

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

**KEMİK İLİĞİ YAĞ TABAKASINDAN ELDE EDİLEN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU
VE SUBKUTAN YAĞ VE KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Uzm. Biy. Gülsena TONYALI

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2020**

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

**KEMİK İLİĞİ YAĞ TABAKASINDAN ELDE EDİLEN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU
VE SUBKUTAN YAĞ VE KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Uzm. Biy. Gülsena TONYALI

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. F. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Yasemin BALABAN**

**ANKARA
2020**

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren **6 ay** ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

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

Gülsena TONYALI

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Gülsena TONYALI

TEŞEKKÜR

İlk olarak, öğrencileri olmaktan gurur duyduğum, bilimsel ve insani kimliklerini örnek aldığım, yaşadığım her sorunda, ne olursa olsun destek ve yardımcı olan, tecrübeleriyle bana yol gösteren, farklı ve geniş bakış açıları kazandıran, araştırma disiplinlerini öğreten, istediğim alanda çalışma yapmam için gerekli maddi ve manevi desteği sağlayan, benim için manevi anlamları bir danışmandan çok daha fazla olan değerli danışmanlarım **Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya** ve **Prof. Dr. Yasemin Balaban**'a teşekkürü bir borç bilirim. Her zaman bana örnek oldukları gibi bir araştırmacı ve insan olmaya ve onları en iyi şekilde temsil etmeye çalışacağım.

Çalışmalarımı yürütürken imkanlarını kullandığım Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi ekibine (PEDI-STEM), Kök Hücre Anabilim Dalı öğretim üyeleri, değerli hocalarıma yardımları ve bana öğrettikleri her şey için teşekkür ederim.

Bir sorun yaşadığımda ne zaman, nerede, hangi gün olursa olsun bana yardım eden, destek olan, abla bildiğim Dr. Emine Kılıç, Dr. Cansu Özdemir Saka ve Dr. Esin Alpdündar Bulut ile, birlikte çalıştığım PEDI-STEM ekibinden kıymetli arkadaşlarım Aynura, Berna, Mustafa, Burcu, Özgür Doğuş, Bihter ve Mehmet Emin; siz olmasaydınız merkez çok tatsız bir yer olurdu. Hacettepe Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'ndan Cem Şimşek ve Tevhide Şahin, sizler de iyi ki varsınız. Ev arkadaşım Sıla, yüksek lisansım boyunca daima bana destek oldun, nice günlerimiz olsun. Ve bir teşekkürde yaz okulunda tanıştığım, dert ortağım Nezaket Altıntaş'a.

Son ve en büyük teşekkürüm, beni bugünlere gelirken verdiğim her kararda destekleyen, her türlü fedakarlığı yapan, gözyaşımı silen, gülüşlerime eşlik eden, sonsuz güvenle hayallerime destek olan ve asla pes etmeme izin vermeyen canım annem ve babama, onlardan uzakta olmamı hiç istemeseler de onlar için burada olduğumu bilen, hayattaki yaşam kaynağım olan kardeşlerime... İyi ki benim ailemsiniz.

ÖZET

Tonyalı G., Kemik İliği Yağ Tabakasından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu ve Subkutan Yağ ve Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücreleri İle Karşılaştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020. Kemik iliği yağ dokusu (KİY) diğer adipoz dokulardan farklı özelliklere sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla kemik iliği yağ dokusunun akut myeloblastik lösemi (AML) gelişimi/progresyonu üzerine etkileri gösterilmiş, farklı tip kanserlerde de kemik metastazlarına katkıları bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, sağlıklı donörlerin ve lösemiye yatkınlık oluşturduğu bilinen Fankoni anemili hastaların KİY tabakasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (MKH) karakterizasyonu yapılmış, in vitro adipojenik uyarıya cevapları incelenmiş ve standart yöntemle Kİ mononükleer hücrelerinden elde edilen Kİ-MKH'ler ve subkutan yağ dokusundan (SKY) geliştirilen MKH'ler ile karşılaştırılmıştır. Bunun yanında, lösemik hücre ile Kİ mikroçevre etkileşiminde ve lösemi patogeneğinde rolü olabileceği ileri sürülen moleküllerden galektin-3, FABP-4, Leptin-R, PDGFR- α ifadeleri de incelenmiştir. Literatürde KİY dokusu ile yapılan çalışmalardan farklı yöntemle KİY tabakasının kültürü ile elde edilen MKH'lerin, Kİ-MKH ve SKY-MKH'lerinden farklı özelliklere sahip olduğu, adipojenik gen ifadeleri ve cevap oluşma sürelerinde farklılıklar bulunduğu, adipojenik uyarım altında moleküler değişimlerin farklılık gösterdiği, FA hastası MKH'lerinin adiposit farklılaşma cevaplarının da sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinden farklılık gösterdiği saptanmış, bu durumun FA hastalarında Kİ'de adipojenik disregülasyonuna işaret edebileceği düşünülmüştür. Ayrıca AML (HL-60) hücreleri ile ko-kültür ortamında meydana gelen fenotipik değişiklikler araştırılmış, ön veriler elde edilmiş, ileri araştırmaların yapılması hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kök hücre, adiposit, kemik iliği yağ dokusu, lösemi, Fankoni anemisi

ABSTRACT

Tonyalı G. Characterization of The Bone Marrow Adipose Layer Derived Mesenchymal Stem Cells and Comparison With Subcutaneous Adipose And Bone Marrow MSCs. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Master of Science Thesis in Stem Cell Program, Ankara, 2020. Bone marrow adipose tissue (BMAT) has different properties than other adipose tissues. Recent studies have shown the effects of bone marrow adipose tissue on development / progression of acute myeloblastic leukemia (AML), and its contribution to bone metastases in different types of cancer. In this thesis study, characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from fatty layer of bone (BMAT-MSC) of healthy donors and patients with Fanconi anemia (FA), who are known to be susceptible to leukemia was performed, their response to in-vitro adipogenic stimulation was assessed and compared with the results of bone marrow MSCs (BM-MSC) obtained from mononuclear cells by standart methods and with MSCs generated from subcutaneous fat tissue MSCs (SCF-MSC). In addition, the expressions of galectin-3, FABP4, Leptin-R, PDGFR- α , which are suggested to have a role in the interaction of leukemic cell with bone marrow microenvironment and in the pathogenesis of leukemia, were examined. MAT-MSCs, unlike other studies in the literature, obtained from the fatty layer of the BMAT-MSCs were shown to have differences in adipogenic gene expression profiles and response times to adipogenic stimulation when compared to those of BM-MSCs and SCF-MSCs. The adipogenic gene expression pattern of FA patients MSCs was also different compared to those from healthy donors suggesting that BM adipogenic dysregulation in FA patients. In co-culture experiments with AML (HL-60) cells, changes in surface molecule expressions were detected on MSCs. Further studies are required for confirmation of the preliminary results.

Keywords: Stem cell, Adipocytes, Bone Marrow Adipose Tissue, Leukemia, Fanconi anemia

İÇİNDEKİLER

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iii
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kök Hücreler ve Niş	4
2.1.1. Hematopoetik Kök Hücreler	6
2.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler	8
2.1.3. Kemik İliği Kök Hücre Nişi	10
2.2. Adipoz Dokusu ve Yağ Metabolizması	12
2.2.1. Kemik İliği Yağ Dokusu	13
2.2.2. Lösemi ve Yağ Metabolizması	16
2.3. Fankoni Anemisi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Bireyler	24
3.2. Gereçler ve Yöntemler	25
3.2.1. İnsan Kemik İliği Örneklerinden Mezenkimal Kök Hücre Eldesi	27
3.2.2. İnsan Kİ, KİY ve SKY Kökenli MKH'lerin Özelliklerinin İncelenmesi	31
3.2.3. MKH ve HL-60 Hücreleri İle Yapılan Ko-kültür Çalışmaları	35

4. BULGULAR	36
4.1. Hücrelerin İzolasyonu ve İn Vitro Çoğaltılması	36
4.1.1. Kemik İliği Aspirasyon Materyallerinden KİY-MKH ve Kİ-MKH Eldesi ve Çoğalma Kapasitelerinin İncelenmesi	36
4.2. MKH'lerin Fenotipik Özelliklerinin İncelenmesi	40
4.3. MKH'lerin İn Vitro Farklılaşma Potansiyeli	42
4.3. MKH'lere Ait Adipojenik Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi	46
4.4. Kİ ve KİY-MKH'lerinin HL-60 Hücreleri ile Ko-Kültürü	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇLAR	59
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	67
EK-1: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Yazısı	
EK-2: Turnitin dijital makbuz	
EK-3: Turnitin ekran görüntüsü	
EK-4: MKH'lerin akım sitometrik karakterizasyonlarına ait histogramlar	
9. ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

AdipoQ	Adiponektin
AML	Akut Myeloid Lösemi
AMPK	Aktive Edilmiş Protein Kinaz
ARS	Alizarin Red S boyası
BSA	Sığır Serum Albumin
cMAT	Konstitütif Kemik İliği Yağ Dokusu
CXCL-1	The Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1
CXCL-2	The Chemokine (C-X-C motif) Ligand-2
DiO-2	Tip II İyodotironin Deiyodinaz
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Düşük Glukoz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ER	Endoplazmik Retikulum
ESM	Ekstraselüler Matriks
FA	Fankoni Anemisi
FABP-4	Yağ Asidi Bağlayıcı Protein-4
FANC	Fankoni Genleri
Gal-3	Galektin-3
G-CSF	Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör
GM-CSF	Granulosit/Makrofaj Uyarıcı Faktör-
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
HLA	Majör Histokompatibilite Kompleksi
HSL	Hormon Sensitif Lipaz
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
Kİ	Kemik İliği
Kİ-MKH	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
KİY	Kemik İliği Yağ Dokusu
KİY-MKH	Kemik İliği Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
KML	Kronik Myeloid Lösemi

Lep-R	Leptin Reseptör
LKH	Lösemik Kök Hücre
LPL	Lipoprotein Lipaz
LT-HKH	<i>Long-Term</i> Hematopoetik Kök Hücre
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDS	Myelodisplastik Sendrom
MIP-1α	Makrofaj İnflamatuvar Protein-1 Alfa
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MNH	Mononükleer Hücre
ORO	Oil Red O Boyası
PA	Palmitik Asit
PARP-1	Poli [ADP-riboz] Polimeraz 1
PBS	Fosfatlı Tuz Tamponu
PDGFR-α	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Alfa
Pen-Strep	Penisilin-Streptomisin
PPAR-α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha
PPARγ	Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gamma
qRT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rMAT	Regülatör Kemik İliği Yağ Dokusu
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCF	Stem Cell Factor
SKY	Subkutan Yağ Doku
SKY-MKH	Subkutan Yağ Dokusu Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
SYA	Serbest Yağ Asitleri
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
UCP-1	Ayırıcı Protein-1 (Termogenin-1)
UCP-2	Ayırıcı Protein-2 (Termogenin-2)
uPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kök hücre hiyerarşisi	5
2.2. Hematopoetik kök hücre hiyerarşisi.	7
2.3. Kemik iliğinde hematopoetik niş elemanları. CXCL-12 bağımlı retiküler hücreler (CAR), hematopoetik kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH) ve diğer hematopoetik niş elemanlarına ait şematik çizim gösterilmektedir.	12
3.1. Santrifüj sonrası ayrılan kemik iliği yağ tabakası, plazma ve eritrositler. Kırmızı halka plazma katmanının üzerinde toplanan kemik iliği yağ tabakasını göstermektedir.	28
3.2. İnsan adipoz dokusundan enzimatik parçalama ile kök hücre izolasyonu. Ameliyathaneden liposuciton ile toplanan ve steril koşullarda laboratuvara getirilen yarı katı subkutan yağ dokusu materyalinin (A) enzimatik muamele ile parçalanması (B) ve yıkama ile işlemlerinden sonra (C-D) kalan pelletin görüntüsü (E) ve kültür kabına ekilmiş hali (F) gösterilmektedir.	31
4.1. Sağlıklı bireylere ait KİY-MKH'lerine (A) ve SKY-MKH'lerine (B) ait pasaj sıfır inverted mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. x4 büyütme.	37
4.2. Sağlıklı bireylere ve FA hastalarına ait Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinin izolasyon sonrası kültürde çoğaltılmaları sırasında geçen ortalama süre gösterilmiştir (n=3).	37
4.3. Sağlıklı bireylerden alınan subkutan yağ doku kökenli MKH'lerin, pasaj sıfır (A, B), pasaj iki (C) ve pasaj üçteki (D) morfolojilerinin invert mikroskopundaki görüntüleri gösterilmektedir. x4, x10 büyütme.	38
4.4. Sağlıklı KİY-MKH'leri ile SKY-MKH'lerine ait <i>mitotracker</i> ve <i>Wright</i> boyaması görüntüleri. Floresan mikroskop ile çekilmiş KİY-MKH (A) ve SKY-MKH'lerine (B) ait <i>mitotracker</i> boyaması ve sağlıklı Kİ-MKH (C, D), KİY-MKH (E) ve SKY-MKH'lerine (F) ait inverted mikroskopta çekilmiş <i>Wright</i> boyaması görüntüleri gösterilmektedir (x20 büyütme).	39
4.5. Sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH'leri ile SKY-MKH'lerinin çoğalma kapasitelerinin incelenmesi. y eksenli dublike olarak çalışılan örneklerin absorbans değerlerine ait ortalamaları alınarak oluşturulmuştur.	40
4.6. FA hastası Kİ-MKH (A, B) ile FA KİY-MKH (C, D), sağlıklı Kİ-MKH (E, F) ile sağlıklı KİY-MKH (G, H) ve SKY-MKH'lerine (I, İ) ait Oil Red O boyaması. Görüntüler adipojenik farklılaştırma protokolü uygulanmış MKH'lerin Oil-Red-	

