hücre miktarı Flow Sitometrik olarak analiz edildi. Flow Sitometrik analiz sonucunda izole edilen mononükleer hücrelerin % 1,22'sinin CD34 antikorları ile negatif, CD90 antikorlarıyla ise pozitif olduğu belirlendi (Şekil 7. 76).

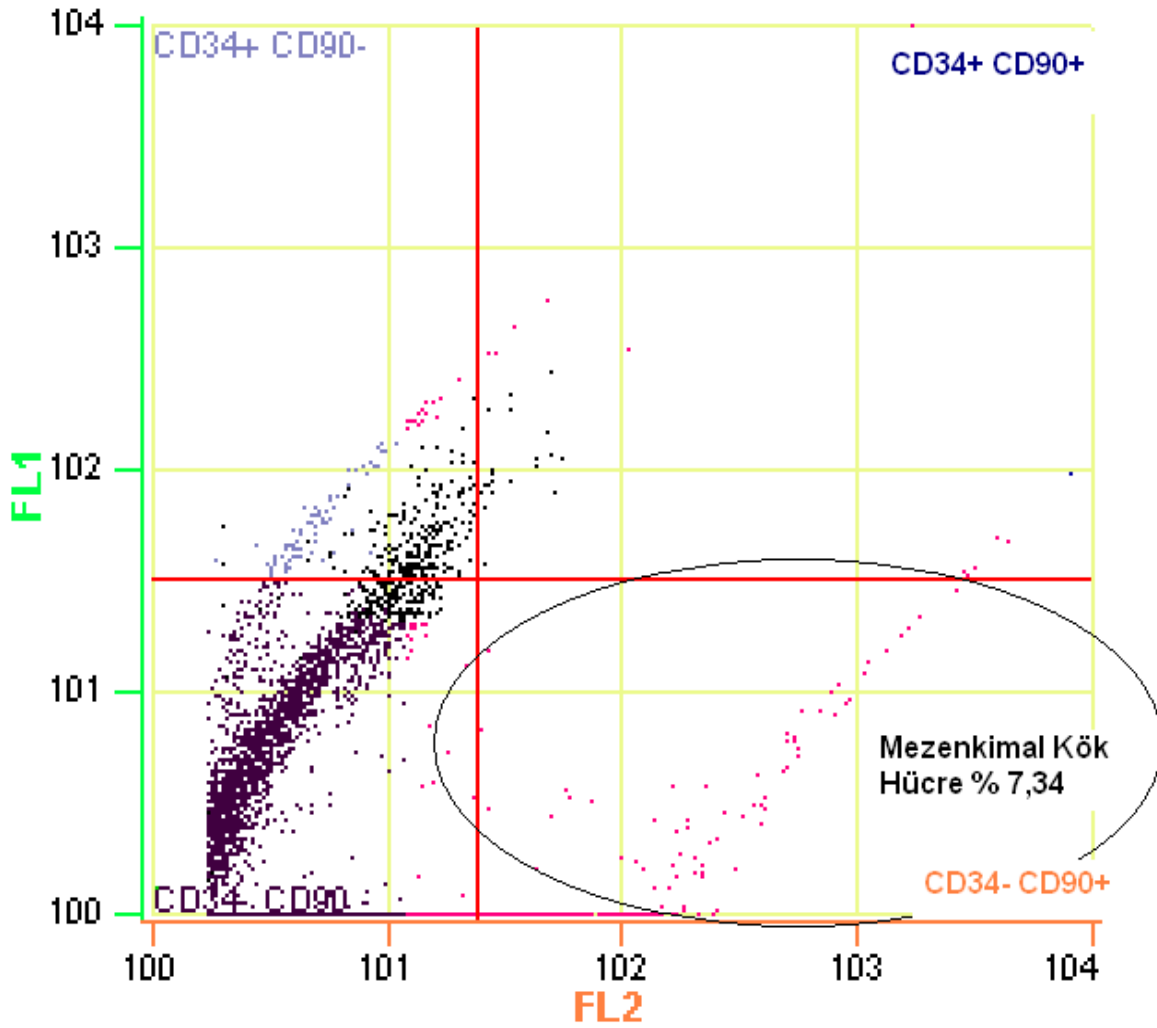


Şekil 7. 76 Mononükleer hücre izolasyonu sonrası kordon kanındaki mezenkimal kök hücre oranı

İzole edilen mononükleer hücrelerin Flow Sitometrik olarak immünofenotiplendirilmesinde 10.000 hücre kullanılmıştır.

7.3.4 Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yüksek Glukozu DMEM Besiyerinde Kültürünün Flow Sitometrik Analiz Sonuçları

Kordon kanından izole edilen mononükleer hücreler 7 gün yüksek glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında inkübe (37°C %5 CO₂) edildi. 7 günlük inkübasyon sonrası, tripsinasyon ile ayrılan hücrelerin içerdiği mezenkimal kök hücre miktarı Flow Sitometrik olarak analiz edildi. Flow Sitometrik analiz sonucunda izole edilen mononükleer hücrelerin % 7,34'ünün CD34 antikorları ile negatif, CD90 antikorlarıyla ise pozitif olduğu belirlendi (Şekil 7. 77).

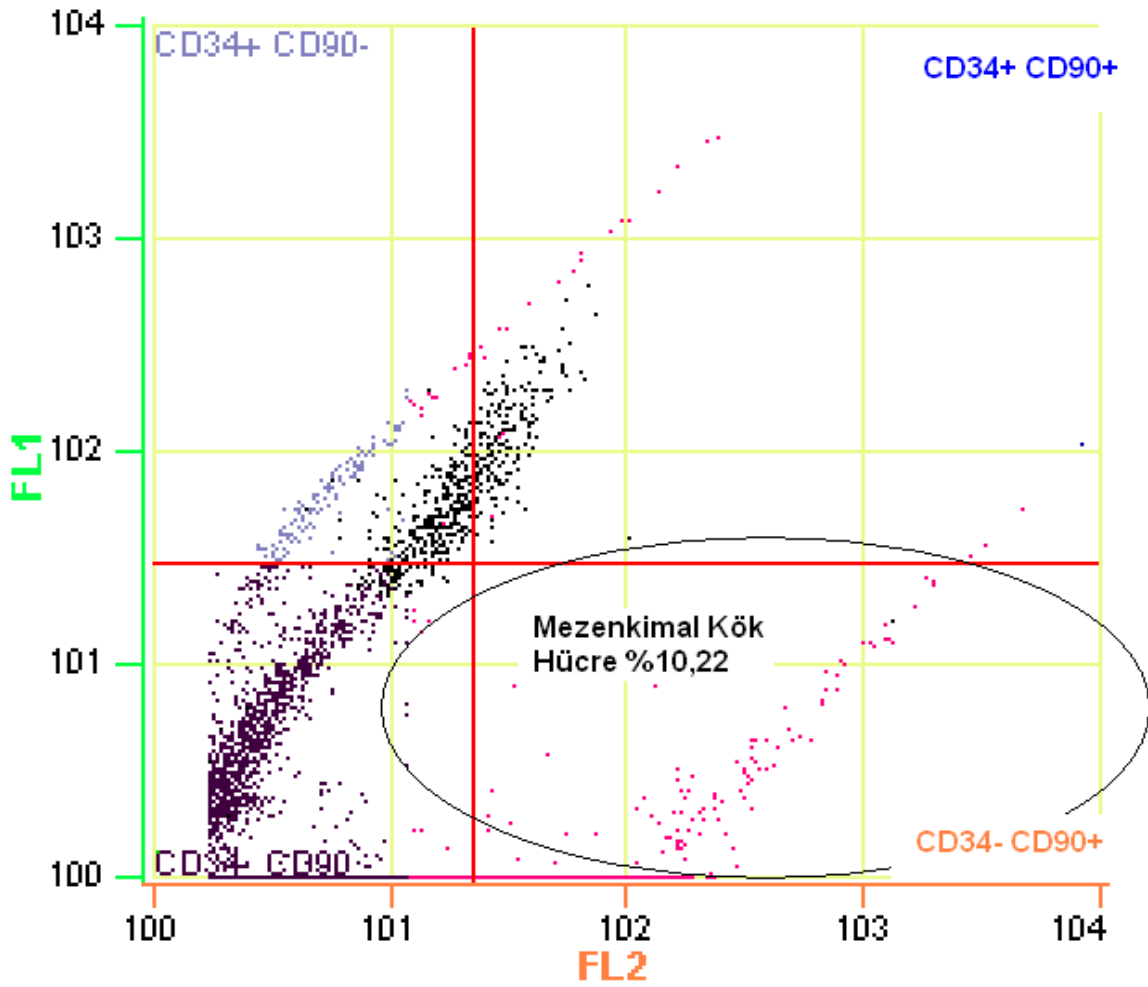


Şekil 7. 77 Yüksek glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı (Mononükleer hücre izolasyonu sonrası 7. gün)

Kültürü yapılan hücrelerin Flow Sitometrik olarak immünofenotiplendirilmesinde 10.000 hücre kullanılmıştır.

7.3.5 Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Düşük Glikozlu DMEM Besiyerinde Kültürünün Flow Sitometrik Analiz Sonuçları

Kordon kanından izole edilen mononükleer hücreler 7 gün düşük glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında inkübe (37°C %5 CO_2) edildi. 7 günlük inkübasyon sonrası, tripsinasyon ile ayrılan hücrelerin içerdiği mezenkimal kök hücre miktarı Flow Sitometrik olarak analiz edildi. Flow Sitometrik analiz sonucunda izole edilen mononükleer hücrelerin % 10,22'sinin CD34 antikorları ile negatif, CD90 antikorlarıyla ise pozitif olduğu belirlendi (Şekil 7. 78).