- O boyaması yapıldıktan sonrası çekilen invertte mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. x4 ve x20 büyütme. 43
- 4.7.** FA hastası Kİ-MKH (A) ve KİY-MKH (B), sağlıklı Kİ-MKH (C) ve KİY-MKH (D) ile SKY-MKH'lerinin (E-F) osteojenik *Alizarin Red S* boyamasına ait invertte mikroskop görüntüleri. x20 büyütme. 44
- 4.8.** Adipojenik farklılaştırma yapılan örneklerin semi-kantitatif analiz grafikleri. Sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinin (A), FA hastası Kİ-MKH ve KİY-MKH'leri (B), FA hastası Kİ-MKH ve sağlıklı Kİ-MKH'leri (C), FA hastası KİY-MKH ve sağlıklı KİY-MKH'leri (D) ile sağlıklı KİY-MKH ve SKY-MKH'lerinin (E) karşılaştırılmalı bar grafikleri gösterilmektedir. 45
- 4.9.** Adipojenik farklılaştırmanın onuncu ve yirmibirinci günlerinde yapılan gen ekspresyon incelemelerine ait bar grafikleri. İki gözlem noktası arasında toplanan hücrelerin LPL, AdipoQ, UCP-1, DiO-2, PARP-1 ve PPAR γ gen ifadelerine ait bar grafikler gösterilmektedir. 48
- 4.10.** Herhangi bir uyarıma maruz kalmamış MKH'lerin gruplandırma analizine ait dendogram grafiği. Adipojenik uyarıma maruz kalmayan sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH, FA hastası Kİ-MKH ve KİY-MKH ile SKY-MKH'ye ait altı genin her grup için, kendi içinde kıyaslanması ile elde edilmiştir. 49
- 4.11.** On ve yirmibir gün boyunca adipojenik farklılaştırma uygulanmış MKH'lerin dendogram grafiği. Grafik altı genin her grup için birlikte değerlendirilmesiyle elde edilmiştir. 49
- 4.12.** Sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinin HL-60 hücreleri ile yapılan ko-kültürlerin akım sitometrik grafikler. Sağlıklı Kİ-MKH'lerine palmitik asit (PA) uygulanmadan yapılan ko-kültürde Gal-3 ve Lep-R ifadeleri (A-B), sağlıklı Kİ-MKH'lerine PA uygulanarak yapılan ko-kültürde Gal-3 ve Lep-R ifadeleri (C-D), sağlıklı KİY-MKH'lerine PA uygulanmadan yapılan ko-kültürde Gal-3 ve Lep-R ifadeleri (E-F) ve sağlıklı KİY-MKH'lerine PA uygulanarak yapılan ko-kültürde Gal-3 ve Lep-R ifadeleri (G-H) dotplot olarak gösterilmektedir. 51

TABLolar

Tablo	Sayfa
3.1. Bireylere ait demografik ve klinik bilgiler	24
3.2. Hücre yüzey belirteçlerinin belirlenmesinde kullanılan antikor paneli	27
3.3. Moleküler analizlerde değerlendirilen genlere ait primer dizileri	27
4.1. Genel mezenkimal kök hücre belirteçlerinin incelenmesine ait yüzde veriler	41
4.2. Lösemi-Kİ mikroçevresi ile ilişkilendirilen moleküllerin akım sitometrik ölçüm yüzdelere ait grafik	41
4.3. Ko-kültür şartlarında MKH'ler üzerinde incelenen belirteçler. Akım sitometri ile incelenen belirteçlere ait yüzde veriler verilmiştir.	50

1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler (MKH); kendilerini yenileyebilme ve bağ dokusu kökenli hücrelere farklılaşma özelliğine sahip, immünmodülör özellikli multipotent kök hücrelerdir. Ayrıca, kök hücrelerin yaşamlarını idame ettirdikleri ‘niş’ denilen özel alanların ana stromal elamanıdır (1). Bağ dokusu elemanı olan kemik iliği kökenli MKH’ler (Kİ-MKH), kemik iliği nişindeki adipojenik ve osteojenik hücrelerin köken aldıkları hücrelerdir. Hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkileri kurarak ve buldukları alanın mikroçevre özelliklerine göre gerekli kemokin, sitokin, büyüme faktörü gibi molekülleri salgılayarak parakrin etkiler gösterir ve niş regülasyonunu sağlarlar (2).

Farklı tiplerdeki hematolojik malignitelere Kİ-MKH’lerinde defektler bildirilmiş, hematopoetik nişin elemanları olan bu hücrelerin lösemi gelişiminde ve seyirinde önemli role sahip olduğu ileri sürülmüştür (3, 4). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar ise, bu konuda özellikle kemik iliği yağ (KİY) dokusunun önemine işaret etmektedir.

Yağ dokusu beyaz, kahverengi ve her ikisinin özelliklerini taşıyan bej yağ dokusu şeklinde sınıflanır. Subkutan yağ (SKY) dokusu beyaz yağ dokusu (*white adipose tissue/WAT*) özelliğinde olup temel görevi enerji üretimi, kahverengi yağ dokusunun (*Brown adipose tissue /BAT*) ise termoregülasyondur. KİY dokusunun ise beyaz ve kahverengi yağ dokusu ile benzer özellikler göstermekle beraber hepsinden farklı özelliklere sahip olduğu ileri sürülmektedir (5, 6).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, lösemi patogeneğinde özellikle Kİ yağ dokusu kökenli MKH’lerin (KİY-MKH) anahtar rol aldığı, lösemik hücre ile Kİ adipositlerinin karşılıklı dinamik etkileşimi sonucu ortaya çıkan lipoliz ve serbest yağ asitlerinin tedaviye dirençli lösemik klonların ortaya çıkmasında rol aldığı gösterilmiş, ayrıca çeşitli kanser türlerinin kemik metastazlarıyla da ilişkili olduğu bildirilmiştir (7-10). Kemik iliği (Kİ), yağdan zengin bir doku olup hematopoezin düzenlenmesinde kritik role sahiptir. Ancak bu hücrelerin karakteristik özellikleri ve patoloji oluşumundaki rolleri hakkında halen çok az şey bilinmektedir. Aplastik anemi ve kalıtsal kemik iliği yetmezliklerinde, Kİ’de hematopoetik hücrelerin yerini adipositlerin doldurduğu bilinmektedir. KİY dokusunun özelliklerinin ortaya

çıkarılması, sağlıklı hematopoezin sürdürülmesi ve hematopoez patolojilerinin gelişme mekanizmalarının anlaşılması, hedefleyici stratejilerin geliştirilmesi yönünden önemlidir. Bu nedenle sağlıklı ve Kİ yetmezliği olan hastaların KİY dokusunun tanımlanmasına, özelliklerinin ortaya konmasına ihtiyaç vardır (11).

Kalıtsal Kİ yetmezliklerinden biri olan Fankoni anemisi (FA); DNA hasar tamirinde rolü olan FANC genlerinde mutasyon sonucunda oluşan, otozomal resesif kalıtılan nadir bir hastalıktır. DNA tamir defekti ve kromozomal kırıklarla seyreden bu hastalık; hipoplastik ya da aplastik anemi, epiteliyal malignensi ve myelodisplastik sendrom (MDS) ile akut myeloid lösemi (AML) gelişimine yatkınlık oluşturmaktadır (12). Bu özellikleri nedeniyle FA, lösemi gelişim mekanizmalarını araştıran bilim insanlarının büyük ilgisini çekmektedir. Buna karşın, farklı genotip, fenotip gösteren bu hastalıkta malignite eğilimi oluşmasına katkı sağlayabilecek mikroçevresel faktörler yeterince aydınlatılmamıştır. FA hastalarında kemik defektlerinin ön planda olması nedeniyle hastaların MKH'lerinin araştırıldığı çalışmalar olmakla beraber KİY dokusunun incelendiği hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

KİY dokusunun tanımlanması/karakterizasyonu konusunda literatürde kısıtlılıklar vardır. KİY dokunun elde edilme yöntemleri değişkendir. Hayvan deneylerinde, genellikle, kemiklerin çıkarılması ve ilik yağ dokusunun buradan direkt izolasyonu yapılırken insanlarda çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmaların bir kısmında, KİY dokusu ortopedik cerrahi ameliyatları sırasında ya da açık kırıklardan izole edilmiş, diğerlerinde ise Kİ aspirasyonu ile elde edilen ve mononükleer hücrelerin (MNH) kültürde ekilmesi ve yapışan hücrelerin pasajlanarak çoğaltılması sonucu elde edilen Kİ-MKH'lerinin adiposit yönünde in vitro farklılaşmasının uyarılması sonucu elde edilen hücreler KİY dokusu hücreleri olarak tanımlanmıştır (9, 13). Bu çelişkilerin ortadan kaldırılması ve KİY dokusunun iyi tanımlanarak standardizasyon sağlanmasına yönelik 2020 yılında bir rehber hazırlanmış, KİY dokusunun kritik önemine değinilmiştir (11). Bu tez çalışması ile hakkında pek az bilgi sahibi olunan ve çok güncel olan bu alana, insan KİY dokusunun özelliklerinin araştırılması yoluyla katkı sağlamak amaçlanmıştır. Sağlıklı Kİ nakli vericilerinden alınan Kİ aspirasyon materyallerinin lipid tabakasından KİY dokusu MKH'lerini temsil etmek üzere stromal hücreler geliştirilerek detaylı karakterizasyonu

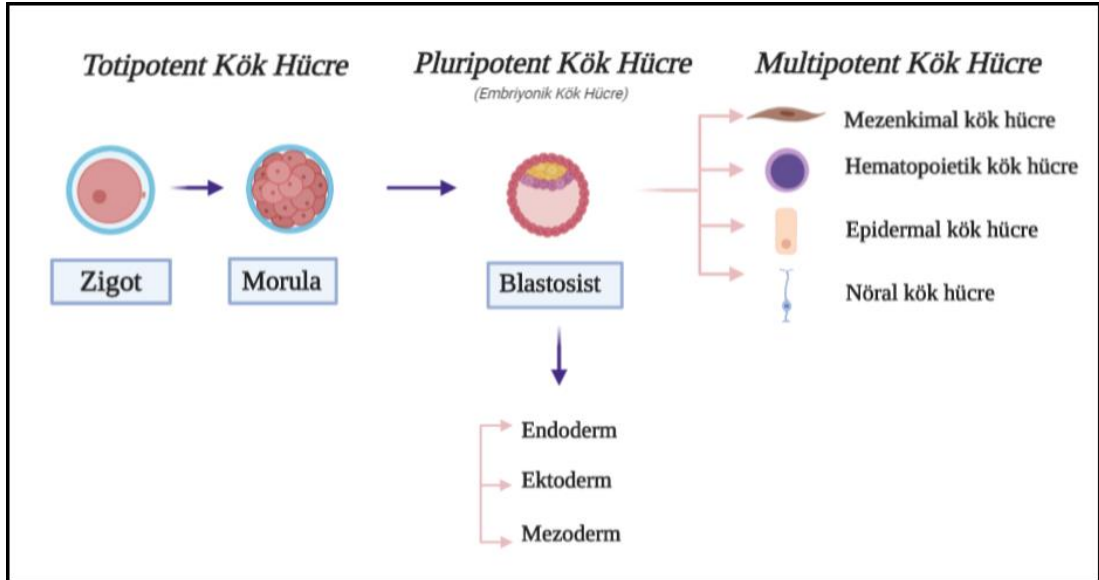
yapılmış ve standart yöntemle Kİ mononükleer hücrelerinden geliştirilen Kİ-MKH'leri ve subkutan yağ doku kökenli MKH'ler (SKY-MKH) ile karşılaştırılmıştır. Benzer şekilde, AML gelişimine yatkınlık oluşturan bir hastalık olan FA hastalarının Kİ'den elde edilen Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinin de karakterizasyonu yapılmış, in vitro adipojenik uyarım altında moleküler değişimleri incelenmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında Kİ stromal hücrelerinin (Kİ-MKH, KİY-MKH) malign hücrelerle etkileşim halinde olduklarını bildiren çalışmalardan yola çıkılarak sağlıklı Kİ donörü ve FA hastalarından geliştirilen Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinde AML-mikroçevre etkileşiminde rolü olduğu ileri sürülen moleküllerin (*Galectin-3 (Gal-3)*, *fatty acid binding protein-4 (FABP-4)*, *leptin receptor (Lep-R)*, *platelet derived growth factor-alpha (PDGFR- α)*) ifadeleri incelenmiş, ayrıca Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinde AML hücreleri (HL-60) ile ko-kültür ortamında ve uzun zincirli yağ asidi olan palmitik asit (PA) maruziyeti sonrası değişimler incelenmiştir (14-18).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler ve Niş

Kök hücreler, kendini yenileyebilme ve gerektiği durumlarda vücudumuzda özelleşmiş olarak bulunan pek çok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip az sayıdaki hücrelerdir. Farklılaşabilme kapasiteleri ve klonojenik özelliklerine göre “totipotent, pluripotent ve multipotent” kök hücreler olarak ayrılabilirler. Totipotent kök hücreler, zigotta morula evresinde olan ve plasentayı ve tek başına bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler, embriyoda bulunan hücrelerdir (EKH). Her 3 germ yaprağından köken alan tüm hücrelere farklılaşabilirler ancak bir organizmayı tamamen oluşturamazlar. Multipotent kök hücreler ise bu hiyerarşinin en altında yer alır ve erişkin kök hücreler olarak bilinirler (19) (Şekil 2.1). Doğumdan sonra bir organizmada bulunan kök hücreler, erişkin tip multipotent kök hücrelerdir. Neredeyse her dokuya veya organa ait fonksiyonel hücrelerin arasında kendi mikroçevrelerinde, özel ismi ile ‘niş’ adı verilen bölgelerde yaşamlarını idame ettirirler. Niş, en basit açıklamasıyla sessiz durumdaki (G_0 fazındaki) kök hücrelerin en çok bulunduğu, korunduğu özelleşmiş alanlar olarak tanımlanabilir. Nişe gelen çeşitli uyaranlar sayesinde kök hücreler, belirli aralıklarla hücre siklusuna girerek asimetric veya simetric bölünme gerçekleştirirler. Böylece sayılarını sabit tutmanın yanında farklılaşarak ait oldukları dokunun hasar tamirini ya da yenilenmesini sağlarlar (20, 21). Patolojik veya stres durumlarında bu iki bölünme tipi arasındaki dengede bir bozulma meydana gelir. Bu bozulmayla birlikte kök hücre havuzu bozulur ve çeşitli yetmezlikler, patolojiler ve hematolojik maligniteler gelişir (22).