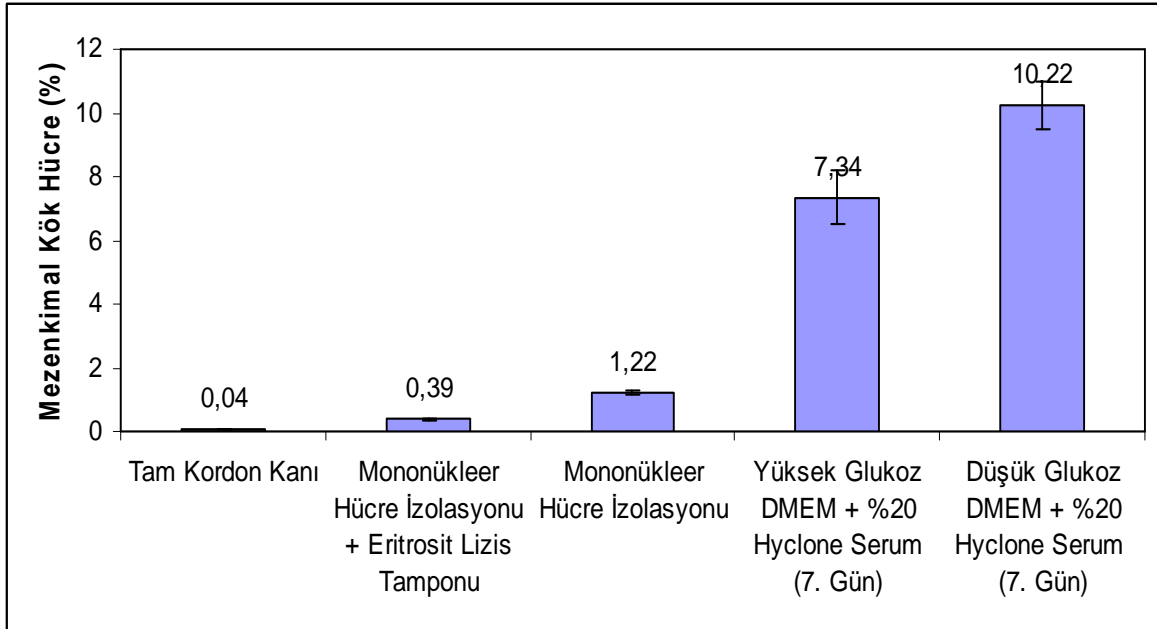
Şekil 7. 78 Düşük glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı (Mononükleer hücre izolasyonu sonrası 7. gün)

Kültürü yapılan hücrelerin Flow Sitometrik olarak immünofenotiplendirilmesinde 10.000 hücre kullanılmıştır.

7.3.6 Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyon Yöntemine ve Farklı Glukoz Konsantrasyonuna Göre İncelenmesi

Şekil 7. 79'da kordon kanında farklı izolasyon yöntemleri ve farklı kültür ortamları kullanılarak, mezenkimal kök hücre miktarındaki değişim gösterilmiştir. Sonuçlara göre tam kordon kanında % 0,04 oranında mezenkimal kök hücre bulunurken bu oran eritrosit lizis tamponu kullanılarak yapılan mononükleer hücre izolasyonunda % 0,39'a Ficoll gradient yöntemi ile mononükleer hücre izolasyonu yapıldığında ise % 1,22'ye yükselmiştir. Bu sonuçlara göre kordon kanından mezenkimal kök hücre izolasyonunda, sadece mononükleer hücre izolasyonunun, eritrosit lizis tamponu kullanılarak yapılan mononükleer hücre izolasyonundan 3 kat daha iyi olduğu gösterildi.

İzolasyondan sonra kordon kanından izole edilen mononükleer hücreler 7 gün düşük ve yüksek glukoz konsantrasyonu içeren DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında inkübe (37°C %5 CO₂) edildi. Yüksek glukoz içeren kültür ortamındaki mezenkimal kök hücre miktarı % 7,34 iken, düşük glukoz içeren kültür ortamındaki mezenkimal kök hücre miktarı % 10,22'ye çıkmıştır.



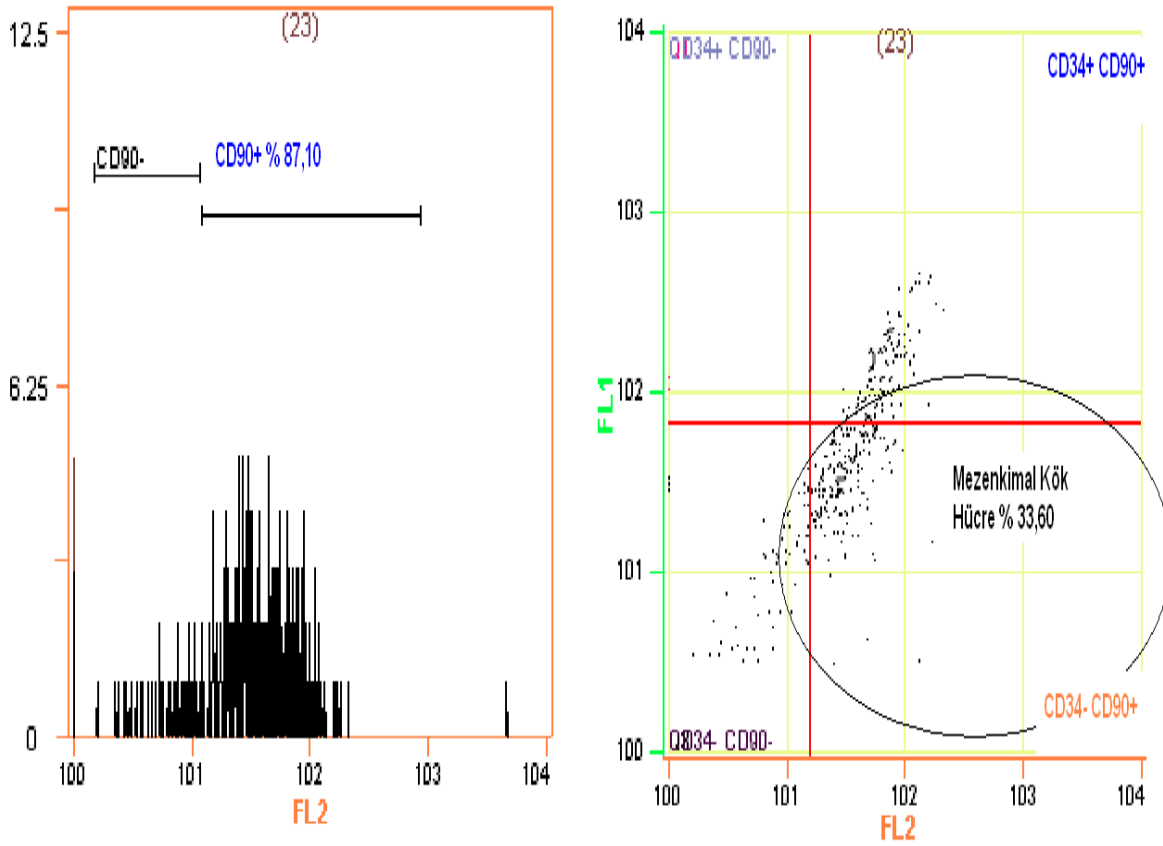
Şekil 7. 79 Kordon kanında izolasyon ve besiyeri ortamına bağlı olarak mezenkimal kök hücre oranı

Bu sonuçlara göre kordon kanından izole edilen mezenkimal kök hücreler için düşük glukoz

DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamının, yüksek glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamından daha iyi olduğu belirlendi.

7.3.7 Düşük Glukoz DMEM İçeren Kültür Ortamında Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Oranı

İkinci donörden elde edilen kordon kanından izole edilen mononükleer hücreler 7 gün düşük glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında inkübe (37°C %5 CO_2) edildi. 7 günlük inkübasyon sonrası, tripsinasyon ile ayrılan hücrelerin içerdiği mezenkimal kök hücre miktarı Flow Sitometrik olarak analiz edildi. Flow Sitometrik analiz sonucunda izole edilen mononükleer hücrelerin % 33,60'nının CD34 antikorları ile negatif, CD90 antikorlarıyla ise pozitif olduğu tespit edildi. Ayrıca hücrelerin %87,10'unun mezenkimal kök hücrelerin stromal ve yapışma özelliklerini gösteren CD90 antikorları ile pozitif sonuç verdiği belirlendi (Şekil 7. 80).



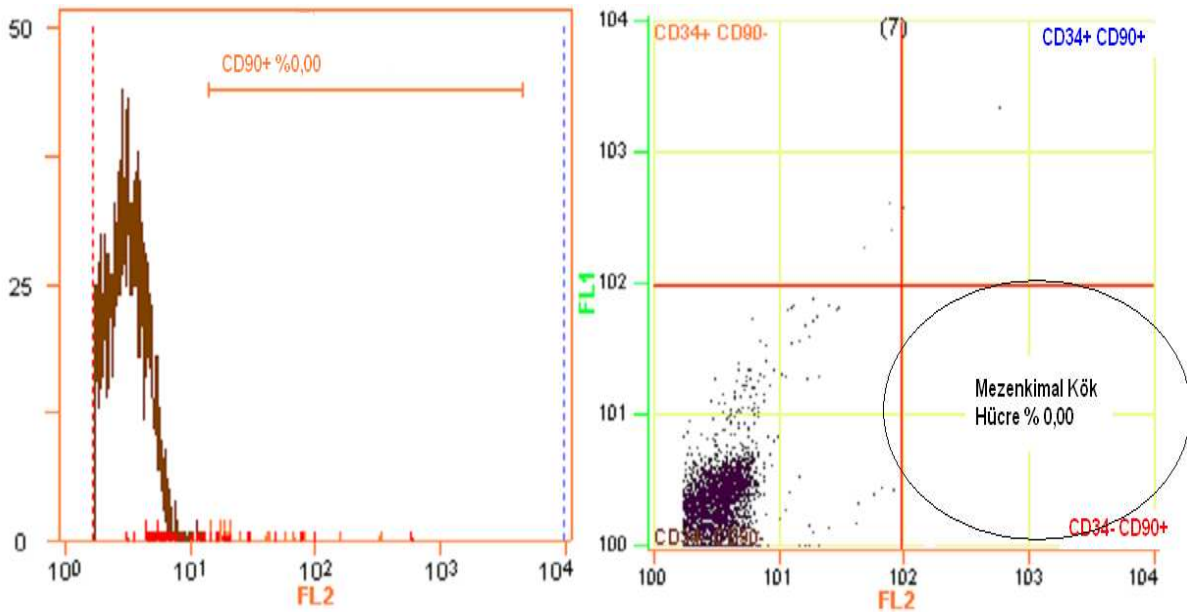
Şekil 7. 80 İkinci donörde düşük glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı (Mononükleer hücre izolasyonu sonrası

7. gün)

Kültürü yapılan hücrelerin Flow Sitometrik olarak immüfenotiplendirilmesinde 10.000 hücre kullanılmıştır.

7.3.8 Periferik Kandan (Tam Kan) Ficoll Gradient Yöntemi ile İzole Edilen Mononükleer Hücrelerin Mezenkimal Kök Hücre Miktarı

Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu yapılmadan önce, tam periferik kanın içerdiği mezenkimal kök hücre miktarı Flow Sitometrik olarak analiz edildi. Bu amaçla kordon kanı mezenkimal kök hücreleri tarafından eksprese edilmeyen CD34 yüzey antijenleri (negatif seleksiyon) ve kordon kanı mezenkimal kök hücreleri tarafından eksprese edilen CD90 yüzey antijeni (pozitif seleksiyon) için kullanıldı. Flow Sitometrik analiz sonucunda tam periferik kanda, CD34 antikorları ile negatif, CD90 antikorlarıyla ise pozitif sonuç veren hücre olmadığı belirlendi (Şekil 7. 81).