Kök hücreler, buldukları dokuya ait tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğine sahiptirler. Hematopoetik kök hücrelerin (HKH) tüm kan elemanlarını oluşturması, mezenchimal kök hücrelerin (MKH) tüm konnektif dokuya ait hücrelere farklılaşabilmesi, nöral kök hücrelerin ise sinir sistemi elemanlarını oluşturması gibi doku/organ spesifik somatik kök hücreler olarak da adlandırılırlar. Multipotent hücrelerin farklılaşması sırasında köklülük özellikleri giderek azalır, sadece belirli hücre tiplerine farklılaşabilirler. Bu aşamadaki hücreler, farklılaşma potansiyellerine göre oligopotent, bipotent veya unipotent olarak adlandırılırlar (19).



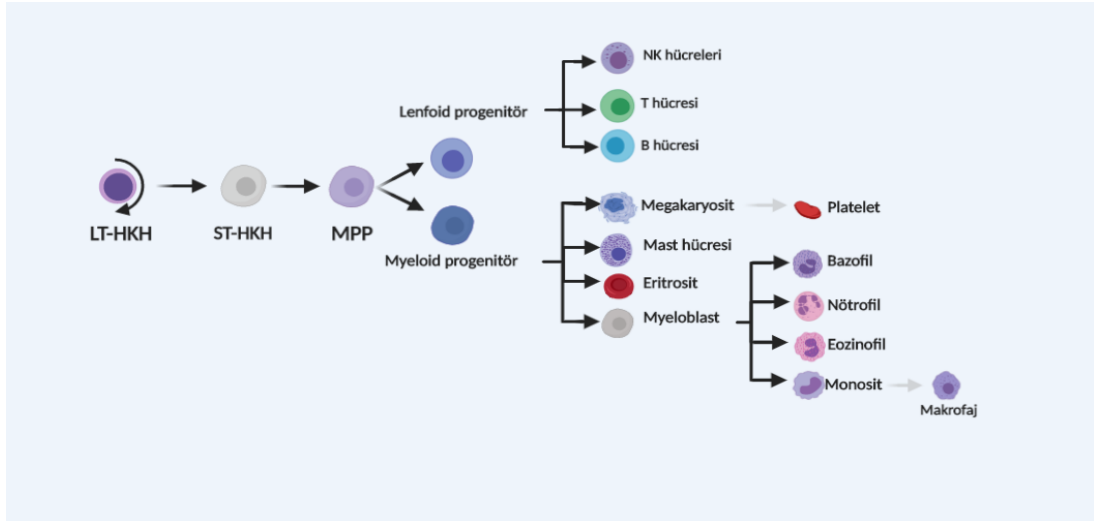
Şekil 2.1. Kök hücre hiyerarşisi

Multipotent özellikte olan bu hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma kapasiteleri pluripotent olan EKH'lere göre kısıtlıdır. Son yıllarda laboratuvar ortamında, somatik hücrelere embriyonik köklülük genlerine ait transkripsiyon faktörlerinin aktarımı ve/veya başka yöntemlerle embriyonik kök hücre benzeri pluripotent karakterde hücreler elde edilebilmektedir. Bu hücrelere uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) denilmektedir. Bu hücreler organizmada bulunmayıp vücudun herhangi bir hücre tipinden laboratuvar ortamında elde edilir ve ilaç araştırmaları, hastalık modelleme araştırmalarında kullanılırlar (23, 24).

Günümüzde tedavi amaçlı kullanılan kök hücreler arasında en başta, Kİ/hematopoetik kök hücre nakli amaçlı ve yaygın kullanılan HKH'ler gelmektedir (25). Bunun yanında, son 10-15 yıldır, rejeneratif tıp amaçlı uygulamalarda klinik çalışma kapsamında MKH'lerin kullanımı da giderek yaygınlaşmaktadır (26). uPKH'lerin ise laboratuvarında çok fazla işleme maruz kalmaları nedeniyle klinik kullanımları açısından riskleri tartışılmakta olsa da rejeneratif potansiyeli heyecan uyandırmaktadır (27). Bu konuda başta Japonya olmak üzere az sayıda kontrollü klinik çalışmada uPKH kökenli hücreler kullanılmaya başlanmış olup halen güvenilirlik yönünde kapsamlı çalışmalar yürütülmektedir. EKH'lerin ise pluripotent özellikleri nedeniyle avantajları olmasına rağmen kullanımında etik kısıtlılıklar ve onkojenik transformasyon riskleri vardır (28, 29).

2.1.1. Hematopoetik Kök Hücreler

İnsanda kan hücreleri Kİ'de yapılmaktadır. İntrauterin hayatta ise kan yapımı yolk kesesi, aorta gonadal mezonefroz, plasenta, karaciğer, dalak ve sonraki aylarda da Kİ'de gerçekleşmektedir. Doğum sonrası tamamen Kİ'ye geçer. Hematopoetik dokular, vücudun rejeneratif kapasitesi en yüksek dokularından birisidir. Erişkin Kİ'de günde yaklaşık 1 trilyon hematopoetik hücre oluşmaktadır. Bunlar arasında eritrositler, trombositler, beyaz küreler (lökosit) ve diğer hücre tipleri yer alır. Bu hücre tiplerinin hepsi HKH'den köken almaktadır. Sağlıklı bir organizma için sağlıklı hematopoezin kritik önemi vardır. Hematopoetik hücreler, vücudun mikroorganizmalarla veya tehlike uyaranları ile savaşından kanamanın durdurulması, dokulara oksijen sağlanması gibi yaşam için tüm kritik fonksiyonların yürütülmesi için çok kritik bir hücre tipidir. HKH'lerin varlığı çok eski yıllardan beri ileri sürülmekle beraber ilk kez 1960'lı yıllarda Till ve McCulloch tarafından hayvan deneylerinde kanıtlanmış ve hematopoezde hiyerarşik model tanımlanmıştır. En erken progenitör olarak bilinen “*long term*” HKH'nin (LT-HKH) basamaklar halinde farklılaşmış hücreleri oluşturduğu bu klasik hematopoez şemasına göre kök hücrenin olgunlaşma sürecinde köklülük özelliği giderek azalır, farklılaşan hücre tipine ait özellikler ortaya çıkar. LT-HKH ardından “*short term*” HKH (ST-HKH), sonra öncü (progenitör) hücreler gelişir. Multipotent projenitör (MPP) hücreler ise daha sonra ortak (*common*) myeloid ve ortak lenfoid kök hücrelere farklılaşarak tüm kan elemanlarını oluştururlar (30, 31). Şekil 2.2'de hematopoeitik kök hücre hiyerarşisinin şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 2. 2. Hematopoetik kök hücre hiyerarşisi.

Hematopoez, sürekli devam eden bir süreçtir. Kan hücrelerine devamlı ihtiyaç vardır. Stres, kanama, enfeksiyon durumlarında artan ihtiyaca bağlı olarak belirli hücresel elemanların yapımı artar. Hematopoezin bazal durumda sürdürülmesi ve/veya artan ihtiyacın karşılanmasında kök hücrelerin aktivitesini, farklılaşacağı yön hücresel elemanlarının belirlenmesinde hematopoetik mikroçevre önemli rol oynar. Kİ stromal hücreleri ve mikroçevreyi oluşturan hücresel elemanlar, ekstraselüler matriks, büyüme faktörleri, kemokin, sitokin, hormon, metabolit, tüm solubl faktörler ve fiziksel, nöral uyarılar, sinyal iletileri ve moleküler faktörler ile hematopoez düzenlenir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda hematopoezin klasik hiyerarşik modelinin mutlak olmadığı, kök ve öncü hücre popülasyonların homojen olmadığı, HKH'ler arasında da belirgin heterojenite ve belirli bir seri hücrelerine yönelenler olduğu (örneğin megakaryosit *primed* HKH'ler) ileri sürülmüş, özellikle stres uyaranlarına maruz kalma durumunda HKH'lerin hiyerarşik basamaklardan geçmeden direkt belirli bir seri hücrelerine farklılaşabileceği gösterilmiştir (32, 33).

HKH'lerin tanımlanmasında hücre yüzey belirteçlerinin analizi en sık kullanılan yöntemlerdir. Bir hücrenin kök hücre olarak adlandırılması için en başta olgunlaşmış serilere ait belirteçleri bulundurmaması gerekmektedir. HKH'lerin nötrofil, lenfosit, monosit gibi hücrelere ait belirteçler yönünden negatif olması gereklidir. Bu duruma "soy hattı negatif" olma durumu denmektedir. Bunun yanında HKH'yi tanımlayıcı bir belirteç olarak CD34 pozitifliği kullanılmaktadır. CD34 sadece hematopoetik değil endotel öncü hücrelerde de pozitiftir. CD38 ise, kök

hücresinin olgunlaşma basamakları sırasında ortaya çıkmaktadır. Bilinen en erken progenitörler olan LT-HKH'ler CD34⁺, CD38⁻ ve soy hattı belirteçleri yönünden negatif olmakla tanınırlar (34-36). Bu fenotipik özellikler yanında son yıllarda yapılan çalışmalarda LT-HKH'lerin metabolik özellikleriyle de tanımlanabileceği gösterilmiştir. Daha immatür olan LT-HKH'lerin genellikle glikolitik metabolizma ile enerji sağladığı ve mitokondrial oksidatif fosforilasyonun daha düşük olduğu bildirilmiş, bu nedenle metabolik parametrelerle de HKH'lerin ayrılabilceği ileri sürülmüştür (37, 38).

2.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Konnektif dokusu kökenli olan ve kök hücre mikroçevresinin öncü stromal eleman olan MKH'ler son yirmi yılda rejeneratif tıp alanında öne çıkmakta olan bir hücre tipidir. İlk kez 1960'lı yıllarda Friedenstein ve arkadaşları ex vivo Kİ kültürleri yapmışlar ve fagositik olmayan, non-hematopoetik karakterde, iğsi görünümlü, adeziv özellikli bir hücre grubunu izole ettiklerini bildirmişlerdir (39). 1991'de bu hücrelere Al Caplan tarafından "mezenkimal kök hücre" adı verilmiştir (40). Daha sonra bu hücrelerin klonal çoğalma özellikleri ve in vitro koşullarda farklılaşma potansiyelleri keşfedilmiştir (41). İlerleyen çalışmalar ise bu hücrelerin konnektif dokuya ait kemik, kıkırdak, kas, yağ dokusu, tendon, ligament ve stromal hücrelere farklılaşma kapasitelerinin olduğunu göstermiştir (42). Bu hücreler, plasenta, Kİ, adipoz doku, sinovial sıvı, dental dokular gibi hemen hemen her dokudan izole edilebilmekte ve dokuların işlevlerinin yerine getirilmesinde stromal destek sağlayarak ve sekreter özellikleriyle kritik rol oynamaktadırlar. Kİ nişinin önemli elamanlarından olan osteoblastlar ve adipozitler de bu hücrelerden köken alırlar. Kİ'deki hücre popülasyonunun yaklaşık %0,002'sini oluşturdukları düşünülmektedir. Hücre-hücre, hücre-matriks ilişkileri ve salgıladıkları solubl faktörler ile de parakrin etki göstererek düzenleyici görev üstlenirler. Bu sebeple vücutta meydana gelen hasarlarda hasarlı bölgeye göç etme yetenekleri vardır (43). MKH'ler *International Society Cellular Therapy* (ISCT) standartlarına göre, in vitro kültür koşulları altında koloni oluşturan birim-fibroblast (CFU-F) özelliği gösteren, plastiğe yapışan hücrelerdir (44). Bu hücrelerin sayıları çok az olduğu için araştırma veya klinik kullanım için in vitro kültür ortamında çoğaltılmaları gerekmektedir.

Kültür koşullarında çoğaltılan MKH'lerin tanımlanmasında, plastik adheran hücreler olmaları, yüzey fenotipleri ve farklılaşma özelliklerinin gösterilmesi gerekir. Yüzey molekülleri olarak, stromal belirteçler yönünden pozitif, hematopoetik belirteçler yönünden negatif olmaları gerekmektedir. Homojen olmamakla beraber, stromal belirteçlerden genellikle; CD73 (ecto-5'-nucleotidase, SH3, SH4), CD90 (Thy-1) ve CD105 (endoglin, SH2, TGF β -RIII) pozitiflerdir. Buna karşın, CD14, CD11b, CD45, CD34, CD79 veya CD19 ve HLA-DR gibi hematopoetik yüzey belirteçleri bakımından negatiftirler (45). MKH karakterizasyonu için in vitro ortamda bu özelliklerinin de gösterilmesi gerekir. MKH'ler, in vitroda ekzojen büyüme faktörlerinin eklenmesiyle uygun koşullar sağlandığı takdirde kemik, yağ ve kıkırdak dokularına farklılaşabilme özellikleri gösterirler. Bunun dışında MKH'lerin klinikteki potansiyel terapötik etkilerini ortaya çıkaran en önemli özellik immünmodülatuar olmaları ve çoğu zaman immünespresif etki göstermeleridir. Bu özellikleri sayesinde MKH'ler immün sistemden kaçabildikleri için allojenik olarak, HLA doku uyumuna gerek bile gerek kalmadan nakil edilebilirler (46). Otokrin ve parakrin etkileri sayesinde graft versus host hastalığında, allograft organ nakillerinde reddin önlenmesinde, otoimmün hastalıkların tedavisinde ve Kİ transplantasyonu sonrası HKH'lerin uzun dönemli engraftmanında ve onların nişe tutunmasında katkıları vardır (39, 47, 48). Ayrıca organ, doku hasarlarının onarımında önemli role sahiptirler. Bu özellikleri nedeniyle halen çok sayıda klinik çalışma yürütülmektedir. Bu hücrelerin intravenöz veya lokal uygulanmasının genellikle güvenli olduğu, kısa sürede ciddi yan etki riskinin düşük olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, malignitesi olan bireylerde stroma desteği sağlayarak malign hücrelerin de artmasına yol açabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Etkinlik yönünden değerlendirildiğinde hayvan deneylerinde oldukça dikkat çekici sonuçlar elde edilmesine rağmen insanlarda yapılan klinik çalışmalar, minimal/parsiyel cevap alındığını göstermekte, bu sonuçlar da MKH uygulamalarında henüz optimal uygulama yöntemlerinin oluşmamış olduğuna işaret etmektedir.