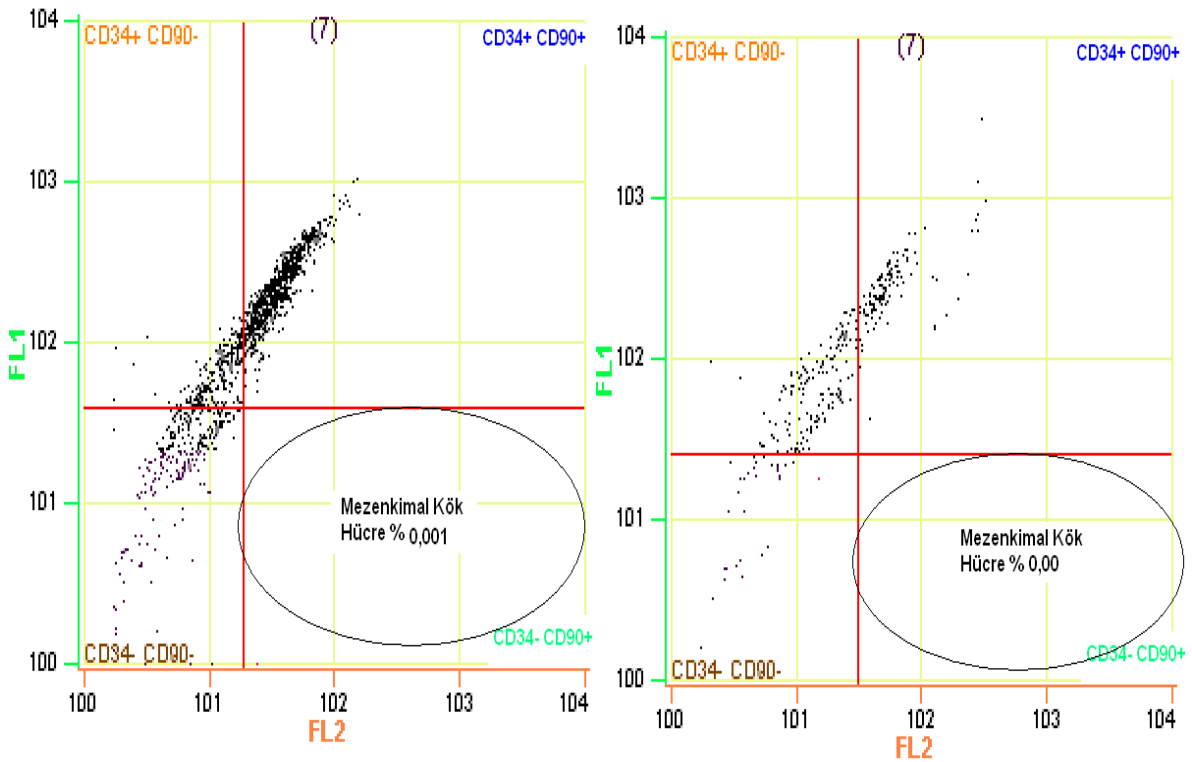


Şekil 7. 81 Mononükleer hücre izolasyonu öncesi tam periferik kandaki mezenkimal kök hücre oranı

Tam periferik kandaki mezenkimal kök hücrelerin Flow Sitometrik olarak immüfenotiplendirilmesinde 100.000 hücre kullanılmıştır.

7.3.9 Yüksek Glukoz DMEM Besiyerinde Periferik Kandan İzole Edilen Mononükleer Hücreler 14 Gün İçeren Kültür Ortamında İnkübe

Periferik kandan izole edilen mononükleer hücreler 14 gün yüksek glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında inkübe (37°C %5 CO_2) edildi. 14 günlük inkübasyon sonrası, tripsinasyon ile ayrılan hücrelerin içerdiği mezenkimal kök hücre miktarı Flow Sitometrik olarak analiz edildi. Flow Sitometrik analiz sonucunda farklı iki donörden birinde CD34 antikorları ile negatif, CD90 antikorlarıyla ise pozitif sonuç veren hücre olmazken diğerinde bu oran %0,001 olarak belirlendi (Şekil 7. 82).



Şekil 7. 82 Farklı donörlerde yüksek glukoz DMEM + % 20 Hyclone serum içeren kültür ortamında periferik kan mezenkimal kök hücre oranı (Mononükleer hücre izolasyonu sonrası 14. gün)

Kültürü yapılan hücrelerin Flow Sitometrik olarak immünofenotiplendirilmesinde 10.000 hücre kullanılmıştır.

Yapılan bir çalışmada STRO-1 antikorlarıyla kaplanmış manyetik boncuklar kullanılarak periferik kandan manyetik olarak aktive edilmiş hücre ayırma yöntemiyle mezenkimal kök

hücreler izole edilmiştir. 10^7 mononükleer hücreden yaklaşık olarak 30 stromal koloni elde edilmiştir. Fakat kültürün birinci haftasında tüm koloniler spontan olarak ölmüştür. Kolonilerin ölmesinin, periferik kanda bulunan sitotoksik T hücrelerinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu yüzden periferik kan mesenkimal kök hücre benzeri (PBMKH -like) hücrelerin bulunduğu kültür koşulları kemik iliği mesenkimal kök hücrelerinkinden farklı olabilir. Aynı şekilde yaptığımız çalışmada yoğunluk gradiyent farkıyla periferik kandan izole ettiğimiz mononükleer hücrelerin kültüründe periferik kan mesenkimal kök hücre benzeri hücreler görüldü. Fakat kültürün birinci haftası sonunda bu hücrelerin dejenereolduğu ölmeye başladığı tespit edildi. Ayrıca kültürün 14. gününde yapılan Flow Sitometrik analizlerde CD34-/CD90+ hücrelerin bulunmaması literatüre benzer olarak mesenkimal kök hücrelerin ölmesinin nedeninin sitotoksik T hücreleri olabileceğini göstermektedir.

Tartışma

Son yıllarda kök hücre çalışmalarına ilgi giderek artmaktadır. Bunun nedeni, kök hücrelerin sahip oldukları farklılaşma özellikleri ile çeşitli doku ve organları oluşturan hücrelere dönüşebilme potansiyelleridir. Kök hücreler bu özellikleri ile, rejeneratif tıp gibi yeni bir bilim dalının gelişmesine neden olmuştur. İleride rejeneratif tıbbın daha da gelişmesi, günümüzde tedavisi mümkün olmayan Alzheimer, Parkinson, diyabet, kanser gibi hastalıkların hücresel tedavisine, doku mühendisliği ile yeni doku ve organların elde edilmesine imkan verebilir (O'Brien vd., 2006; Kurtzberg, 2009).

Günümüzde kök hücre çalışmalarında kordon kanı kök hücrelerinin kullanımına daha çok önem verilmektedir. Bunun nedeni, daha önce de belirtildiği gibi, klinik uygulamalarda kullanılacak 4 temel kök hücre kaynağından biri olan kordon kanının, kemik iliği, periferik kan ve yağ dokusu ile kıyaslandığında daha genç hücreleri içermesi, yaşayabilme yeteneklerinin yüksek olması, fazla sayıda elde edilebilir olmaları ve immünolojik karakter bakımından alıcıya kolay uyum sağlamaları gibi olumlu özelliklere sahip olmasıdır. Doğumdan sonra kordon veninden elde edilebilen bu kök hücre kaynağı, uzun süre saklanabilmekte ve hem otolog hem de allojenik transplantasyona uygun olması nedeniyle klinik kullanımda tercih edilmektedir. İnsan göbek kordon kanı kök hücreleri ayrıca etik tartışmalara yol açmadan ve verici açısından fazladan bir cerrahi müdahale gerektirmeden kolayca elde edilebilir (Newcomb vd., 2007; Buzanska ve Lukomska, 2008). Bunun yanında kordon kanı yeteri kadar mezenkimal kök hücre içermemektedir. Yapılan çalışmalarda kordon kanında 1:2.000.000 mezenkimal kök hücre bulunduğu bildirilmiştir (Sarugaser vd., 2005). Bu miktar doku mühendisliği çalışmaları ve klinik uygulamalar için oldukça yetersizdir. Bu nedenle, kordon kanından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin kültürünün yapılması ve yeterli miktarda mezenkimal kök hücre elde edilmesi oldukça önemlidir. Literatürde kordon kanı kök hücreleri ile yapılan çalışmalar çoğunlukla hematopoetik kök hücrelerin izlasyonu ve kültürünün yapılmasına yöneliktir. Ülkemizde ise bu konu ile ilgili çalışmalar ancak hematopoetik kök hücrelerin kültürünün değil, izole edilip transplantasyonuna yöneliktir.

Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, uyarılmış periferik kanda kemik iliğinden daha fazla tek çekirdekli hücre olduğu gösterilmiştir. Bu sebepten, periferik kan kök hücrelerinin kemik iliğine alternatif olarak kullanımına yönelik yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Kemik iliğinden mobilize edilen kök hücrelerin periferik kana geçmelerinden sonra izolasyonu yapılır. Son yıllarda izolasyonu yapılan bu kök hücreler ile hayvan ve

insanlarda farklılaşma ve rejenerasyon çalışmaları da yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, periferik kandan elde edilen kök hücrelerin *in vitro* şartlarda hematopoetik, nöral ve kardiyak hücrelere dönüşebildiği gösterilmiştir (Kansu, 2006; Zvaifler, 2000). Bu nedenle, periferik kanda mezenkimal kök hücre oranı çok az olmasına rağmen, kolaylıkla elde edilebilmesi ve ön çalışmalar için uygun olması sebebiyle kullanımı önerilmektedir. Buna göre de biz çalışmamızda 30 farklı donör periferik kanından mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve kültürünün yapılmasını inceledik. Çalışmamız sonunda periferik kanda oldukça az sayıda mezenkimal kök hücre olduğu tespit edildi.

Yapılan bir çalışmada STRO-1 antikorlarıyla kaplanmış manyetik boncuklar kullanılarak periferik kandan manyetik olarak aktive edilmiş hücre ayırma yöntemiyle mezenkimal kök hücreler izole edilmiştir. Çalışma sonucunda, 10^7 mononükleer hücreden yaklaşık olarak 30 stromal koloni elde edilmiştir. Fakat kültürün birinci haftasında tüm koloniler spontan olarak ölmüştür. Kolonilerin ölmesinin, periferik kanda bulunan sitotoksik T hücrelerinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu yüzden periferik kan mezenkimal kök hücre benzeri hücrelerin bulunduğu kültür koşulları kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinkinden farklı olabilir (Bian vd., 2009). Benzer şekilde, yaptığımız çalışma sonucunda Ficoll ile periferik kandan izole ettiğimiz mononükleer hücrelerin kültüründe periferik kan mezenkimal kök hücre benzeri hücreler görüldü. Fakat kültürün birinci haftası sonunda bu hücrelerin dejenere olduğu tespit edildi. Ayrıca kültürün 14. gününde yapılan Flow Sitometrik analizlerde CD34-/CD90+ hücrelerin bulunmaması literatüre benzer olarak mezenkimal kök hücrelerin ölmesinin nedeninin sitotoksik T hücreleri olabileceğini göstermektedir.