MKH kaynağı olarak en çok kullanılan doku Kİ'dir. Kİ aspirasyonunun invaziv işlem gerektirmesi nedeniyle alternatif kaynaklar da araştırılmıştır. Bunlar arasında özellikle son yıllarda kordon kanı/kordon dokuları ve lipoaspirasyon atık materyallerinden elde edilen adipoz doku kökenli MKH'ler yer almaktadır (49).

Çağımız hastalıklarından obezitede *liposuction*, abdominoplasti gibi yöntemler sıkça kullanılarak fazla yağ alınmış olur. Bu sırada oldukça yüksek miktarlarda atık yağ ortaya çıkar. Araştırmacılar adipoz dokunun stromal vasküler fraksiyonunu incelerken bazı hücrelerin MKH karakteri taşıdığını ortaya çıkarmıştır (49). De Ugarte ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmayla bu hücrelerin diğer dokulardan elde edilen MKH'ler ile aynı oranda farklılaşma kapasitesine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (50, 51). Aynı MKH'ler gibi CD73⁺, CD105⁺ ve CD45⁻, CD34⁻, HLA-DR⁻'tirler (49, 52). Göbek kordonu kökenli MKH'ler de diğer kaynaklara kıyasla daha fazla immünespresif özellik taşımaları ve atık ürün olmaları nedeniyle tercih edilen MKH kaynağı dokular arasındadır.

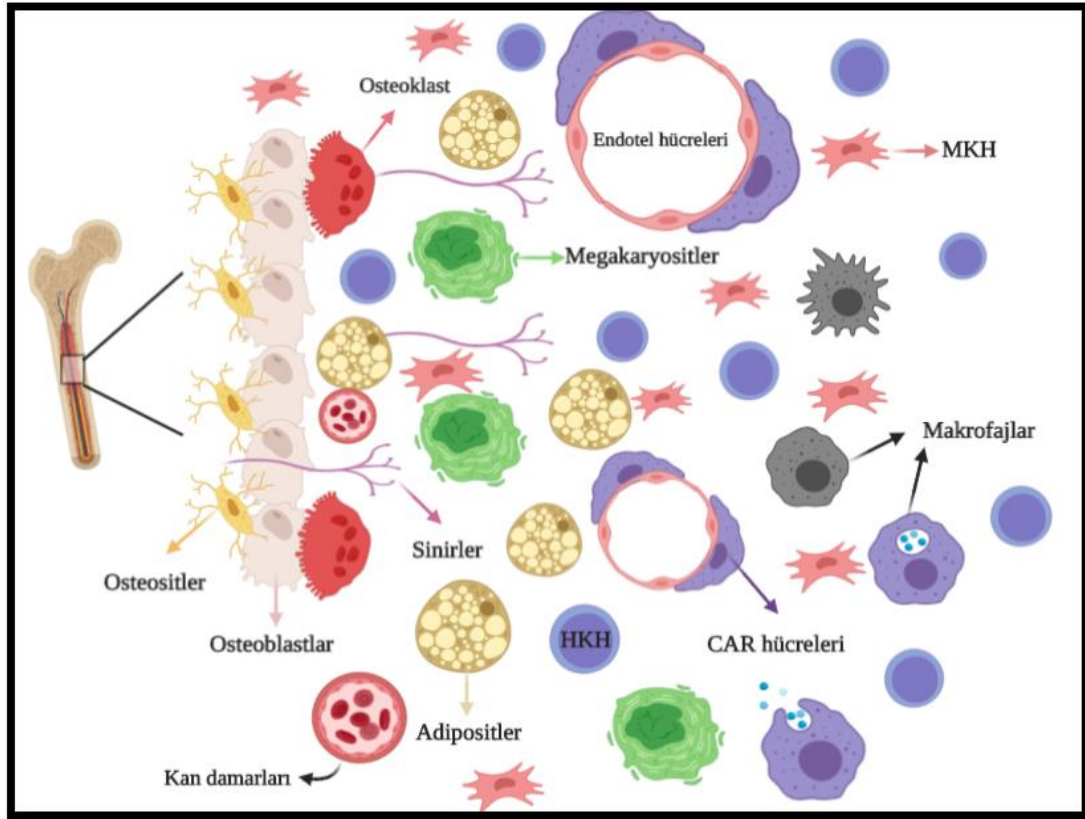
2.1.3. Kemik İliği Kök Hücre Nişi

Kİ, başta HKH'ler olmak üzere vücudun kök hücre yönünden en zengin dokularından birisidir. Mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök/öncü hücreleri barındırmaktadır. MKH'ler, HKH'ler ile hücre-hücre ilişkileri kurarak, ayrıca HKH'nin ekstraselüler matrikse tutunması, çeşitli sekretuar faktörlerle HKH'nin farklılaşmasının uyarılması ya da baskılayarak kök hücrenin siklusun G0 fazında kalmasını veya gerektiğinde kendini yenileyerek ya da diğer dokulara mobilize olmasını sağlayarak sağlıklı hematopoezin sürdürülmesinde kritik rol oynarlar. Endotel öncü hücreler de HKH ile ve MKH'ler ile sürekli etkileşim halinde olup solubl faktörlerin salınımı yoluyla hematopoezin düzenlenmesine katkı sağlarlar. Bu özellikleriyle, Kİ ortamı HKH'ler için ideal bir niş ortamı oluşturur (1).

Kök hücrelerin daha yoğun bulunduğu veya fonksiyonlarının kritik olduğu Kİ, cilt, intestinal sistem, nöronal doku, germ dokusu gibi birçok dokuda kök hücre nişleri tanımlanmıştır (53). Sağlıklı hematopoezin sürdürülebilmesinde Kİ nişi kilit rol oynar (54). Kİ nişi temel olarak perivasküler ve endosteal/osteoblastik niş olarak ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.3). Endosteal nişte osteoblastlar, osteoklastlar, Schwann hücreleri yer almakta iken, perivasküler nişte sinüzoidal endotel hücreleri, CXCL-12'den zengin retiküler (CAR) hücreler, KİY adipositleri ve stromal hücreler olarak bilinen Kİ-MKH'leri bulunur. Endosteal nişin osteoblast ve kalsiyumca zengin ve hipoksik olduğu bilinmektedir. Endosteal niş içinde regülatör T lenfositler sayesinde bir çeşit immün sistemden kaçış alanı oluşturulur ve bu alanda kök hücreler hücre

döngüsüne girmeden yaşamını idame ettir ve burada her türlü toksik ve dış etkilerden korunmuş olur (55, 56). Perivasküler niş ise endotelial progenitör hücreler ve sinüzoidlerce zengin, daha az hipoksik/normoksiye daha yakın olan niş bölgesidir. Herhangi bir sebeple hücre döngüsüne giren kök hücreler perivasküler nişe yönlendirilerek sinüzoidlerden dolaşıma katılırlar. N-kaderin, hücre-hücre adezyonunda rol oynayan ve kök hücrelerin nişlerinde oturması veya nişten ayrılmasında etkili olduğu bilinen bir transmembran proteinidir. HKH'ler ile N-kaderin⁺ endosteal niş osteoblastları arasında güçlü bir bağlanma vardır (57, 58). Bu bağ sayesinde stromaya tutunarak döngüye girmeden kalan HKH'ler homeostaz durumunda sessiz kalma / kendini yenileme / farklılaşma arasındaki dengeyi koruyabilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar, perivasküler alanlarda da sessiz (G0 fazında) HKH'lerin yüksek oranda bulunduğunu göstermiştir (54).

MKH'ler, tüm hücresel nişlerin ortak stromal hücresi olarak karşımıza çıkar. MKH'lerin osteoblastlara, adipositlere, kondrositlere ve perisitlere farklılaşarak nişe katkıda buldukları kabul edilir. Ekstraselüler matriks (ESM) bileşenlerini ve diğer solubl faktörleri sentezlerler (59). Stromal hücreler, hücre kaderini belirleyecek sinyallerin sağlanmasında önemli rol oynarlar. Kİ stromasında yer alan adipositlerin de hematopoezin düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. Nişi özetleyecek olursak; dokuya ait fiziksel yapının özellikleri (basınç ve sınırlar gibi), hücre-hücre veya hücre-ESM etkileşimleri, lokal veya vücudun herhangi bir bölgesinden gelen parakrin ve endokrin sinyaller ile sinirsel aktiviteler sonucu oluşan metabolitler kök hücre nişlerinin hücrelerden ve hücresel olmayan modülatörlerden oluşan kök hücrelerin yaşamlarını idame ettirdikleri özel alanlar olarak tanımlayabiliriz (33, 60, 61).



Şekil 2. 3. Kemik iliğinde hematopoetik niş elemanları. CXCL-12 bağımlı retiküler hücreler (CAR), hematopoetik kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH) ve diğer hematopoetik niş elemanlarına ait şematik çizim gösterilmektedir.

Kİ, yağ dokusunun yoğun olduğu bir dokudur. Kİ adipositleri hematopoetik nişin önemli elemanlarıdır (62). Kemik iliği aspirasyon materyallerinin mikroskopik incelemelerinde bu durum çok belirgin olarak gözlenmekte, özellikle hematopoezin defektif olduğu aplastik anemi, FA, MDS gibi Kİ yetmezliği hastalıklarında, KİY yağ dokusunun belirgin arttığı gözlenmektedir (63). Uzun yıllar Kİ adipositlerinin Kİ’de sadece fiziksel olarak destek olma özelliği öne çıkarken günümüzde metabolik olarak çok aktif hücreler olduğu, hematopoez düzenlenmesinde kritik role sahip oldukları, bunu yanında malign hematopoez ile de ilişkili olabilecekleri ortaya çıkmış ayrıca Kİ adipoz dokusunun diğer adipoz dokulardan farklı, özel işlevleri olduğu ortaya konulmuştur (3).

2.2. Adipoz Dokusu ve Yağ Metabolizması

Adipoz doku, vücudumuzun destek ve bağ dokusu olmasının yanında endokrin görevleri de olan bir dokudur. Ayrıca salgıladığı adipokinler ile otokrin ve parakrin düzenleyici olarak rol oynar (6, 64). Önceleri beyaz, kahverengi ve bej adipoz doku

olmak üzere alt tiplere ayrılrsa da son yıllarda KİY dokusu dördüncü bir adipoz doku çeşidi olarak kabul edilmektedir (5, 6). Farklı tiplerde yağ dokulara ait olan adipositler vücudun enerji depolama ve termogenezinin sorumludur. Kahverengi yağ doku mitokondri içeriği yönünden zengin olup, belirgin UCP-1 (*Mitochondrial brown fat uncoupling protein 1*) ifade etmeleriyle ayırt edilirler. Serbest yağ asitlerini yıkarak bebeklerde ve küçük memelilerde ısı üretimini sağlar (65). Beyaz yağ doku çoğunlukla yetişkin insanlarda, alt vücut veya karın kısımlarındaki büyük deri altı yağ depolarını oluşturur ki bu da vücudun toplam yağ dokusunun %85'ini oluşturur. Bu bölgeler dışında omental, mezenterik ve retroperitoneal alanlarda da beyaz yağ doku depoları mevcuttur.

2.2.1. Kemik İliği Yağ Dokusu

Mezenkimal kök hücrelerden köken alan adipositler Kİ mikroçevresinin en önemli ve aktif hücrelerdir. Serbest yağ asitleri ve adipokinlerin sentezlenmesi yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak kemik yeniden modellenmesi ve hematopoez üzerinde (yani Kİ nişi üzerinde) etkilidirler. KİY dokusu, doğumda distal iskelet bölgelerinde oluşmaya başlar (sarı ilik; *constitutive marrow adipose tissue/cMAT*), yaşam boyunca da hematopoetik ilikte adiposit üretimi devam eder (kırmızı ilik; *regulated marrow adipose tissue/rMAT*) (66). Hayvan deneylerinde bu iki farklı yağ dokusunun adipositlerinin farklılık gösterdiği; kırmızı ilik adipositlerinin sarı iliğe göre daha küçük, daha fazla doymuş yağ asidi içeriğine sahip ve adipojenik transkripsiyon faktörlerinden CEBP/ α ve β ifadelerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. İnsanda, KİY dokusu miktarının; yaşlanma, menopoz, anoreksiya nervoza gibi diğer metabolik durumlar ve kemik mineral yoğunluğunun kaybı ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (67). Kırmızı ilikteki KİY dokusu miktarı yaş ilerledikçe artmaktadır; 70 yaşında bir kişide iliğin yaklaşık %70'ini kaplamakta ise de kişiden kişiye önemli değişiklikler bulunmaktadır. Yaşlanma sürecinde kemik kitlesinde azalma, yağ dokusunda subkutan dokudan, Kİ, kas, karaciğer gibi ektopik bölgelere yöneldiği bildirilmiştir (68).