Kordon kanından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin kültürünün yapılmasına ait dünyada yapılan birçok çalışma bulunmasına rağmen kordon kanından izole edilen kök hücrelerin kültürünün yapılmasında halen ciddi sorunlar bulunmaktadır. Bunun çeşitli nedenleri vardır. En önemli nedeni kordon kanındaki mezenkimal kök hücre sayısının çok az miktarda olması, her donörden elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin kültürünün yapılmasının mümkün olmamasıdır. Öyle ki, yapılan çalışma sonuçlarına göre, alınan 100 kordon kanı örneğinden yaklaşık 7 tanesinden mezenkimal kök hücre izolasyon sağlanabilmiştir (Laitinen ve Laine, 2007; Zeddou vd., 2010). Diğer bir önemli neden ise, şimdiye kadar kordon kanından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* kültür ortamına etki eden çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin yeteri kadar incelenmemesi, ayrıca donöre bağlı olarak hücrelerin kültürde farklılık göstermesinin nedenlerinin şimdiye kadar belirlenmemiş olmasıdır.

Buna göre de biz bu çalışmamızda farklı donörlerin kordon ve periferik kanından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin izolasyonuna, kültür ortamına adaptasyonuna ve proliferasyonuna etki eden çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörleri inceledik. Bu amaçla ilk kez olarak farklı donörlerden elde edilen periferik ve kordon kanından mezenkimal kök hücrelerin izolasyonuna, *in vitro* kültürde adaptasyonunda ve proliferasyonuna etki eden fiziksel, kimyasal ve donöre bağlı faktörlerin etkisi incelendi. Hedefe ulaşmak için öncelikle farklı donörlerden izole edilen kordon kanı ve mezenkimal kök hücrelerin immünofenotip özellikleri incelendi. Yapılan çalışma sonuçları gösterdi ki kordon kanında izolasyondan önce izolasyonda ve kültürde sırasıyla 0,04, 1,22, 10,22 MKH bulunmaktadır. Bu oran periferik kanda 0,001'dir. Elde edilen sonuçlar literatürde belirtilen kordon kanı ve periferik kanda bulunan mezenkimal kök hücre miktarı sonuçlarını desteklemektedir.

Kordon kanı mezenkimal kök hücreleri ile birçok çalışma yapılmasına rağmen, literatürde bu hücrelerin izolasyonunda ve *in vitro* kültürünün yapılmasında kullanılan farklı parametrelerin karşılaştırılması ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden kordon kanından mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunda kullanılan yöntemlerin, hücrelerin adaptasyonu ve uzun süreli kültürünün yapılması için, kültür ortamında hücre proliferasyonuna etki eden çeşitli etkenlerin (büyüme faktörleri, serum, glukoz konsantrasyonu, L-Glutamin konsantrasyonu, besiyerleri vb.) incelenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada ilk kez olarak kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonunda, santrifügasyon, eritrosit lizis tamponu kullanma ve farklı santrifüj hızlarında Ficoll yoğunluk gradienti ile ayırma yöntemleri karşılaştırılmış, ayrıca mezenkimal kök hücrelerin adaptasyonu ve uzun süreli kültürünün yapılmasında IMDM, düşük (1 g/L) ve yüksek glukoz (4,5 g/L) içeren DMEM, otolog serum, düşük konsantrasyonda immünooglobulin G (IgG) içeren Hyclone serum ve hücrelerin tutunduğu plastik yüzey yapısının etkisi incelenmiştir.

Literatürde mezenkimal kök hücrelerin kemik iliği, periferik kan ve kordon kanında çok düşük oranda bulunduğu belirtilmiştir (Wexler vd., 2002). Bu nedenle yapılan bir çalışmada kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu ve proliferasyonu için optimum kültür koşulları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu ve proliferasyonu için farklı besiyerleri, düşük ve yüksek glukoz konsantrasyonları, fetal sığır serumu, L-Glutamin konsantrasyonu, ekilen mononükleer hücrelerin yoğunluğu ve hücrelerin ekildiği kültür kaplarının plastik yüzey yapısının etkisi incelenmiştir. Buna göre, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin, izolasyondan sonra

DMEM besiyerindeki proliferasyonunun, IMDM besiyeri içeren ortamdaki proliferasyondan daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Sotiropoulou vd., 2006). Kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin kültüründe çeşitli besiyerleri (α -MEM, DMEM, IMDM, RPMI) kullanılmaktadır. Ancak kullanılan bu besiyerlerinin kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonuna ve adaptasyonuna etkisi ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Buna göre de biz bu çalışmada ilk kez diğer çalışmalardan farklı olarak kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kültüründe IMDM ve DMEM besiyerinin, izolasyon ve proliferasyona etkisini inceledik. Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre; izole edilen kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin DMEM besiyeri ile hazırlanan besiyerinde IMDM besiyeri ile hazırlanan besiyerinden daha yüksek proliferasyon gösterdikleri belirlendi. Böylece bu çalışmada ilk kez olarak DMEM besiyeri ile kültürü yapılan kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin en iyi sonucu verdiği gösterildi. Elde edilen bu sonuçlar literatürde DMEM besiyerinin kemik iliği MKH'lerinin proliferasyonunu arttırdığı sonucunu desteklemektedir.

Ayrıca düşük glikoz (1g/L) DMEM ile yüksek glukoz (4,5 g/L) DMEM içeren kültür ortamının, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyon sonrası proliferasyonuna etkisinin incelendiği çalışmada, düşük glikozlu DMEM içeren ortamın, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Sotiropoulou vd., 2006). Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre, düşük konsantrasyonda glikoz içeren DMEM besiyeri ile izole edilen mezenkimal kök hücrelerinin, morfolojik olarak karşılaştırıldığında yüksek glikoz konsantrasyonuna sahip DMEM besiyeri içeren kültür ortamındaki hücrelere göre daha sağlıklı morfolojiye sahip oldukları, ayrıca hücrelerin kültür ortamında daha uzun süre sağlıklı hücre morfolojilerini korudukları gözlemlendi. Yapılan Flow Sitometrik analiz sonuçları da düşük konsantrasyonda glikoz içeren DMEM besiyeri ile kültürü yapılan kordon kanı mononükleer hücrelerindeki mezenkimal kök hücre miktarının (%10) yüksek glikoz konsantrasyonuna sahip DMEM besiyeri ile kültürü yapılan kordon kanı mononükleer hücrelerindeki mezenkimal kök hücre miktarından (%7) daha yüksek oranda olması morfolojik sonuçlarımızı destekledi. Yaptığımız bu çalışma sonuçları literatürde düşük glikoz konsantrasyonu içeren DMEM besiyerinin kemik iliği MKH'lerinin proliferasyonunu arttırdığı sonucunu desteklemektedir.

Mezenkimal kök hücre izolasyonu ve kültürü için kullanılan fetal sığır serumunun (FBS) içeriğinin tam olarak bilinmemesi, serumun virüs transmisyonu, prion hastalıkları açısından risk taşıması ve bazı proteinlere karşı istenmeyen immün yanıt oluşturması önemli bir

problemdir. Bu nedenle yapılan birçok çalışmada FBS'ye alternatif olarak mezenkimal kök hücre kültürü için otolog ve allojenik serum kullanılmıştır. Çalışmaların sonuçlarına göre, insan mezenkimal kök hücreleri, otolog serum içeren kültür ortamında FBS'ye göre daha hızlı proliferasyon olmalarına rağmen allojenik serum bulunan kültür ortamında bir süre sonra canlılıklarını kaybetmişlerdir. Ayrıca FBS bulunan kültür ortamında kök hücrelerin daha kolay farklılaştıkları görülmüştür (Shahdadfar vd., 2005). Kök hücreler organizmada ancak ihtiyaç duyulan durumlarda diğer hücre tiplerine farklılaşırlar. Bu farklılaşma, kök hücrelerin *in vivo* farklılaşmayı düzenleyen sinyal molekülleri tarafından uyarılmaları ile mümkün olur. Buna karşın *in vitro* kültür ortamlarında, kök hücrelerin uzun süre farklılaşmaması gereken çalışmalarda, kültür ortamına farklılaşmayı baskılayacak faktörler eklenir (bFGF, LIF REF). Büyüme faktörleri açısından zengin bir kaynak olan serumun içeriğindeki maddelerin henüz tam olarak aydınlatılmamış olması, kültürde devam eden mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasına neden olabilir. Kültürde kullanılan serumların bu endişe verici potansiyelleri sebebiyle, mezenkimal kök hücrelerin kültüründe kullanılacak olan en uygun serumun belirlenmesi amacıyla çalışmamızda, kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu ve kültüründe, düşük konsantrasyonda immünoglobulin G (IgG) içeren Hyclone FBS, FBS ve otolog serumun etkisi karşılaştırıldı. Otolog serum ile kültürü yapılan kordon kanı mononükleer hücrelerinin, FBS ile kültürü yapılan hücrelere göre daha fazla proliferasyon oldukları ve daha sağlıklı morfoloji gösterdikleri belirlendi. Ancak düşük konsantrasyonda immünoglobulin G (IgG) içeren Hyclone serum ile kültürü yapılan kordon kanı mononükleer hücrelerinin, otolog serum ile kültürü yapılan hücrelerden daha fazla proliferasyon oldukları gözlemlendi. Ayrıca düşük konsantrasyonda immünoglobulin G (IgG) içeren Hyclone serum bulunan besiyerinde hücrelerin sağlıklı hücre morfolojilerini daha uzun süre sürdürdükleri belirlendi. Bu çalışma ilk kez olarak kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kültüründe düşük konsantrasyonda immünoglobulin G (IgG) içeren Hyclone serumun etkisi belirlenmiş oldu.

Daha önce de belirtildiği gibi, kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin kültürünün yapılmasında en çok karşılaşılan problemlerden bir tanesi mezenkimal kök hücrelerin miktarının az olmasına bağlı olarak izole edilen kök hücrelerin yoğunluğunun da düşük olmasıdır. Bu nedenle kök hücrelerin izolasyonlarında Ficoll, eritrosit lizis ve santrifügasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Kök hücrelerin izolasyonunda hücrelerin en yüksek konsantrasyonda izole edildiği yöntemin belirlenmesi için çalışmamızda bu 3 yöntemin etkisini inceledik.

Kordon kanından mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunda aynı zamanda fiziksel faktörlerden olan santrifüj hızı da oldukça önemlidir.