Son yıllarda, KİY dokusunun metabolik hastalıklar, kemik metabolizması, yaşlanma ve kanser ile kritik ilişkisinin ortaya koyulmasıyla birlikte 2015 yılından itibaren “*The International Bone Marrow Adiposity/BMA Society*” yıllık toplantıları

yapılmaya başlanmıştır. KİY dokusu, osteoporoz, diyabet, anoreksi, lösemi ve bazı tedavilerin (kortikosteroid, radyoterapi, kemoterapi vb) etkileri ile yakından ilgilidir. Bu özellikleriyle farklı disiplinlerden araştırmacıların ilgisini çekmekte olan bir alandır. Çalışmalar arasında karşılaştırma ve objektif değerlendirme yapılabilmesini mümkün kılmak, metodolojiler, problemler ve gelecek hedefleri ortaya koymak amacıyla BMA Derneği tarafından yapılan 2017 yılı toplantısında KİY dokusunun tanımlanması ve standardizasyon sağlanmasına yönelik rehber hazırlanması girişimleri başlatılmış ve 2020 yılında yayınlanmıştır (11). Bu rehberde, Kİ adipositlerinin histomorfometrik incelenmesi, in vivo ve in vitro görüntüleme yöntemleri ile incelenmesi, hücre izolasyon ve ilgili metodolojilerin belirlenmesi, in-vivo modülasyon ve in-vivo izleme yöntemlerinin (*lineage tracing*) geliştirilmesi konuları üzerinde durulmuş ve Kİ adiposit bankalama konuları gündeme getirilmiş, konuyla ilgili eksiklikler, zorluklar tartışılmıştır. Bu kapsamda, özellikle metodolojik harmonizasyon gereğine, etkili faktörlerin net olarak belirlenmesine, KİY dokusunun diğer dokulardan farkının belirlenmesi için yöntemlerin tanımlanmasına ve Kİ adipositleri ifadesi baskılanmış hayvan modellerine ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır. Bu gelişmeler, KİY dokusu ile ilgili çalışmaların önemini ortaya koymaktadır. Bu dokunun endokrin/metabolik yönden önemi yanında, özellikle lokalizasyonu itibarıyla da hematoloji alanı ile yakın ilişkisi açıktır.

Diğer yağ dokularından farklı olarak KİY dokusunun en kritik rolü hematopoez regülasyonunun sağlanmasıdır (56, 69). Hematolojik malignite gelişiminde ve patofizyolojisinde malign hücre-KİY adipositlerinin karşılıklı etkileşiminin rolü vardır (3). KİY dokusunda meydana gelecek değişiklikler çeşitli patolojilere yol açabilir veya hastalığın seyrinin değişmesinde rol oynayabilir. Lipid metabolizmasının kök hücre biyolojisi ve lösemi ile yakın ilişkisi nedeniyle hedeflenmiş tedavi adayları moleküller araştırılmaktadır. Preadipositlerden adiposit farklılaşması aşamasında sitoplazmada biriken lipidin özellikleri adiposit sınıflandırılmasında belirleyici faktörlerden birisidir. Beyaz yağ hücreleri uniloküler özellikte ve tek bir lipid damlası içerir, sitoplazma ve çekirdek periferite itilmiştir. Kahverengi yağ hücreleri ise daha küçük olup multiloküler lipid damlaları içerir, mitokondri içeriği yönünden daha yoğun olup vaskülarize özelliktedir. KİY dokusu adipositleri beyaz yağ hücreleri gibi uniloküler morfolojide olsa da elektron mikroskopik incelemeler ve fonksiyonel analizlerin

sonucu beyaz ve kahverengi yağ dokusundan farklı özellikte olduğu ve metabolik olarak kahverengi yağ dokusuna daha yakın olduğunu, farklı öncül hücrelerden geliştiğini düşündürmüştür (13, 70). Kİ adipositlerinin sinüzoid endotel hücreleri ile yakın komşulukta olduğu, LepR⁺ perisinüzoidal hücrelerden, hatta farklı bölgelerden (örneğin endosteal ve perivasküler bölgeler) ve farklı tip prekürsör hücrelerden geliştikleri ileri sürülmektedir.

KİY dokusunun lokalizasyonu dışında diğer yağ dokulardan farkları, osteojenik transkripsiyon faktörlerini daha yüksek oranda ifade etmesi ve Kİ-MKH'lerinin Leptin reseptör ifade eden Lep-R⁺ subpopulasyonundan gelişmiş olmasıdır. Ayrıca, adipokinler içerisinde metabolizma yönünden avantajlı olan adiponektin yapımının KİY dokusunda beyaz yağ dokusuna göre daha fazla olduğu, bu özellikleriyle de daha farklı endokrin fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (13).

Beyaz yağ dokusu sınırsız olarak genişleyebilmekte, buna karşın KİY dokusu kemikler içerisinde yer kısıtlılığı nedeniyle sınırlı ölçüde genişleyebilmektedir. Ayrıca hematopoetik ve kemik doku hücreleri ile komşuluk nedeniyle farklı düzenlemeye sahiptirler. Kalori kısıtlandığında beyaz yağ dokusunda azalma olurken kırmızı ilik yağ dokusunda (rMAT) artış gözlenmektedir (71). Kalori kısıtlaması ile birlikte egzersiz durumunda ise aksine KİY dokusunda küçülme gözlenmektedir. Bu bulgular KİY metabolizmasının beyaz yağdan farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Kalori kısıtlanması halinde hücrede yağ asit tutulmasından (*uptake*) sorumlu bir molekül olan CD36 ifadesinin artmasının KİY dokusu artışına katkı sağladığı ileri sürülmüştür (72).

KİY dokusu ile ilgili çalışmalarda en önemli konulardan birisi bu hücrelerin izolasyonu ve tanımlanmasıdır. Farklı yöntemlerin kullanımı nedeniyle araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde zorluk yaşanmaktadır. KİY dokusu eldesi amacıyla kullanılan yöntemler arasında; Kİ-MKH'lerinin izole edildikten sonra in vitroda adiposit yönünde uyarılması, kollajenaz ile primer KİY adipositlerinin enzimatik pürifikasyon yöntemiyle eldesi, total KİY dokusunun doku eksplantı gibi yöntemler vardır (73). Farklı çalışmalarda KİY adipositlerinin interlökin-6 (IL-6), makrofaj inflamatuvar protein-1 α (MIP-1 α), granüosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), granüosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), kemokin ligand-1 (CXCL1), kemokin

ligandı-2 (CXCL-2) ve interlökin-8 (IL-8) salınımı yaptıkları ve bu sitokinler tarafından da osteoklast farklılaşmasının ve aktivasyonunun uyarılması KİY dokusunun kök hücre trafiğinde de rolü olduğuna işaret etmektedir (74). Bu özellikler KİY dokusunun sekretuar özelliklerini göstermektedir. Bu sitokinler dışında başta leptin ve adiponektin olmak üzere adipokinlerin de salınımı olmaktadır (13). Son yıllarda ileri teknolojik yöntemler, tek hücre analizleri, yüksek verimlilikte teknolojilerin kullanılması hücrelerin detaylı karakterizasyonunu mümkün kılmış. Diğer taraftan güncel görüntüleme teknikleri ile in vivo KİY dokusunun görüntülenmesi ve kantifikasyonu mümkün olmuştur. Proton manyetik rezonans spektroskopisi, 9.4T MR görüntüleme teknikleri, mikro CT bazlı Kİ dansite ölçümleri, hayvanlarda kemiklerin osmium boyanması ve mikro CT görüntüleme ile ileri görüntü işleme tekniklerinin kullanımı bu konuda önemli adımlardır (75).

2.2.2. Lösemi ve Yağ Metabolizması

Serbest yağ asitleri (SYA) sentezinin kanser biyolojisinde önemli rolü olduğu son yıllarda çok vurgulanan bir konu olup kanser tanısı, seyri ve tedavisinde potansiyel bir hedef olarak büyük ilgi uyandırmaktadır. Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerde baskılanmış olan yağ asit sentez mekanizmalarını harekete geçirerek kendi yağ asit kaynaklarını temin ettiği bildirilmiştir. Mikroçevrenin bu mekanizmadaki rolü Yang ve ark.'nın 2019 yılında yaptıkları çalışmada KİY dokusunun lösemi gelişimi sırasında değişime uğrayarak lösemik hücrenin proliferasyonunu, progresyonunu desteklemek üzere lipoliz yoluyla serbest yağ asitleri temin ettiği ileri sürmüşlerdir (10). 2016 yılında yapılan bir çalışmada ise adipoz dokunun malign hematopoetik kök hücreler için ekstramedüller bir rezervuar haline geldiği tanımlanmış ve tümör gelişimini desteklediği bildirilmiştir (76). Ye ve ark.'nın fare blast krizli kronik myeloid lösemi (KML) modelinde yaptığı bu çalışmada, adipoz dokuya yerleşen lösemik kök hücrelerin (LKH) pro-inflamatuar bir fenotip sergilediği ve gonadal yağ dokuda lipolizi indüklediği, bu mekanizmanın da lösemide ekstramedüller tutulum gelişmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Gonadal yağ dokunun lipolize uğramasıyla beraber LKH'lerde özellikle yağ asidi translokazı olarak bilinen CD36'yı eksprese eden bir alt popülasyon çoğalır ve lipolizi indüklemeye devam eder. Bu CD36⁺ hücreler adipoz dokuda zenginleşerek kemoterapiden de korunur (77).

Yağ asitleri membran yapıtaşı olmalarının yanı sıra vücutta enerji kaynağı olarak da kullanılırlar. Kanser hücreleri enerji metabolizmalarında genel olarak glikozu kullansalar da prostat kanseri ve lösemiler gibi bazı kanser türlerinde, hücreler enerji kaynağı olarak yağ asitlerinin β -oksidasyonunu tercih ederler. Kanser hücreleri bu metabolizmayı kendi yararlarına kullanabilmek için leptin ve adiponektin gibi düzenleyici adipokinleri üretirler (17). SYA'lar, çeşitli hücre tipleri için önemli bir enerji kaynağı olsa da bu besin maddelerinin yüksek konsantrasyonlarına kronik maruziyet sonrasında lipotoksisite adı verilen bir süreç başlar. Bu süreçte hücre fonksiyonları bozularak reaktif oksijen radikalleri oluşumu, seramid sentezi ve endoplazmik retikulum (ER) stresi gibi olaylar gerçekleşmeye başlar. Kanserde hücre büyümesi ve proliferasyonu enerji gerektirir. Biyosentez faaliyetleri, vücudun yapıtaşları olan protein, lipid, yağ aside ve nükleik asit sentezi ile hücre bölünmesi sağlanır. Kanser metabolizmasının temeli lipid metabolizmasının şekillenmesi ile sağlanır. Kanserde kanda SYA düzeylerinde önemli değişimler olmaktadır. Membran özelliklerinin kazandırılması, protein modifikasyonu, sinyalizasyon değişimleri ve kanser gelişim mekanizmalarının tetiklenmesinde rol oynarlar. Bazı proteinlerin ifadesinin değişimi, onkogen aktivasyonu da yağ asit seviyelerinin artmasında rol oynar. Bu konuda, bir lipid şaperonu olan olan FABP-4'ün tümör mikroçevresinde bulunan adipositlerden sağlandığı ve AML gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir (78). Yağ asit metabolizmasının lösemi biyolojisinde rolünü gösteren diğer bir gözlem, yağ asit oksidasyonunun inhibe edildiği durumlarda lösemik hücrelerin apoptoza duyarlı hale gelmesidir (79). Palmitik asit (PA) (hekzadekanoik asit) 16 karbonlu doymuş bir yağ asidi olup, hücreler üzerinde lipotoksisiteye bağlı ER stresi oluşmasında rolü vardır (80). Vücutta karbonhidratların fazlası PA'ya çevrilir. Yağ asit sentezinde ilk oluşan yağ asidi PA olup daha uzun zincirli yağ asitlerinin öncülüdür. Bu özellikleriyle de vücudun ana bileşiklerinden biridir. Canlılarda en sık rastlanan doymuş yağ asididir. Negatif geri bildirim mekanizması ile fazla yağ asit sentezini baskılar. Ayrıca bazı proteinlere palmitil grubu eklenerek proteinlerin membranda lokalize olması/konumlanması sağlanır. Membran fosfolipidlerinin de önemli bir bileşenidir. Yağ metabolizmasının ve serum yağ asit düzeylerinin lösemi gelişim sürecinde önemli değişiklikler gösterdiği bildirilmiş, lipidlerin AML heterojenliğinde ve seyirinde potansiyel rolleri üzerinde durulmaktadır (81). Doymuş yağ asitlerinin DNA hasar

tamir mekanizmalarını da etkileyerek tümör gelişiminde rolleri bildirilmiştir (82). SYA sentezinin tümör gelişimi ve progresyonu ile ilişkisi farklı solid tümörlerde de bildirilmiş, meme kanserinde tümör hücrelerinin endojen yağ asidi sentezledikleri gösterilmiştir. Literatürde PA'nın lösemi hücrelerinde apoptotik etkiye sahip olduğu ve 3T3-L1 gibi preadipositik hücre hatlarında lipolitik etkiye sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak bu durumu etkileyen çeşitli faktörler vardır, maruziyet dozu, süresi önemlidir (83). Diğer çalışmalarda PA'nın lipolizi uyararak AML hücrelerinin gelişimine katkı sağladığı da bildirilmiştir (84). Ayrıca diğer yağ asitlerinin sentezi için de prekürsördür. PA'nın mikroçevre üzerinde etkileri yeterince araştırılmamış bir konudur.

Kanserde hücre büyümesi ve proliferasyonu enerji gerektirir. Biyosentez faaliyetleri, vücudun yapıtaşları olan protein, lipid, yağ aside ve nükleik asit sentezi ile hücre bölünmesi sağlanır. Kanser metabolizmasının temeli lipid metabolizmasının şekillenmesi ile sağlanır. Kanserde kanda SYA düzeylerinde önemli değişimler olmaktadır. Membran özelliklerinin kazandırılması, protein modifikasyonu, sinyalizasyon değişimleri ve kanser gelişim mekanizmalarının tetiklenmesinde rol oynarlar. Bazı proteinlerin ifadesinin değişimi, onkogen aktivasyonu da SYA seviyelerinin artmasında rol oynar. Bu konuda, bir lipid şaperonu olan olan FABP-4'ün tümör mikroçevresinde bulunan adipositlerden sağlandığı ve AML gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir. Yağ asit metabolizmasının lösemi biyolojisinde rolünü gösteren diğer bir gözlem, yağ asit oksidasyonunun inhibe edildiği durumlarda lösemik hücrelerin apoptoza duyarlı hale gelmesidir (79).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada da ise AML hastalarının tanı anında plazma lipidom incelenmesi sonucunda plazmada lipidlerinin, muhtemelen artmış yağ asidi oksidasyonu sonucu azaldığı, araşidonik asit ve prekürsörlerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve metabolik değişimlerin hastaların blast sayıları ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (85). Önceki çalışmalarda da AML hücrelerinde bazı lipidlerin lökositlere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Normal olgun nötrofillerle karşılaştırıldığında, doymamış yağ asitleri yüzdesinin artmasıyla toplam kolesterol ve kolesterol / fosfolipid oranında azalma olmuştur (86). Bu çalışmada da plazma total yağ asitleri ve kolesterol seviyeleri düşük gözlenirken, SYA'da artış ve artmış yağ asit oksidasyonu ile birlikte sfingolipidler, fosfokolinler, trigliseridler ve kolesterol

esterlerinde azalma gözlenmiştir. Başka bir çalışmada da yağ asidi oksidasyonunun farmakolojik inhibisyonunun, MKH besleyici tabakası üzerinde kültürlenmiş AML hücrelerinin çoğalmasını geciktirdiğini gösterilmiştir. Yazarlar, seramid üretimi gibi oksidatif olmayan yağ asidi metabolizmasına geçişin hücre sağkalımını azaltabileceğini öne sürmüşlerdir (87).

Yağ asit oksidasyonu kanser hücrelerinin temel özelliklerinden biri olarak görülmektedir. Serbest yağ asidi döngüsü insülin ile yakın ilişki göstermektedir. Fizyolojik koşullarda insülin, adipositlerden, katekolamine bağlı lipolizi inhibe eder, SYA'ni azaltır. Benzer şekilde, plazma SYA'ları da insülin sekresyonunu etkiler (88). Diğer taraftan PA'nın da insüline benzer şekilde adipositlere glukoz geçişini artırdığı gösterilmiştir (89). PA'nın yağ hücrelerine glukoz geçişini artırma mekanizmaları iyi bilinmemektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmada intraselüler Ca^{+2} bağımlı bir mekanizmanın etkili olduğu gösterilmiştir (90). PA'nın hücreye glukoz girişi üzerindeki uyarıcı etkisinin yağ dokusunda düzenleyici bir mekanizmayı temsil ettiği ve insülinden bağımsız bir gliserol fosfat kaynağı sağlayarak lipolizin uyarılması sırasında fazla SYA salınımını sağladığı ileri sürülmektedir. Bu özellikler, PA'nın glukoz metabolizması üzerindeki etkilerini ve kanser patofizyolojisine bu mekanizma üzerinden de olası etkilerini akla getirmektedir.

Adipositlerde lipoliz, açlık ve toklukta farklıdır. Karbonhidratlar yeterli/fazla olduğunda glukoz ile enerji sağlanır. Lipoliz minimal iken lipogenez artmıştır. Dokularda trigliserit birikimi olur. Aksine açlıkta ise trigliseritten yağ asit salınımı olur.

Bilindiği üzere hematopoezde pek çok sitokin ve parakrin etkenin varlığıyla regüle edilen kompleks bir homeostaz mekanizması vardır. Ko-kültür koşullarında uygulanan PA'nın da hücreler üzerinde yağ asidi metabolizması üzerinden ve adipojenik farklılaştırma etkisi ile değişiklikler yaptığı bildirilmektedir (88). Bu sebeple lösemik faktörlerin nişe etkisinin incelenmesi amacıyla adipogenez ile ilişkili moleküllerin ifadelerine bakılmıştır. Bunlardan birisi tip 1 sitokin reseptörlerinden olan leptin reseptörüdür (LepR). Leptin geni kromozom 7 üzerinde yer alır ve 16 kD ağırlığında 167 aminoasitlik bir protein olup adipositlerden salınan bir adipokindir. Besin alımı ve metabolizmasını regüle eder (91). Dolaşımdaki leptin seviyesinin artışı

ile vücut enerji depolamasına giderek adipoz dokuda yağ birikimini sağlar. Böylece adipositlerde yağ depolaması başlar. Ayrıca myeloid ve eritroid serinin gelişimini sitümüle eder. Leptin-R ise IL-6 reseptörü, G-CSF reseptörü ve lösemi inhibitörü ile sekans benzerliği sergiler. Hematopoetik sitokin süper ailesine ait bir reseptördür. Kİ-MKH'lerinde JAK/STAT yolağı üzerinden etki gösterir. K562, HEL ve M07E gibi lösemik hücre hatlarında oldukça yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Yeni tanı ve tekrarlayan AML, KML ve ALL hastalarında da gösterilmiştir. Obezite ile kötü prognostik lösemiler arasında bir ilişki olduğu da gösterilmiştir (92, 93). Lösemi dahil kanser biyolojisiyle ilişkilendirilen bir diğer adipokin adiponektindir. Aktive edilmiş protein kinaz (AMPK), p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) fosforilasyonu ve *peroxisome proliferator-activated receptor-alpha* (PPAR- α) ligand aktivitesi dahil olmak üzere bir dizi dokuya bağlı sinyal transdüksiyon olayını başlatır (94). 30 kD ağırlığına sahip bu molekülün yapılan çalışmalar ile lösemik hastalarda sağlıklı kontrollere göre düşük oranda ifade edildiği görülmüştür (95). Ayrıca Kİ interstisyel sıvısında da aşağı regüle edildiği gösterilmiştir. Bu iki molekül, lösemi patogenezindeki etkilerinin yanı sıra erken ve geç adipojenik belirteçler olması sebebiyle karakterizasyon testlerinde kullanılmıştır.

Çalışmamızda incelenen bir diğer molekül olan Gal-3, N-asetilgalaktozamin residülerine afinitesi olan bir karbonhidrat bağlayıcı proteindir (96). Hücre içinde nükleus ve sitoplazmada lokalize olarak bulunmasıyla birlikte hücre yüzeyine ve ekstraselüler alana da taşınan bir moleküldür. Kanser progresyonunda Gal-3, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecinde etkili olan birçok molekül ile ilişkili olup kanser migrasyonu-invazyonu üzerinde etkilidir. Bazı kanser türlerinde yüksek ifade olurken MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında aşağı regüle olduğu tespit edildiğinden doz bağımlı etkisi olduğu düşünülmektedir. HeLa hücre hattında Gal-3'ün MAPK/ERK-1/2 yolağı üzerinden hücre göçünü arttırdığı gösterilmiştir. MKH'lerde Gal-3'ün artışı ile artan hücre göçü, RhoA GTPaz aktivitesinin inhibisyonuna ve artmış pERK1/2 ve pAkt'ye bağlıdır. Lösemik kök hücrelerde de yüksek ifade olmakta, kemoterapi direnci ile de ilişkilendirilmektedir (15, 97).

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), yağ asidi depolanmasını teşvik eden ve glikoz homeostazını etkileyen adipokin ve hormonların ekspresyonunu düzenler. Dolayısıyla, PPAR- γ ligandlarının pleiyotropik etkilerinin

net sonucu, insülin duyarlılığının gelişmesidir. Bu sebeple obezite, diyabet ve kanser gelişiminde önemli bir yeri vardır (98). Boyd ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PPAR- γ agonistlerinin in vivo uygulanması sonucu lösemik büyüme baskılanmış, sağlıklı hematopoezin sürdürülmesinde önemli olan Kİ adipogenezini indüklediği gösterilmiştir (99).

PDGFR- α , trombosit türevi büyüme faktörü ailesinin üyeleri için bir hücre yüzeyi tirozin kinaz reseptörünü kodlar. Bu büyüme faktörleri, MKH için mitojendirler. PDGFR- α ile ilişkili birçok AML vakası, özellikle diğer eşzamanlı sitogenetik anomaliye sahip olanlar, tedavide imatinib direncini gösterir. ETV6-ABL1 gibi nadir translokasyonları olan hastalar iyi tanımlanmamaktadır ancak imatinibe sınırlı yanıt ve kötü sonuçlarla agresif bir klinik seyir izliyor gibi görünmektedir (18). PDGFR- α ve/veya Lep-R pozitif fibroadipojenik prekürsörler, perivasküler hücreler MKH'lerin küçük bir subpopulasyonunu oluşturmaktadır (100).

Yağ asit oksidasyonu birçok hücre tipinde “*uncoupling*” ve/veya termojenik fenotip ile asosiyedir. Malign hücrelere yaşam avantajı sağlayan moleküllerden birisi *uncoupling proteinler*'dir (UCP). UCP-1 kahverengi yağ dokusunda ağırlıklı olarak bulunan ve termogenez regülasyonunda etkili bir moleküldür (101). Soğuğa maruziyet sonrası UCP-1 ifadesinde artış olmaktadır. Literatürde, MKH-lösemik ko-kültür ortamında lösemik hücrelerin yaşamını desteklemek üzere mitokondrial fonksiyonların baskılanması yerine mitokondrial metabolik yönelim olduğu gösterilmiştir. MKH'lerin lösemik hücrelerde mitokondrial “*uncoupling*” i uyardıkları ve UCP-2 birikimine yol açtıkları gözlenmiş, lösemik hücrelerin glukoz/pirüvat oksidasyonu yerine metabolik yeniden programlanma ile yağ asit oksidasyonuna yöneldiklerini düşündürmüştür. UCP-2 ifadesinin kemorezistan kanser hücrelerinde yüksek olduğu ve bu yüksekliğin apoptoz eşiğini yükselterek apoptozis direncine yol açtığı gösterilmiştir (102). Bu tez kapsamında, KİY dokusunun özelliklerinin belirlenmesi amacıyla UCP-1 ifadesine de bakılmıştır.

Bu tez çalışmasında lipid metabolizmasını düzenleyici moleküllerden birisi olan ve inflamasyon ve lösemi ile ilişkilendirilen FABP-4'te (*fatty acid binding protein-4*) incelenmiştir. FABP-4 adiposit ve makrofajlarda ifadesi yüksek olan bir moleküldür ve başta diyet olmak üzere çevre koşullarıyla kolaylıkla etkilenmektedir.

Ayrıca birçok kanser hücrelerinde de ifade olmaktadır (9). AML blastlarının adipositleri metabolik değişime uğratarak hormon sensitif lipazın fosforilasyonunu sağlayarak lipoliz oluşturulmasında rol oynar. Ko-kültüre maruz kalındığında FABP-4 mRNA ifadesinin blastlarda ve adipositlerde arttığı gösterilmiştir. Aynı grubun diğer bir çalışmasında da AML hücrelerinde FABP-4 ifadesindeki artışın vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sinyali ile oluştuğu ve AML biyolojisinde FABP-4/DNMT1 regülör “*feedback loop*” un önemi gösterilmiş ve terapötik hedef olabileceği vurgulanmıştır (14).

2.3. Fankoni Anemisi

Fankoni anemisi (FA), konjenital anomaliler, Kİ yetmezlikleri ve kansere yatkınlık ile seyreden, otozomal resesif olarak kalıtılan bir genetik instabilite sendromudur. Sadece FANCB geni X-bağımlı olarak kalıtılır. Dünya çapında 200.000 insanda 1 kişide görülmektedir. FA genleri, DNA replikasyonu ve gen transkripsiyonu sırasında meydana gelen DNA interstrand çapraz bağlarının tamirinde görevlidir. FA genlerinde ortaya çıkan, bilinen 22 mutasyon sonucu oluşur. Bu genlerden FANCC, DNA hasar tamirinde rol oynar ve bu mutasyona sahip hastalarda mutajen ajanlara karşı aşırı bir duyarlılık vardır. FANCC mutasyonunda kromozomal kırıklarının gösterilmesi tanıda önemli rol oynar. Hastalarda çeşitli anomaliler (boy kısalığı, mikrosefali, mikroftalmi, pigmentasyon anomalileri, kemik defektleri, iç organ anomalileri) yanında ilerleyici Kİ yetmezliği bulguları ve malignite eğilimi (akut myeloblastik lösemi, non-hematolojik solid tümörler-baş boyun, cilt vb) çok artmıştır. Bu hastalığın izleminde sağlıklı vericilerden hematopoetik kök hücre nakli yapılması hem ağır Kİ yetmezliğinin, hem de lösemi riskinin ortadan kaldırılması /minimalize edilmesi açısından önemli yer tutar (12, 103, 104).

FA hastalarında genotip-fenotip ilişkisi bazı mutasyonlarda oldukça spesifiktir. Örneğin FANCG hastaları ve onun bialelik *null* mutasyonu olan FANCA ile FANCC hastaları karşılaştırıldığında, ağır Kİ yetmezlik bulguları ve artmış lösemi insidansı izlenmektedir. Yine de aynı mutasyona sahip olan bireylerde bile bazen hastalık fenotipi farklı olabilmekte, bazı hastalarda anomaliler minimal olmaktadır. FA hastaları mutajen ajanlara, kimyasallara, çevre kirleticilerine, ksenobiyotiklere ve zararlı ışınlarla çok duyarlıdır (105). Hastalarda var olan genetik defektin yanında,

hastalık fenotipinin ortaya çıkmasında çevresel faktörlerin de etkisinin önemli olacağından yola çıkılarak bu tez çalışmasında, hastalarda hayati öneme sahip olan Kİ yetmezliği ve lösemi gelişimi sürecinde lokal Kİ mikroçevresinin etkisi hakkında fikir sahibi olmak amacıyla FA hastalarının Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinin incelenmesi planlanmıştır. Literatürde, FA hastalarında kemik defektlerinin ön planda olması nedeniyle hastaların MKH'lerinden osteojenik farklılaşma aşamasında sorun olabileceği, bunun da hematopoez üzerinde olası olumsuz etkilerinden yola çıkılarak yapılan ve FA Kİ-MKH'lerinin incelendiği çalışmalarda MKH'lerde farklı defektler saptanmıştır. Laboratuvarda FA HKH'lerinin çoğaltılması zor olup, hipoksik ortam ve özel koşullar gerektirmekte, buna karşın MKH'lerin in vitro üretiminde çok önemli bir problem ile karşılaşmadığı gözlenmiştir. Literatürde FA hastalarının Kİ mikroçevresinin incelendiği çalışmalarda yüzey belirteçleri açısından sağlıklı MKH'ler ile benzer oldukları ancak kültür sırasında senesense girdikleri ve uzun süre proliferasyon kapasitelerinin daha düşük olduğu görülmüştür (106, 107).