Kandan mononükleer hücrelerin izolasyonu için en çok kullanılan yöntem, Ficoll ile yoğunluk gradienti oluşturularak yapılan izolasyon yöntemidir. Bu yöntemde santrifüj sonunda yoğunluğu en fazla olan eritrositler (1,12–1,09 g/mL) en alta çökerken, eritrositlerin üzerinde yoğunluğu daha düşük olan Ficoll (1,07 g/mL) ve en yukarıdaki plazma arasında bir sis bulutu şeklinde mononükleer hücreler (1,07–1,05 g/mL) yer alır. Yapılan çalışmalarda Ficoll yöntemi ile mononükleer hücre izolasyonu için farklı santrifüj hızları kullanılmasına rağmen, optimum santrifüj hızının belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada literatürde Ficoll yoğunluk gradienti yöntemi ile yapılan izolasyonlarda kullanılan en düşük ve en yüksek santrifüj hızları karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, yüksek santrifüj hızı ile yapılan izolasyon ile kültürde oldukça düşük oranda eritrosit bulunduğu ve homojen hücre sayısının düşük santrifüj hızı ile ayırma yöntemine göre daha fazla olduğu belirlendi. Böylece bu çalışma ile ilk kez olarak homojen bir mononükleer hücre izolasyonu için optimum santrifüj hızının 900xg olduğu belirlendi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Oyama'nın (2008) çalışmasına uygun geldiği halde Reddy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya (2009) uygun gelmemiştir.

Ayrıca literatürde Ficoll'ün hücreler üzerine toksik etkisinden dolayı kandan mononükleer hücre izolasyonunda santrifügasyon yöntemi kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntem ile yapılan izolasyonda mononükleer hücre yüksek oranda eritrosit içerdiğinden dolayı iyi bir ayırım sağlanamamaktadır. Yaptığımız çalışmada, santrifügasyon yöntemi ile izole edilen mononükleer hücrelerin kültür ortamındaki yüksek eritrosit varlığından dolayı, daha az sayıda hücrenin flask yüzeyine tutunabildiği ve proliferasyonun oldukça düşük olduğu belirlendi. Bu nedenle hem periferik hem de kordon kanından Ficoll yöntemi ile mononükleer hücre izolasyonunun, santrifügasyon yönteminden daha iyi sonuç verdiği belirlendi.

Yüzeye tutunarak çoğalan hücrelerin kültür ortamında gelişmelerini etkileyen bir diğer faktör ise, kültür flasklarının plastik yüzey yapı özellikleridir. Bu nedenle çalışmamızda kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve proliferasyonuna etki eden fiziksel faktörlerden bir diğeri olan flask yüzeyinin etkisi incelenmiştir. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin kültürünün yapıldığı kültür flasklarının plastik yüzey yapısının, mezenkimal kök hücrelerin izolasyonuna, proliferasyonuna ve uzun süreli kültürüne etkisinin incelendiği bir çalışmada, farklı marka flasklar kullanılarak kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin kültürü için en uygun ticari hücre kültür flaskı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, Falcon marka flaskların

yüzeyinde diğer marka flaslara göre, daha fazla sayıda mezenkimal kök hücrenin tutunduğu, böylece izolasyon ve proliferasyon için Falcon marka flaslara daha uygun olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada, kordon kanı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve kültürü için TPP ve Falcon marka flaslara kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Falcon marka flaslara, sadece kemik iliğın için değil aynı zamanda kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerin yüzeye tutunması, izolasyonu ve proliferasyonu için de, TPP marka flaslardan daha uygun olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak bu çalışmada kordon kanı mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu için optimum ayırma yöntemi, adaptasyonu için ise optimum kültür koşulları belirlendi. Buna göre, kordon kanından mononükleer hücre izolasyonu için 900xg hızı ile yapılan Ficoll yönteminin daha homojen morfolojiye sahip hücre popülasyonu elde etmede en iyi sonucu verdiği, izolasyon, adaptasyon ve devamlı kültürün yapılmasında Falcon marka flaslarda +%15 HyClone serum ve 1g/mL konsantrasyonda glikoz içeren DMEM besiyerinin, kordon kanı mezenkimal kök hücreleri için en uygun kültür ortamı olduğu belirlendi. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlar, TÜBİTAK tarafından yayınlanan 2003–2023 Teknoloji Öngörü Çalışmasında, Türkiye’de kök hücre teknolojilerinin geliştirilmesi ve kök hücrelerin özellikle rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılabilir hale gelmesi gerekliliği talebine de uygun olarak yapılmıştır.

KAYNAKLAR

Adachi K., Suemori H., Yasuda S.Y., Nakatsuji N. ve Kawase E., (2010), “Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells”, *Genes Cells*, 15,455-470

Amit M. ve Itskovitz-Eldor J., (2009), “Embryonic stem cells: isolation, characterization and culture”, *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 114:173-84.

Appelbaum, F.R. (1996), “The Use of Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in the Treatment of Cancer”, *Cancer Journal For Clinicians*, 46 : 142 – 164

Appelbaum, F.R., (1996), “The Use of Bone Marrow And Peripheral Blood Stem Cell Transplantation In The Treatment of Cancer”, *A Cancer Journal For Clinicians*, 46(3):142-64.

Atala A., (2009), “Engineering organs”, *Curr Opin Biotechnol.*, 20(5):575-592.

Baker F.J. ve Breach M.R., (1980), “Medical Microbiology Techniques”, 259-62, 324-29, Great Britain.

Barlow S., Brooke G., Chatterjee K., Price G., Pelekanos R., Rossetti T., Doody M., Venter D., Pain S., Gilshenan K. ve Atkinson K., (2008), “Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells”, *Stem Cells Dev.*, 17(6):1095-107.

Baxter, M.E., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J, Ed., Fairbairn, L.J. ve Bellantuono, I. (2004), “Study Of Telomere Length Reveals Rapid Aging Of Human Marrow Stromal Cells Following In Vitro Expansion”, *Stem Cells*, 22:675-682.

Bey, E., Prat, M., Duhamel, P., Benderitter, M., Brachet, M., Trompier, F., Battaglini, P., Ernou, I., Boutin, L., Gourven, M., Tissedre, F., Créa, S., Mansour, C.A., De Revel, T., Carsin, H., Gourmelon, P. ve Lataillade, J.J. (2010), “Emerging Therapy For Improving Wound Repair Of Severe Radiation Burns Using Local Bone Marrow-Derived Stem Cell Administrations”, *Wound Repair and Regeneration*, 1:50-8.

Bian ZY, Li G, Gan YK, Hao YQ, Xu WT, Tang TT. (2009) “Increased number of mesenchymal stem cell-like cells in peripheral blood of patients with bone sarcomas”. *Arch Med Res.* Apr;40(3):163-8.

Bieback, K., Kern, S., Kluter, H. Ve Eichler, H., 2004, “Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood”, *Stem Cells*, Vol.22, pp. 625-634.

Biol Cell. Jun;21(11):1783-7. Epub 2010 Apr 7. PubMed PMID: 20375149.

- Bobis, S., Jaroča, D. ve Majka, M. (2006), “Mesenchymal Stem Cells: Characteristics And Clinical Applications”, *The Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44:215-230.
- Bosse R., Kulmburg P., von Kalle C., Engelhardt M., Dwenger A., Rosenthal F. ve Schulz G., (2000), “Production of stem-cell transplants according to good manufacturing practice”, *Ann Hematol.*, 79(9):469-76.
- Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R., (2006). “Molecular control of pluripotency”. *Curr Opin*
- Bøyum, A. ve Scand (1968), “Isolation Of Lymphocytes, Granulocytes And Macrophages”, *Journal Of Clinical And Laboratory Investigation*, 97:77.
- Brand, K., Feki, W., Hintzertn, J., Von Langer, K., Lupp, P. ve Schroener, C. (1989), *Metabolism* 38, 29.
- Brayfield C, Marra K, Rubin JP., 2010 “Adipose stem cells for soft tissue Regeneration”. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* Apr;42(2):124-8. Epub 2010 Mar 29. PubMed PMID: 20352575.
- Brignier A.C. ve Gewirtz A.M., (2010), “Embryonic and adult stem cell therapy”, *J Allergy Clin Immunol.*, 125(2 Suppl 2):S336-44.
- Brignier A.C. ve Gewirtz A.M., (2010), “Embryonic and adult stem cell therapy”, *J Allergy Clin Immunol.*, 125(2 Suppl 2):S336-44.
- Butler, Michael, Christie ve Andrew (1994), “Adaptation of Mammalian Cells to Ammonogenic Media”, *Cytotechnology*, 15: 87-94.
- Buzanska, L. ve Lukomska, B. (2008), “A Novel, Neural Potential Of Non-Hematopoietic Human Umbilical Cord Blood Stem Cells”, *The International Journal of Developmental Biology*, 52: 237-248
- Can, A. (2008), “Erişkin Kök Hücrelerin Farklanmasındaki Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar”, *Sağlıkta Birikim*, Cilt 1 Sayı 5
- Can, A. ve Karahuseyinoglu, S., (2007), “Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma With Regard To The Source Of Fetus-Derived Stem Cells”, *Stem Cells*, 25:2886-2895
- Chang, Y., Hsieh, P.H. ve Chao, C.C. (2009), “The Efficiency Of Percoll And Ficoll Density Gradient Media İn The İsolation Of Marrow Derived Human Mesenchymal Stem Cells With Osteogenic Potential”, *Chang Gung Medical Journal*, 3:264-75.

Chantler, C., Baum, J.D., Wigglesworth, J.S. ve Scopes, J.W., (1969), “Giant Umbilical Cord Associated With A Patent Urachus And Fused Umbilical Arteries”, *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth*, 76: 273-4. 2.

Christie, A. ve Butler, M. (1994), “Growth and Metabolism of a Murine Hybridoma in Cultures Containing L-Glutamine-based Dipeptides”, *Focus*, 16:1-9.

Da Sacco, S., Sedrakyan, S., Boldrin, F., Giuliani, S., Parnigotto, P., Habibian, R., Warburton, D., De Filippo, R.E. ve Perin, L., (2010), “Human Amniotic Fluid As A Potential Newsorce Of Organ Specific Precursor Cells For Future Regenerative Medicineapplications”, *The Journal of Urology*, 3:1193-200.

Dabbah, R. (2004), “Recommendations For Ancillary Materials”, *United States Pharmacopeia Chapter :1043*.

Darr H. ve Benvenisty N., (2006), “Human embryonic stem cells: the battle between self-renewal and differentiation”, *Regen Med.*, 1(3):317-25.

de Kretser D. J (2007), “Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology”, *Law Med.*, 15(2):212-8.

de Kretser D.J. (2007), “Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology”, *Law Med.*, (2):212-8.

de Villiers J.A., Houreld N. ve Abrahamse H., (2009), “Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine”, *Stem Cell Rev.*, 5(3):256-65.

Demirer, T., Buckner, C.D. ve Bensinger, W.I. (1996), “Optimization Of Peripheral Blood Stem Cell Mobilization”, *Stem Cells*, 1:106-16.

Dobreva, M.P., Pereira, P.N., Deprest, J. ve Zwijsen, A., (2010), “On The Origin Of Amniotic Stemcells: Of Mice And Men”, *The International Journal of Development of Biology*, 5:761-77

Domanskajanik, K., Buzanska, L. Ve Lukomska, B., (2008), “A Novel, Neural Potential Of Non-Hematopoietic Human Umbilical Cord Blood Stem Cells”, *International Journal of Developmental Biology*, 52: 237-248.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. (2006), “Minimal Criteria For Defining Multipotent

Mesenchymal Stromal Cells”, The International Society for Cellular Therapy position statement: *Cytotherapy*, 4:315-7.

Doyle A., Griffiths J.B. ve Newell D.G., (1995), “Cell and Tissue Culture”, *Laboratory Procedures*. John Wiley and Sons Ltd, 3A:1.1,4C:1.1-4D:1.1, England.

Duan, X., Kang, E., Liu, C.Y., Ming, G.L. ve Song, H., (2008), “Development Of Neural Stem Cell In The Adult Brain”, *Curr Opin Neurobiol*, 18(1):108-15.

Dulbecco, R. ve Freeman, G., (1959), “Plaque Production by the Polyoma Virus”, *Virology*, 8: 396-397.

Epicardial Stem Cell Niche”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14: 4.

Estrov Z., (2009), “Stem cells and somatic cells: reprogramming and plasticity”, *Clin Lymphoma Myeloma.*, 3:S319-28.

Feng, J.X., La, X.L., Ma, Y., Bi, X.J. ve Wen, H., (2009), “Isolation Of Human Pluripotent mesenchymal Stem Cells From Second-Trimester Amniotic Fluid Using Two Kinds Of culture Protocol And Their Differentiation Into Neuron-Like Cells”, *Zhongguo WeiZhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 12:729-33. Chinese.

Ficoll-Paque (1983), “Excellent Publication That DEKHribes The Theory And Application Of Ficoll-Paque For Isolation Of Lymphocytes.”, For in vitro isolation of lymphocytes (booklet) Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden.

Finegold S.M. ve Baron E.J.,(1986), “Diagnostic Microbiology”, The C V Mosby Company, 643-46, USA.

Freshney R.I., (1986), “Animal Cell Culture”, 13-33, 71-8, England.

Freshney R.I., (1987), “Culture of Animal Cells”, Alan R. Liss, Inc, 15-47, 57-84, 107-26 , USA.

Friedenstein, A. J., Gorskaja, J.F. ve Kulagina, N.N. (1976), “Fibroblast Precursors In Normal And Irradiated Mouse Hematopoietic Organs”, *Experimental Hematology*, 4:267-74.

Galende, E., Karakikes, I., Edelmann, L., Desnick, R.J., Kerenyi, T., Khoueiry, G., Lafferty, J., McGinn, J.T., Bromdan, M., Fuster, V., Hajjar, R.J. ve Pogljar, K., (2009), “Amniotic Fluid Cells Are More Efficiently Reprogrammed to Pluripotency Than Adult Cells. Cloning Stem Cells”, *Cellular Reprogramming*.

Gargett, C.E., (2007), “Review Article: Stem Cells In Human Reproduction”, *Reproductive Sciences*, 5:405-24.

Genet Dev. Oct;16(5):455-62. Epub 2006 Aug 22. Review. PubMed PMID: 16920351.

Gherghiceanu, M. ve PopEKHu, L.M. (2010), “Cardiomyocyte Precursors And Telocytes In Gorin NC, Piantadosi S, Stull M, Bonte H, Wingard JR, Civin C. Increased risk of lethal graft-versus-host disease-like syndrome after transplantation into NOD/SCID mice of human mobilized peripheral blood stem cells, as compared to bone marrow or cord blood. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002 Apr;11(2):277-92. PubMed PMID: 11983099.

Gorka, B., Skubis-Zegadlo, J., Mikula, M., Bardadin, K., Paliczka, E. ve Czarnocka, B. (2007), “NrCAM, A Neuronal System Cell-Adhesion Molecule, Is Induced In Papillary Thyroid Carcinomas”, *British Journal Of Cancer*, 4:531-8.

Gotherstrom, C., West, A., Liden, J., Uzunel, M., Lahesmaa, R. ve Le Blanc, K. (2005), “Difference In Gene Expression Between Human Fetal Liver And Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells”, *Haematologica*, 90:1017-1026

Grove, J.E., Bruscia, E. ve Krause, D.S. (2004), “Plasticity Of Bone Marrow-Derived Stem Cells”, *Stem Cells*, 4:487-500.

Hassan, H.T. ve El-Sheemy, M. (2004), “Adult Bone-Marrow Stem Cells And Their Potential In Medicine”, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97:465–471

Hassell, T., Gleave, S., ve Butler, M. (1991), “Growth Inhibition in Cell Culture”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30:30–41.

Hodgkinson T., Yuan X.F. ve Bayat A., (2009), “Adult stem cells in tissue engineering”, *Expert Rev Med Devices.*, 6(6):621-40.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S. ve Keating, A. (2005), “Clarification Of The Nomenclature For MKH : The International Society For Cellular Therapy Position Statement Cytotherapy”, *International Society for Cellular Therapy*, 5:393-5.

Houck J.C., Sharma V.K. ve Hayflick L., (1971), “Functional failures of cultured human diploid fibroblasts after continued population doublings”, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 137(1):331-3.

Hughes, W.T. ve BuEKHher, E.T. (1980), "Collection of Blood Specimens", In *Pediatric Procedures*, pp. 57-65. W.B. Saunders, New York.

Huss R, Lange C, Weissinger EM, Kolb HJ, Thalmeier K., 2000. "Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics". *Stem Cells.*;18(4):252-60. PubMed PMID: 10924091.

Iscove, N.N ve Melchers, F. (1978), "Complete Replacement of Serum by Albumin, Transferrin, and Soybean Lipid in Cultures of Lipopolysaccharide-Reactive B Lymphocytes". *J. Exp. Medicine.* 147, 923-933.

Iscove, N.N., Guilbert, L.J. ve Weyman, C. (1980), "Complete Replacement of Serum in Primary Cultures of Erythropoietin-Dependent Red Cell Precursors [CFU-E] by Albumin, Transferrin, Iron, Unsaturated Fatty Acid, Lecithin and Cholesterol". *Exp. Cell Research.* 126, 121-126.

Isenberg H.D., (1992), "Clinical Microbiology Procedures Handbook American Society for Microbiology", 8, 19 1-8. 20.20, USA.

İnan, S. ve Özbilgin, K., (2007), "Kök Hücre : Biyolojik ve Klinik Yaklaşım", *Sağlıkta Birlik Dergisi Cilt 1 Sayı 5.*

Jiang ,Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. ve Verfail-lie, C.M. (2002), "Pluripotency Of Mesenchymal Stem Cells Derived From Adult Marrow", *Nature*, 418:41-9.

Johnson B.V., Shindo N., Rathjen P.D., Rathjen J. ve Keough R.A., (2008), "Understanding pluripotency--how embryonic stem cells keep their options open" *Mol Hum Reprod.*, 14(9):513-20.

Kang K-S, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim K-Y, et al. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy*, 7(4):368-373, 2005.

Kansu E., (2006). "Erişkin Kök Hücreleri: Pluripotency ve Kendini Yenileme Kavramları", II. Current Perspectives on Stem Cell Biology and Clinical Applications Symposium/Türkiye

Bilimler Akademisi-Kök Hücre Çalışma Grubu, pp.10-13.

Kaplan, J., Nolan, D., ve Ree, A. (1982), "Altered Lymphocyte Markers And Blastogenic Responses Associated With 24 Hour Delay In Processing Of Blood Samples", *Journal Immunology Methods*50:187-191

Katsumoto K., Shiraki N., Miki R. ve Kume S., (2010), "Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation", *Dev Growth Differ.*, 52(1):115-29.

Kawasaki-Oyama, R.S., Braile, D.M., Caldas, H.C., Leal, J.C., Goloni-Bertollo, E.M., Pavarino-Bertelli, E.C., Abbud, M. ve Santos, I.D. (2008), "Blood Mesenchymal Stem Cell Culture From The Umbilical Cord With And Without Ficoll-Paque Density Gradient Method", *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 1:29-34.

Keller R., (2002), "Stem cells on the way to restorative medicine", *Immunol Lett.*, 1;83(1):1-12.

Kent L., (2009), "Culture and maintenance of human embryonic stem cells", *J Vis Exp. ...?*

Khan, A., Parveen, N., Habeeb, M.A. ve Habibullah, C.M., (2006), " Journey From Hepatocyte Transplantation To Hepatic Stem Cells: A Novel Treatment Strategy For Liver Diseases", *Indian Journal of Medical Research*, 5:601-14.

King C.C., (2010), "Culture and preparation of human embryonic stem cells for proteomics-based applications", *Methods Mol Biol.*, 584:151-77.

Koç., N., Gerson, L., Cooper, B., Dyhouse, S., Haynesworth, S., Caplan, A. ve Lazarus, H., (2000), "Rapid Hematopoietic Recovery After Coinfusion of Autologous-Blood Stem Cells and Culture-Expanded Marrow Mesenchymal Stem Cells in Advanced Breast Cancer Patients Receiving High-Dose Chemotherapy", *Journal of Clinical Oncology*, 18: 2.

Koneman W.E., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. ve Winn W.C., (1992), "Diagnostic Microbiology", J.B. Lippincot Company, 1010-16.

Körbling, M. ve Anderlini, P. (2001), "Peripheral Blood Stem Cell Versus Bone Marrow Allotransplantation: Does The Source Of Hematopoietic Stem Cells Matter?", *Blood Journal*, 15:2900-8.

Kucia, M., Wu, W. ve Ratajczak, M.Z. (2007), "Bone Marrow-Derived Very Small Embryonic-Like Stem Cells: Their Developmental Origin And Biological Significance",

Developmental Dynamics, 12:3309-20.

Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA., (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells". *Cell*. Sep 23;122(6):947-56. PubMed PMID: 16153702.,

Laitinen A. ve Laine J., (2007), "Isolation of mesenchymal stem cells from human cord blood", *Curr Protoc Stem Cell Biol.*, 2:(2A.3).

Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomson, J. ve West, M. (2004), "Handbook of Stem Cells", Embryonic Stem cells, Volume 1, Elsevier Academic Press

Laywell, E.D., Rakic, P., Kukekov, V.G., Holland, E.C. ve Steindler, D., (2000), "Identification Of A Multipotent Astrocytic Stem Cell In The Immature And Adult Mouse Brain" *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 25:13883-8.

Lee O.K., Kuo T.K., Chen W.M., Lee K.D., Hsieh S.L. ve Chen T.H., (2004), "Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood", *Blood.*, 103(5):1669-75.

Lee, K.D. (2008), "Applications Of Mesenchymal Stem Cells: An Updated Review", *Chang Gung Medical Journal*, 3:228-36.