Ayrıca *stem cell factor* (SCF), *IL6*, *transforming growth factor-β* (TGF-β) seviyelerinde tespit edilen değişiklikler ve bununla muhtemel ilişkisine değinilerek *PBX/Knotted 1 Homeobox 2* (PKNOX2) transkripsiyon faktörünün ifadelerinde de değişiklikler bildirilmiştir (108, 109). Diğer taraftan FANCC ve FANCG homozigot mutant farelerde (FANCC^{-/-}; FANCG^{-/-} *double knockout*) MKH'lerin hematopoez destekleyici özelliklerinin bozulduğu, bunun da kısmen, MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının bozulmasıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada, diğer çalışmaların aksine FA hastalarının da Kİ-MKH'lerinde osteojenik farklılaşmada azalma ve hematopoez destekleyici özelliklerde bozulma gösterilmiştir (110). Bu nedenle MKH/HKH ko-transplantasyonunun potansiyel yararlarına değinilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bireyler

Bu tez çalışmasında, Kİ nakli vericisi olan sağlıklı bireylerden ve FA hastalarından alınan Kİ örnekleri ile çeşitli sebepler ile karın içinden yağ dokusu alınması gereken sağlıklı vericilerden “*liposuction*” yöntemi ile alınan yarı katı/sıvı yağ örnekleri ile çalışılmıştır. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni (Karar No G0 18/1113-20) alınmış, çalışmaya dahil edilen tüm örnekler için HÜ Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi “Biyobanka Bilgilendirilmiş Onam Formu” imzalanmıştır. Kİ kaynaklı MKH’ler HÜ İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde nakil amacıyla sağlıklı vericilerden toplanan Kİ’den, FA hasta örnekleri HÜ İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi takibinde olan hastaların Kİ transplantlarından önce alınan Kİ aspirasyon materyalinden, subkutan yağ doku örnekleri ise HÜ Erişkin Hastanesi Plastik Cerrahi ve Rekonstrüktif bölümünde rekonstrüktif amaçlı toplanan lipoaspirat materyalinden elde edilmiş; tüm örnekler, PEDI-STEM (HÜ Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi) laboratuvarına steril bir şekilde getirilmiş ve bütün çalışmalar PEDI-STEM laboratuvarlarında yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında onam formları alınan sağlıklı Kİ nakli donörü olan kişilerin Kİ örneklerinden Kİ/KİY-MKH’leri ve tansiyon, obezite, diyabet gibi kronik rahatsızlıkları olmayan ve cerrahi rekonstrüksiyon amacıyla alınan subkutan yağ dokusu alınan sağlıklı kişilerin atık olan örneklerinden MKH izolasyonu yapılmıştır. Bireylere ait demografik bilgiler Tablo 3.1.’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Bireylere ait demografik ve klinik bilgiler

Birey Kodu	Yaş	Cinsiyet	Klinik Bilgiler
Donör 1	19	Erkek	Sağlıklı Kİ nakli donörü
Donör 2	18	Kadın	Sağlıklı Kİ nakli donörü
Donör 3	14	Erkek	Sağlıklı Kİ nakli donörü
FA 1	13	Erkek	DEB (+), Sitopeni, Konjenital Anomali (+)
FA 2	4	Kadın	DEB (+), Sitopeni (+), Multipl Konjenital Anomali, Büyüme geriliği, FANCG
FA 3	16	Erkek	DEB (+), Monozomi 7, Sitopeni (+), FANCA
SKY-1	21	Kadın	Sağlıklı donör, Non-Obez
SKY-2	27	Kadın	Sağlıklı, Non-Obez
SKY-3	14	Erkek	Sağlıklı, Non- Obez

3.2. Gereçler ve Yöntemler

Hücre kültürü için çeşitli kimyasal ve solüsyonlar kullanılmıştır. İnsan lipoaspirat materyallerinden MKH izolasyonu sırasında enzimatik parçalama için 1:1 oranında kollajenaz Tip-I ve dispaz çözeltisi kullanılmıştır (Sigma, ABD). İzolasyon sonrası MNH sayımı için Turks boyası (Sigma Aldrich, ABD), pasajlama sırasındaki hücre sayımları için tripan mavisi (Applichem, Almanya) kullanılarak hemositometre ile (Neubauer, Almanya) sayım yapılmıştır. Hücre kültürü sırasında hücreler steril kültür kaplarına ekilmiş (Eppendorf, Almanya) ve büyüme besiyeri (DMF-10) (*Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low glucose*, DMEM-LG) (Lonza, İsviçre) ile 37°C %5 CO₂'li nemli inkübatörde (HeraCell 150) (Thermo Fisher, ABD) çoğaltılmıştır. Besiyerine ek olarak %40 MCDB 201 mediumu (*with trace elements*) (Sigma Aldrich, ABD) %1 L-glutamin (Gibco, ABD), %10 fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, ABD), %1 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (10.000 U/ml Penisilin ve 10.000 µg/ml Streptomisin) (Gibco, ABD) eklenmiştir. HL-60 hücreleri için (ATCC, ABD) %10 FBS ve %1 L-glutamin içeren DMEM-LG çoğaltma besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan tüm solüsyonlar ve malzemeler saklama koşullarına göre uygun sıcaklıktaki buzdolaplarında muhafaza edilmiştir (+4°C, Bosch, Almanya /Sanyo, Japonya) Tüm hücreler mikoplazma açısından mikoplazma kiti (*MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit*) (Lonza, İsviçre) ile spektrofotometrik olarak (Lucetta Luminometer) (Lonza, İsviçre) değerlendirilmiştir. Çoğalan hücreleri yapıştıkları yüzeyden kaldırmak amacıyla %0,05'lik tripsin-EDTA çözeltisi (Gibco, ABD), akım sitometrik boyamalar için akütaz (Stemcell Technologies, Kanada) kullanılmıştır. Tripsin işlemi sırasında yıkama için fosfatlı tuz tamponu çözeltisi (PBS) (Sigma-Aldrich, ABD) manuel olarak ddH₂O (Barnstead NanoPure Diamond) (Thermo Fisher, ABD) ile hazırlanmıştır. Ko-kültürlerde kullanılan palmitik asitli (Sigma, ABD) besiyeri, DMEM içine %1'lik yağ asidi içermeyen sığır serum albumini (BSA) (Sigma, ABD), %1 L-glutamin ve %1 Pen-Strep ile hazırlanmıştır. Büyüme dinamiklerinin saptanması ve doz denemesi için WST-1 testi (Roche, Almanya) yapılmıştır. Manuel olarak hazırlanan besiyerleri 0,22 µm'lik filtrelerden (Merck Millipore, ABD) geçirilerek sterilize edilmiştir.

Manuel olarak hazırlanan büyüme besiyeri, dondurma besiyeri ve PBS 0,22 μM 'lik filtreden (Millipore, ABD) geçirilerek sterilize edilmiştir. Çoğalan hücreleri daha sonra kullanılmak üzere dondurabilmek için dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmış, önce -80°C soğutucuda (RS Biotech, US) daha sonra -196°C azot tankında (Chart Industries, ABD) depolanmıştır.

Elde edilen hücrelere yönlendirilmiş farklılaştırma protokolü uygulanarak karakterizasyon testleri yapılmıştır. Adipojenik farklılaştırma için gereken besiyeri taze ve manuel olarak düşük glukoz içeren DMEM-LG'ye ek olarak %10 FBS (Gibco, ABD), %1 Pen-Strep, %1 L-glutamin, $1\mu\text{M}$ deksametazon (Sigma -Aldrich, ABD), 5 $\mu\text{g/ml}$ insülin (Sigma-Aldrich, ABD), 500 μM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX) (Sigma-Aldrich, ABD) ve 60 μM indometazin eklenerek hazırlanmıştır. Farklılaştırma protokolü sonrası *Oil-Red-O* boyası (Sigma-Aldrich, ABD) ile mikroskopik görüntüleme (Olympus, Japonya) yapılmıştır. Osteojenik farklılaştırma için 100 nM deksametazon, 0,2 mM L-askorbik asit (Sigma-Aldrich, ABD) ve 10 mM β -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, ABD) içeren DMEM kullanılmıştır. Protokol sonrası *Alizarin Red S* (Sigma, ABD) boyaması ile mikroskopik görüntüleme yapılmıştır. Farklılaştırmaların kantitatif analizi *Oil-Red-O* boyasının (Sigma, ABD) seri dilüsyonları ve *Quantichrom Calcium Assay* kiti (Bioassay Systems, ABD) kullanılmıştır. Ölçümler ELISA okuyucu (Sunrise) (TECAN, İsviçre) kullanılarak yapılmıştır. Tüm hücre kültürü çalışmaları biyogüvenlik düzeyi-II olan laminar akışlı kabinde (HeraSafe KS12) (Thermo Fisher, ABD) yapılmıştır.

Hücrelerin yüzey belirteçlerini belirlemek amacıyla BD Accuri C6 akım sitometri cihazı (BD Biosciences, ABD) kullanılmıştır. Bu işaretlemelerin analizi ise *BD CSampler Analysis* (BD Biosciences, ABD) programında yapılmıştır. Kullanılan yüzey işaretçilerine ait bilgiler Tablo 3.2'de verilmektedir.

Tablo 3.2. Hücre yüzey belirteçlerinin belirlenmesinde kullanılan antikor paneli

Antikor	Katalog No	Marka
CD73	550257	BD Pharmingen
CD105	562408	BD Pharmingen
CD90	555595	BD Pharmingen
CD47	323106	BioLegend
CD45	345808	BD
CD29	303008	BioLegend
CD34	343504	BioLegend
CD11b	A87782	Beckman Coulter
HLA-DR	11-9952-42	E-Bioscience
CD44	560533	BD Pharmingen
Galektin-3	125405	BioLegend
FABP-4	30143-05171	Assay Pro
Leptin-R	FAB867A	R&D
PDGFR- α	DAB1264P	R&D
CD38	345806	BD
CD36	555454	BD

Moleküler analizler qRT-PCR yöntemi ile yapılmıştır. QIAZOL (Qiagen, Almanya) liziz ajanı ile toplanan örneklerden *Bio-Rad iScript cDNA Synthesis Kiti* ile kalıp DNA'lar üretilmiş ve *Bio-Rad SYBR Green Master Mix* kiti ile PCR reaksiyonları kurulmuştur (Bio-Rad, ABD). Okumalar *Roche Light Cycler* ile cihazı ile yapılmış olup Tablo 3.3.'te analiz edilen genlere ait primer dizileri verilmiştir.

Tablo 3.3. Moleküler analizlerde değerlendirilen genlere ait primer dizileri

Gen	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')
β -aktin	AAA ATC TGG CAC CAC ACC TTC	AGC ACA GCC TGG ATA GCA
LPL	CCG CCG ACC AAA GAA GAG AT	GCT ACT CCG GGA ATG AGG TG
Adipo-Q	CTG ATT CCA TAC CAG AGG GGC TC	GAG TCG TGG TTT CCT GGT CAT
UCP-1	CTG GAA TAG CGG CGT GCT T	AAT AAC ACT GGA CGT CGG GC
DiO2	TAA CAA CTC GGA TGG GTG CT	GAC GCC TTG GGA GGT ATG AG
PPAR γ	ACA GAC AAA TCA ACC GCC CA	AGG GCT TGT AGC AGG TTG TC
PARP-1	GCT CCT GAA CAA TGC AGA CA	TCC TGA TGA TCT CGG CTT CT

3.2.1. İnsan Kemik İliği Örneklerinden Mezenkimal Kök Hücre Eldesi

Kemik İliği Örneğinden Kemik İliği Yağ Mezenkimal Kök Hücrelerinin İzolasyonu

Ameliyathane koşullarında iliak kemikten toplanan Kİ, prezervatifsiz heparin içeren enjektör içerisinde steril koşullarda laboratuvara getirildi. Literatürde yer alan

bir makale modifiye edilerek kullanılmıştır (73). Laminar akışlı kültür kabini içerisinde steril koşullarda falkon tüpler içerisine aktarılarak 2300 rpm'de 5 dakika santrifüj (Centrifüje 5810 R) (Eppendorf, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi plazmanın üstünde biriken KİY tabakası toplanarak T 25 doku kültürü kabına 5 ml DMF-10 içerisine sayım yapılmadan ekilerek pasaj sıfır olarak adlandırıldı. Altta kalan plazma kısmı ependorf içine alınarak -80°C 'de depolandı.



Şekil 3.1. Santrifüj sonrası ayrılan kemik iliği yağ tabakası, plazma ve eritrositler. Kırmızı halka plazma katmanının üzerinde toplanan kemik iliği yağ tabakasını göstermektedir.