Lengner C.J. ve Ann N.Y., (2010), "iPS cell technology in regenerative medicine", *Acad Sci.*, 1192(1):38-44.

Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., Yu, H., Xu, X., Kong, J., Lee, J.T. ve Herlyn, M. (2010), "Human Dermal Stem Cells Differentiate Into Functional Epidermal Melanocytes", *Journal of Cell Science*, 15:853-60.

Li, H.C., Stoicov, C., Rogers, A.B. ve Houghton, J. (2006), "Stem Cells And Cancer: Evidence For Bone Marrow Stem Cells In Epithelial Cancers", *World Journal of Gastroenterology*, 3:363-71.

Lin, T., Islam, O. ve Heese, K. (2006), "ABC Transporters, Neural Stem Cells And Neurogenesis--A Different Perspective", *Cell Research*, 11:857-71.

Liu Z.C. ve Chang T.M., (2010), "Artificial cell microencapsulated stem cells in regenerative medicine, tissue engineering and cell therapy", *Adv Exp Med Biol.*, 670:68-79.

Luder, J., M. Cyfra, M., Johnson, P. ve Auer, I., 2004, "Impact of the New Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-Color Flow Cytometer on a Regional Flow Cytometry Clinical Laboratory Service", *Laboratory Hematology*, Vol.10, pp.102-108.

Luo Y., Kuang S.Y. ve Hoffer B., (2009), “How useful are stem cells in PD therapy? Parkinsonism Relat Disord.. netten bulamadım

Lysy, P.A., Campard, D., Smets, F., Najimi, M. ve Sokal, E.M., (2008), “Stem Cells For Liver Tissue Repair: Current Knowledge And Perspectives”, *World Journal of Gastroenterology*, 6:864-75.

Mahmoud H, Fahmy O, Kamel A, Kamel M, El-Haddad A, El-Kadi D. (1999). "Peripheral blood vs bone marrow as a source for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation". *Bone Marrow Transplant*.Aug;24(4):355-8. PubMed PMID: 10467322.

Mannello, F. ve Tonti, G. (2007), “Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? All That Glitters Is Not Gold!”, *Stem Cells*, 25:1603–1609

Mauro, A., Turriani, M., Ioannoni, A., Russo, V., Martelli, A., Di Giacinto, O., Nardinocchi, D. ve Berardinelli, P., (2010), “Isolation, Characterization, And In Vitro Differentiation Of Ovine Amniotic Stem Cells”, *Veterinary Research Community*

McElreavey, K.D., Irvine, A.I., Ennis, K.T. ve McLean, W.H., (1991), “Isolation, Culture And Characterisation Of Fibroblast-Like Cells Derived From The Wharton's Jelly Portion Of Human Umbilical Cord”, *Biochemical Society Transactions*, 1:29S.

Mizuno H. J., (2009), “Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review”, *Nippon Med Sch.*, 76(2):56-66.

Montaya, F.U., Verfaillie, C.M., Hu, W.S., Montaya, F.U., Verfaillie, C.M. ve Hu, W.S. (2005), “Culture Systems For Pluripotent Stem Cells”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100:12-27.

Moore K.E., Mills J.F. ve Thornton M.M., (2006), “Alternative sources of adult stem cells: a possible solution to the embryonic stem cell debate”, *Genet Med.*, 3(3):161-8.

Morton, H.J., (1970), “A Survey of Commercially Available Tissue Culture Media”, *In Vitro*, 6: 89.

M-Reboredo N., Díaz A., Castro A. ve VillaEKHusa R.G., (2000), “Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation”, *Bone Marrow*

Transplant., 26(12):1263-70.

Munsie M.J., Michalska A.E., O'Brien C.M., Trounson A.O., Pera M.F. ve Mountford P.S., (2000), "Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult Mouse somatic cell nuclei", *Curr Biol.*, 10(16):989-92.

Murray P.R., Baron E.J., Faller M.A., Tenover F.C. ve Yolen R.H., (1995), "Manual of Clinical Microbiology", ASM Press Washington D.C., USA, 158-64.

Nandoe Tewarie R.S., Hurtado A., Bartels R.H., Grotenhuis A. ve Oudega M., (2009), "Stem cell-based therapies for spinal cord injury", *J Spinal Cord Med.*, 32(2):105-14.

Newcomb, J.D., Sanberg, P.R., Klasko, S.K., Willing, A.E. ve Domanska-Janik, K. (2007), "Umbilical Cord Blood Research: Current And Future Perspectives", *Cell Transplantation*, 2:151-8.

Niku, S.D., Hoon, D.S.B., Cochran, A.J., ve Morton, D.L. (1987), "Isolation Of Lymphocytes From Clotted Blood". *Journal Immunology Methods*, 105:9-14.

Parekkadan, B. ve Milwid, J.M., (2010), "Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics", *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12.

Park D.H. ve Eve D.J., (2009), "Regenerative medicine: advances in new methods and technologies", *Med Sci Monit.*, 15(11): 233-51.

Petite, H., Viateau, V., Bensaïd, W., Meunier, A, Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel L ve Guillemin, G., (2000), "Tissue-Engineered Bone Regeneration", *Nature Biotechnology*, 18: 959 – 963.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. ve Marshak, D.R. (1999), "Multilineage Potential Of Adult Human Mesenchymal Stem Cells", *Science*, 284:143-7.

Placzek, M.R., Chung, I.M., Macedo, H.M., Ismail, S., Mortera Blanco, T., Lim, M., Cha, J.M., Fauzi, I., Kang, Y., Yeo, D.C., Ma, C.Y., Polak, J.M., Panoskaltsis, N., Mantalaris, A. (2009), "Stem Cell Bioprocessing: Fundamentals And Principles", *Journal of the Royal Society Interface*, 32:209-32.

Prockop, D., Bunnell, B. ve Phinney, D. (2008), "Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 449

- Rachakatla, R.S. ve Troyer, D., (2009) “Wharton's Jelly Stromal Cells As Potential Delivery Vehicles For Cancer Therapeutics”, *Future Oncology*, 8:1237-44.
- Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E.K., Machalinski, B. ve Kucia, M. (2007), “Bone-Marrow-Derived Stem Cells--Our Key To Longevity?”, *Journal of Applied Genetics*, 4:307-19.
- Reddy (2009). *Methods in Molecular Biology*, vol. 407: Stem Cell Assays Edited by: M. C. Vemuri © Humana Press, Totowa, NJ
- Reisi, S., Esmaeili, F. ve Shirazi A. (2009), “Isolation, Culture And Identification Of Epidermal Stem Cells From Newborn Mouse Skin”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 46:1.
- Reyes, M. ve Verfaillie C.M., 2001, “Characterization of Multipotent Adult Progenitor Cells, a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol.938, pp. 231-235.
- Ridings, J., Weedon, H., Ioannu, C., Flego, L., Macardle, P.J., ve Zola, H. (1996), “Purification Of Cord Blood Lymphocytes”, *Journal Immunology Methods*, 195(1-2):43-8.
- Roberts, I., 2004, “Mesenchymal Stem Cells”, *Vox Sanguinis*, Vol.87, pp. 38-41.
- Rosenbaum A.J., Grande D.A. ve Dines J.S., (2008), “The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment”, *Organogenesis*, 4(1):23-7.
- Rutzky, L.P. and Pumper, R.W., (1974), “Supplement to a Survey of Commercially Available Tissue Culture Media”. *In Vitro*. 9, 468.
- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. (2005). “Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors”. *Stem Cells*. 2005 Feb;23(2):220-9.
- Sarugaser, R., Hanoun, L., Keating, A., Stanford, W.L. ve Davies, J.E. (2009), “Human Mesenchymal Stem Cells Self-Renew And Differentiate According To A Deterministic Hierarchy”, *PLoS One*, 8:e6498.
- Sauerzweig, S., Munsch, T., Lessmann, V., Reymann, K.G. ve Braun, H. (2009), “A Population Of Serum Deprivation-Induced Bone Marrow Stem Cells (SD-BMKH) Expresses Marker Typical For Embryonic And Neural Stem Cells”, *Experimental Cell Research*, 1:50-66.
- Secco M., Zucconi E., Vieira N.M., Fogaça L.L., Cerqueira A., Carvalho M.D., Jazedje T.,

Okamoto O.K., Muotri A.R., Zatz M., (2008), "Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood", *Stem Cells.*, 26(1):146-50.

Sepulveda, W., Dezerega, V., Carstensi, E. ve Gutierrez, J., (2001), "Fused Umbilical Arteries: Prenatal Sonographic Diagnosis And Clinical Significance", *Journal of Ultrasound in Medicine*, 20: 59-62.

Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. *Stem Cells*, (2005) "In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability". Oct;23(9):1357-66. Epub 2005 Aug 4.

Shalaby M.A., (1991), "Diagnostic Virology", Cairo University Faculty of Medicine, Cairo, 33-6.

Shanthly N., Aruva M.R., Zhang K., Mathew B. ve Thakur M.L., (2006), "Stem cells: a regenerative pharmaceutical", *Q J Nucl Med Mol Imaging.*, 50(3):205-16.

Sharma, A.D., Cantz, T., Richter, R., Eckert, K., Henschler, R., Wilkens, L., Jochheim-Richter, A., Arseniev, L. ve Ott, M., (2005), "Human Cord Blood Stem Cells Generate Human Cytokeratin 18-Negative Hepatocyte-Like Cells In Injured Mouse Liver", *American Journal of Pathology*, 2:555-64.

Shetty, P., Bharucha, K. ve Tanavde, V. (2007), "Human Umbilical Cord Blood Serum Can Replace Fetal Bovine Serum In The Culture Of Mesenchymal Stem Cells", *Cell Biology International*, 3:293-8.

Shihabuddin L.S. ve Aubert I., (2010), "Stem cell transplantation for neurometabolic and neurodegenerative diseases", *Neuropharmacology*, 58(6):845-54

Shlebak, A.A., Marley, S.B., Roberts, I.A., Davidson, R.J., Goldman, JM, Gordon MY, (1999), "Optimal Timing For Processing And Cryopreservation Of Umbilical Cord Haematopoietic Stem Cells For Clinical Transplantation", *Bone Marrow Transplant*, 2:131-6.

Shoji T., Ii M., Mifune Y., Matsumoto T., Kawamoto A., Kwon S.M., Kuroda T., Kuroda R., Kurosaka M. ve Asahara T., (2010), "Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis", *Lab Invest.*, 90(4):637-49.

Siegel, N., Vali, A., Fuchs, C., Rosner, M. ve Hengstschläger, M., (2009), "Induction

Ofmesenchymal/Epithelial Marker Expression In Human Amniotic Fluid Stem Cells”, *Reproductive Biomedicine Online*, 6:838-46

Smith A.R. ve Wagner J.E., (2009), “Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation:place of umbilical cord blood”, *Br J Haematol.*, 147(2):246-61.

Smith, J.D., Freeman,G., Vogt, M. ve Dulbecco, R., (1960), “The Nucleic Acid of Polyoma Virus”, *Virology*, 12: 185-196

Solves P., Mirabet V., Larrea L., Moraga R., Planells D., Saucedo E., Uberos F.C., Planells T., Guillen M., Andres A., Monleon J., Soler M.A. ve Franco E., (2003), “Comparisonbetween two cord blood collection strategies”, *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 82(5):439-42.

Solves P., Moraga R., Saucedo E., Perales A., Soler M.A., Larrea L., Mirabet V.,Planells D., Carbonell-Uberos F., Monleón J., Planells T., Guillén M., Andrés A. ve Franco E., (2003), “Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. Bone Marrow Transplant”, 31,269–273

Song, L. ve Tuan, R.S. (2004), “Transdifferentiation Potential Of Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow”, *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9:980-2.

Song, L., Webb, N.E., Song, Y. ve Tuan, R.S. (2006), “Identification And Functional Analysis Of Candidate Genes Regulating Mesenchymal Stem Cell Self-Renewal And Multipotency”, *Stem Cells*, 7:1707-18.

Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Salagianni, M., Baxevanis, C.N. ve Papamichail, M. (2006), “Characterization Of The Optimal Culture Conditions For Clinical Scale Production Of Human Mesenchymal Stem Cells”, *Stem Cells*, 24:462-471.

Srivastava D. ve Ivey K.N., (2006), “Potential of stem-cell-based therapies for heart disease”, *Nature*, 441:1097–9.

Steinbock B., (2005), “Alternative sources of stem cells”, *Hastings Cent Rep.*, 35(4):24-6.

Stewart M.H., Bendall S.C. ve Bhatia M., (2008), “Deconstructing human embryonic stem cell cultures: niche regulation of self-renewal and pluripotency”, *J Mol Med.*, 86(8):875-86.

Stewart, C.C., Woodring, M.L., Podniesinski, E. ve Gray, E., 2005,“Flow Cytometer in the Infrared: Inexpensive Modifications to a CommercialInstrument”, *International Society for*

Analytical Cytology, Vol.67, pp.104-111.

Tanabe, S., Sato, Y., Suzuki, T., Suzuki, K., Nagao, T. ve Yamaguchi, T. (2008), “Gene Expression Profiling Of Human Mesenchymal Stem Cells For Identification Of Novel Markers In Early- And Late-Stage Cell Culture”, *Journal of Biochemistry*, 3:399-408.

Tárnok A., Ulrich H. ve Bocsi J. (2010), “Phenotypes of stem cells from diverse origin”, *Cytometry A.*, 77(1):6-10.

Tárnok A., Ulrich H. ve Bocsi J., (2010), “Phenotypes of stem cells from diverse origin”, *Cytometry A.* 77(1):6-10.

Teng, Y. D., Lavik, E. B., Qu, X., Park, K. I., Ourednik, J., Zurakowski, D., Langer, R., & Snyder, E. Y. (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3024–3029.

Thiele, D.L., Kurosaka, M., ve Lipsky, P.E. (1983), “Phenotype Of The Accessory Cell Necessary For Mitogen-Stimulated T And B Cell Responses In Human Peripheral Blood: Delineation By Its Sensitivity To The Lysosomotropic Agent, L-Leucine Methyl Ester”, *Journal Immunology*, 131:2282-2290.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts". *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. Erratum in: *Science* 1998 Dec 4;282(5395):1827. PubMed PMID: 9804556.

Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2007 Sep;21(9):1992-9. Epub 2007 Jul 12. PubMed PMID: 17625609.

Tögel, F. ve Westenfelder, C. (2007), “Adult Bone Marrow-Derived Stem Cells For Organ Regeneration And Repair”, *Developmental Dynamics*, 12:3321-31.

Tritsch, G.L. ve Moore, G.E. (1962), “Spontaneous Decomposition of L-Glutamine in Cell Culture Media”, *Experimental Research*, 28: 360–364.

Troyer, D. ve Weiss, M., (2008) “Wharton's Jelly-Derived Cells Are A Primitive Stromalcell Population”, *Stem Cells*, 3:591-599.

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu 2004 “Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesi” Versiyon 19 [2 Kasım 2004]

Vambutas, A., DeVoti, J., Goldofsky, E., Gordon, M., Lesser, M. ve Bonagura, V. (2009), “Alternatesplicing Of İnterleukin-1 Receptor Type II (IL1R2) İn Vitro Correlates With Clinical Glucocorticoid Responsiveness İn Patients With AIED”, PLoS One, 4:e5293

Vemuri, M. C., (2007), “Methods in Molecular Biology”, Stem Cell Assays, Springerlink, vol. 407

Ventura, C. (2010), “Cardiomyocyte Proliferation: Paving The Way For Cardiac Regenerative Medicine Without Stem Cell Transplantation”, Cardiovasc Research, 4:643-4.

Vogelstein B., Bloom B.R., Goodman C.S., King P.A., McKhann G.M. ve Weisfeldt M.L., (2002), Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine, National Academy Press, USA

Watt F.M. ve Driskell R.R., (2010), “The therapeutic potential of stem cells”, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 365(1537):155-63.

Webb, J., Parsons, T. ve Horwitz, F., (2002), “Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again”, Nature Cell Biology, 4: E97 - E100

Wu, L.P., Chen, F.X., Lu, H.M., Wu, Z.L. (2009), “Biological Characteristics Of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells İn Children With Acute Leukemia”, Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 3:734-8.

Yamanaka S., (2008). “Pluripotency and nuclear reprogramming”. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Jun 27;363(1500):2079-87. Review. PubMed PMID: 18375377; PubMed Central PMCID: PMC2610180.

Yang, M. ve Butler, M. (2000), “Effects of Ammonia on the Glycosylation of Human Recombinant Erythropoietin in Culture”, Biotechnology Progress, 16:751–759.

Yang, M. ve Butler, M. (2002), “Effects of Ammonia and Glucosamine on the Heterogeneity of Erythropoietin Glycoforms”, Biotechnology Progress, 18:129–138.

Young H.E. ve Black A.C., (2004), “Adult stem cells”, Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 276(1):75-102.

Yu RN, Estrada CR. (2010) “Stem cells: a review and implications for urology”, Urology. Mar;75(3):664-70. Epub 2009 Dec 5.

Yuan H., Zhang Z.W., Liang L.W., Shen Q., Wang X.D., Ren S.M., Ma H.J., Jiao S.J. ve Liu P., (2010), "Treatment strategies for Parkinson's disease.", *Neurosci Bull.*, 26(1):66-76.

Zaruba, M.M., Soonpaa, M., Reuter, S. ve Field, L.J. (2000), "Cardiomyogenic Potential Of C-Kit(+)-Expressing Cells Derived From Neonatal And Adult Mouse Hearts", *Circulation*, 18:1992.

Zeddou M., Briquet A., Relic B., Josse C., Malaise M.G., Gothot A., Lechanteur C. ve Beguin Y., (2010), "The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MKH) than the umbilical cord blood", *Cell Biol Int*, 2010

Zhang H. ve Wang Z.Z., (2008), "Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation", *J Cell Biochem.*, 103(3):709-18.

Zuk P.A., (2010) "The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead". *Mol*

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. ve Hedrick, M.H., (2001), " Multilineage Cells From Human Adipose Tissue: Implications For Cell-Based Therapies", *Tissue Engineering*, 2:211-28.

Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A. ve Man, R.M., (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals", *Arthritis Research*, Vol.2, pp. 477-488.

INTERNET KAYNAKLARI

<http://www.independent.com/news/2009/nov/21/showtime-stem-cells/>

<http://health.howstuffworks.com/liposuction1.htm>

http://www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_sp07_NotchStemCellExpansion.aspx

<http://www.valemedicalgroup.org/stw/Page.asp?PageID=STW026725>

EK-1**T.C.****YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ**

Aydınlatılmış Onam Formu

I. Araştırma Projesi Hakkında Bilgi**(Hekimin Açıklaması)**

Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV' in yürütücülüğünde Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümünde, göbek kordon kanından elde edilen kök hücrelerin izolasyonu ve farklı besiyerlerinde kültürü yapılan mezenkimal kök hücreler arasındaki farkların belirlenmesi ile ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Farklı Besiyerlerinde Adaptasyonunun İncelenmesi ve Kültürünün Yapılması” dır. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu çalışmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Sizden alınacak kan numunesi yalnızca adı geçen çalışmada kullanılacaktır. Araştırma sonuçları bilimsel amaçlarla kullanılacak ve kişisel bilgileriniz ihtimamla korunacaktır. Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV veya onun görevlendireceği bir kişi doğum sonrası atık olacak göbek kordon venindeki kandan yaklaşık 20 ml (3 tüp) temin edecektir. Bu kana çeşitli yöntemler uygulanarak içerdiği kök hücreler ayrılarak kültürü yapılacak, ileri deneysel çalışmalar ve gözlemler sonucu adı geçen yüksek lisans tez çalışması için gerekli veriler elde edilecektir. Araştırmaya davet edilmenizin nedeni bu çalışma için ancak sezaryen ile doğum sonrası elde edilen göbek kordon kanının gerekmesidir. Çalışmanın yapılabilmesi için doğum sonrası tıbbi atık olacak olan göbek kordon kanından yaklaşık 20 ml (3 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Bu kandan elde edilen kök hücreler, hücre kültür teknikleri kullanılarak izole edildikten sonra kültür ortamında çoğaltılacaklardır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığımız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Çalışma kapsamında herhangi bir tıbbi

ve genetik tanı yapılmayacağından sizin ve /veya ailenizin sağlığıyla ilgili bir profil elde edilmeyecektir.

Yapılacak çalışmanın getireceği olası yararlar: Birçok hastalığın tedavisinde umut vadeden kök hücreler ile ilgili bu çalışma sonucu elde edilecek bulgular ileride yapılacak olan birçok çalışmaya da ışık tutacaktır. Çalışmamız sonucu kök hücrelerin deneysel çalışmalarda kullanılması için en uygun şartların belirlenmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır.

II. Gönüllü Katılımcının (Donör kanı vericisinin) Beyanı

(Katılımcının Beyanı)

Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim*).

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük

içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜNÜN

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.:

İmza:

Tarih:

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.:

İmza:

Tarih:

AÇIKLAMAYI YAPAN ARAŞTIRMACININ

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.:

İmza:

Tarih:

RIZA ALMA İŞLEMİNDE BAŞTAN SONA TANIKLIK EDEN KURULUŞ

GÖREVLİSİNİN

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.:

İmza:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	06.07.1982	
Doğum yeri	İstanbul	
Ortaöğretim	1993-2000	Bahçelievler Anadolu Lisesi
Lisans	2000-2005	Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek Lisans	2007-2010	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı

Çalıştığı Kurumlar

2004-2008	Darıüşşafaka Lisesi
-----------	---------------------