Hücre içeren kısım ise mononükleer hücre ayırımı ve Kİ-MKH eldesi için kullanıldı. KİY tabakasından direkt ekim yapılan kültür kabı içindeki besiyeri iki-üç gün sonra atılarak kültür kabının içi yapışmayan hücrelerden arındırmak için PBS ile yıkandı. Taze besiyeri eklenip yeterli yoğunluğa ulaşıncaya kadar haftada iki kez besiyeri değiştirilerek 37°C 'de %5 CO_2 'li ortamda çoğaltıldı. Ortalama 10 gün sonra %90 yoğunluğa ulaşan KİY-MKH'lerine mikoplazma testi yapıldı. Mikoplazma testi

temiz çıkan örnekler tripsinizasyon işlemi için hazırlandı. Gerekli tüm solüsyonlar en az 30 dakika oda ısısında bekletilerek kullanıldı. Laminar akışlı kültür kabini içerisine alınan kültür kabı içerisindeki medium uzaklaştırıldı. Kültür kabının içi bir kez 5 ml PBS ile yıkandı. Kültür kabı içerisinde tabana yapışık halde bulunan hücreleri yapıştıkları yüzeyden ayırmak için 1 ml (T 25 için) %0,05 tripsin/EDTA solüsyonu eklendi. Kültür kabı yaklaşık 5 dk boyunca 37°C ve %5 CO₂'li nemli inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler mikroskop altında incelendi. Ayrışmanın gerçekleştiği gözlemlendiğinde tripsini inhibe etmek amacıyla kültür kabı içine 2 ml taze DMF-10 eklendi ve hücre süspansiyonu toplanarak falkon içerisine aktarıldı. Kültür kabı içi medium ile bir kez daha yıkanarak kalması muhtemel hücreler de toplanıp falkon içerisine aktarıldı. Tripan mavisini solüsyonu ile hücre sayımı yapılarak, deney planına göre yeni kültür kaplarına ekilerek pasaj bir'e geçilmiş oldu. Hücreler, karakterizasyon ve deneylerin yapılacağı pasaj üç-dörde kadar benzer şekilde pasajlanarak çoğaltıldı. Kalan hücreler için dondurma protokolü uygulandı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet çözülerek buz üzerinde, MKH sayısı 0,5-1x10⁶/500-1000 µl %10 DMSO içeren DMEM-LG dondurma mediumu ile karıştırılarak kriyoviyal tüplere aktarıldı. Tüpler yavaş-kademeli dondurma sağlayan saklama kabı *Mr. Frosty Freezing Container* (Thermo Fisher, ABD) içine yerleştirilerek -80°C'ye alındı. 1 gün saklama kabında muhafaza edildikten sonra viyaller -196°C azot tankına alındı.

İnsan Kemik İliği Örneğinden Mononükleer Hücre İzolasyonu ve MKH Geliştirilmesi

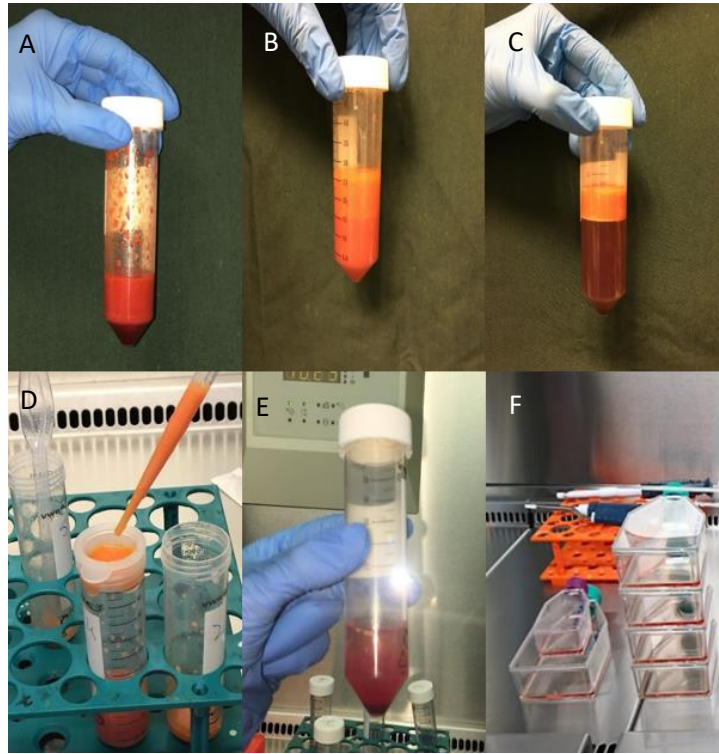
Ameliyathane koşullarında iliak kemikten toplanan Kİ, prezervatifsiz heparin içeren enjektör içerisinde steril koşullarda laboratuvara getirildi. Fikol ile dansiteye göre ayırıştırma yöntemi kullanılarak mononükleer hücre izolasyonu protokolü uygulandı. Gelen örnek steril koşullarda falkona alındı. 2300 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası ayrılan plazma toplanarak -80°C'ye alındı. Kİ'nin hücresel bileşenlerini içeren kısma ilk gelen kan örneği miktarı baz alınarak 1:1 oranında PBS eklenerek seyreltme yapıldı. Başka bir falkon tüp içerisine aynı hacimde oda sıcaklığında bulunan fikol (Biowest, US) eklendi. Ardından 2000 rpm'de 15 dk süresince, oda sıcaklığında frensiz santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında *buffy coat* tabakası pastör pipeti yardımı ile yeni bir tüp içerisine alındı. Tüp içerisine 5 ml PBS

eklenerek 1500 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak hücre pelleti resüspanse edildi, ardından Turk’s boyası ile boyanarak hemositometri (Neubauer, Almanya) ile sayım yapıldı. Hücre sayımı sonrası, yaklaşık 10×10^6 MNH T 75 kültür kabına (Eppendorf, Almanya) ekilerek MKH elde edilmesi planlandı. Artan hücreler dondurma protokolüne bağlı kalınarak bir kriyoviyalde yaklaşık 20×10^6 MNH olacak şekilde donduruldu. Yaklaşık 7-10 gün yeterli yoğunluğa ulaşana kadar haftada 2 kez besiyeri değişimi yapıldı. Yeterli yoğunluğa ulaşan pasaj sıfır hücrelere mikoplazma testleri yapıldı ve tripsin protokolüne uygun olarak pasaj bir MKH eldesi için tripsinize edildi. Deney planına göre yeni kültür kaplarına ekilerek kültüre edildi. Hücreler, karakterizasyon ve deneylerin yapılacağı pasaj üç-dörde kadar benzer şekilde pasajlanarak çoğaltıldı. Kalan hücreler için dondurma protokolü uygulandı. Hücreler 1500 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet çözülerek buz üzerinde, MKH sayısı $0,5-1 \times 10^6/500-1000 \mu\text{l}$ %10 DMSO içeren DMEM-LG dondurma mediumu ile karıştırılarak kriyoviyal tüplere aktarıldı. Tüpler yavaş-kademeli dondurma sağlayan saklama kabı *Mr. Frosty Freezing Container* (Thermo Fisher, ABD) içine yerleştirilerek -80°C ’ye alındı. 1 gün saklama kabında muhafaza edildikten sonra viyaller -196°C azot tankına alındı.

Subkutan Yağ Dokusundan MKH Eldesi

Çeşitli sebepler ile karın içinden yağ dokusu alınması gereken sağlıklı, obezite ve diyabeti olmayan genç donörlerden “*liposuction*” yöntemi ile alınan örnekler işlenmek üzere laboratuvara getirildi. Hücre izolasyonu literatürdeki bir yayından modifiye edilerek yapılmıştır (111). Falkon tüp içerisine aktarılan örnek üzerine 1:1 oranında PBS eklendi. 430 g’de 10 dakika frensiz santrifüj edildi. Yağ tabakası toplanarak yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine toplam hacmin yarısı kadar PBS ile hazırlanmış %0,1 kollajenaz-dispaz (1:1) enzim karışımı eklenerek 1 saat 37°C sıcak su banyosunda yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde enzimatik yıkımı durdurmak için 1:1 oranında DMF-10 eklendi ve $600 \times \text{g}$ ’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Pellet önce $70 \mu\text{m}$ ’lik daha sonra $40 \mu\text{m}$ ’lik hücre süzgecinden geçirildi. Pellet yoğunluğuna göre T 75 doku kültür kabına büyüme besiyeri ile ekim gerçekleştirildi. Yeterli yoğunluğa ulaşan pasaj sıfır hücrelere mikoplazma testleri yapıldı ve tripsin protokolüne uygun olarak pasaj bir MKH eldesi için tripsinize edildi. Deney planına göre yeni kültür kaplarına ekilerek kültüre edildi. Hücreler, karakterizasyon ve

deneylerin yapılacağı pasaj üç-dörde kadar benzer şekilde pasajlanarak çoğaltıldı. Kalan hücreler için dondurma protokolü uygulandı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet çözülerek buz üzerinde, MKH sayısı $0,5-1 \times 10^6/500-1000 \mu\text{l}$ %10 DMSO içeren DMEM-LG dondurma mediumu ile karıştırılarak kriyoviyal tüplere aktarıldı. Tüpler yavaş-kademeli dondurma sağlayan saklama kabı *Mr. Frosty Freezing Container* (Thermo Fisher, ABD) içine yerleştirilerek -80°C 'ye alındı. 1 gün saklama kabında muhafaza edildikten sonra viyaller -196°C azot tankına alındı.



Şekil 3.2. İnsan adipoz dokusundan enzimatik parçalama ile kök hücre izolasyonu. Ameliyathaneden liposuciton ile toplanan ve steril koşullarda laboratuvara getirilen yarı katı subkutan yağ dokusu materyalinin (A) enzimatik muamele ile parçalanması (B) ve yıkama ile işlemlerinden sonra (C-D) kalan pelletin görüntüsü (E) ve kültür kabına ekilmiş hali (F) gösterilmektedir.

3.2.2. İnsan Kİ, KİY ve SKY Kökenli MKH'lerin Özelliklerinin İncelenmesi

MKH'lerin Akım Sitometri İle İmmünojenotipik Karakterizasyonu

Dördüncü pasaja getirilen hücreler buldukları kültür kabından kaldırılarak 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından hücreler

resüspanse edilerek PBS ile 1500 rpm'de 5 dk yıkandı. Daha sonra hücreler resüspanse edilip 100 µl boyama tamponu (*BD Staining Buffer*) (BD Biosciences, ABD) eklenerek, önceden antikorların dağıtıldığı olduğu tüplere, tüp başına 1×10^5 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Tüpler oda sıcaklığında ve karanlıkta 15-20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüplere 1 ml PBS eklenerek 1500 rpm'de 5 dk santrifüj eklenerek bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması sağlandı. Hücreler resüspanse edilerek üzerlerine 300 µl PBS eklendi. İşaretlenmiş hücrelerin yüzey belirteçlerinin belirlenmesi için BD Accuri C6 akım sitometri cihazında (BD BioScience, ABD) toplam 10.000 olgu okutuldu. Analiz için BD CSampler Analysis yazılımı (BD BioScience, ABD) kullanıldı.

Adipojenik Farklılaştırma İle MKH Karakterizasyonu

Farklılaştırma testleri için pasaj üçe getirilen hücreler tripsinizasyon protokolüne uygun olarak kaldırıldı. RNA izolasyonu için 6 kuyucuklu plakaya, boyamalar için 12 kuyucuklu plakalara ekildi. Haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek kuyulardaki hücre yoğunluğunun %95-100'e ulaşması sağlandı. Daha sonra bütün kuyucuklar 1 ml PBS ile yıkandı ve adipojenik farklılaşması istenen hücreleri içeren kuyucuklara 2 ml adipojenik farklılaşma besiyeri eklendi. Farklılaştırma besiyerinin eklendiği gün sıfırcı gün olarak kaydedildi. Kontrol kuyucuklarına DMF-10 eklendi. Karakterizasyon için ayrılan plakaların onuncu ve yirmibirinci günlerinde kültür sonlandırılarak kuyular RNA izolasyonu yapılmak üzere lizis ajanı içine alınarak -80°C'de izolasyon gününe kadar saklandı. Boyamalar için ayrılan plakalar farklılaşmanın yirmibirinci gününde sonlandırıldı. Bütün kuyucuklar bir kez PBS ile yıkandıktan sonra hücreler %10 formalin solüsyonu (Sigma, ABD) ile 20-25 dk oda sıcaklığında fikse edildi. İnkübasyon sonrası formalin uzaklaştırıldıktan sonra bütün kuyucuklar 2 kez PBS ile yıkanarak 1 ml *Oil Red O* (ORO) boyası eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bütün kuyucuklar 2 defa distile su ile yıkandı. Daha sonra hücrelerdeki lipid birikimini göstermek amacı ile dijital görüntüleme sistemi ile kuyucukların fotoğrafları çekildi. Adipojenik farklılaşmanın semi-kantitatif değerlendirilmesi amacıyla kuyucuklara deterjan özelliğinde olan %4 Igepal/izopropanol eklenerek 1 saat inkübasyona bırakıldı bu süreçte boyanın hücrelerden ekstraksiyonu sağlandı. Kuyucuklar içerisinden toplanan Igepal/izopropanol ve boya karışımı, 96 kuyucuklu plakalara 100 µl olacak şekilde

bölüştürüldü. Kontrol olarak ise ORO boyası kullanarak standartlar hazırlandı. Kuyucuklar içerisindeki karışım ELISA okuyucusunda 492 nm dalga boyunda okutuldu.

Osteojenik Farklılaştırma İle MKH Karakterizasyonu

Farklılaştırma testleri için pasaj üçe getirilen hücreler tripsinizasyon protokolüne uygun olarak kaldırıldı ve boyamalar için 12 kuyucuklu plakalara ekildi. Haftada 2 kez besiyeri tazelenerek kuyulardaki hücre yoğunluğunun %60'a ulaşması sağlandı. Daha sonra bütün kuyucuklar 1 ml PBS ile yıkandı ve osteojenik farklılaşma besiyeri eklendi. Osteojenik farklılaşma besiyerinin eklendiği gün sıfırıncı gün olarak kaydedildi. Kontrol kuyucuklarına DMF-10 eklendi. Kültür yirmibir gün sonra sonlandırıldı. Bütün kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra *Alizarin Red S* (ARS) boyaması için seçilen kuyular %10 formalin solüsyonu ile fikse edildi. Formalin uzaklaştırıldıktan sonra kuyulara 1 ml ARS boyası eklenerek 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyular 2 defa distile su ile yıkandı. Daha sonra hücrelerdeki kalsiyum fosfat mineral depozitlerini göstermek amacıyla dijital görüntüleme sistemi ile kuyucukların fotoğrafları çekildi. Hücrelerdeki Ca^{+2} miktarının değerlendirilmesi için boyama yapılmayan kuyulara 1 ml 0,6 M HCL eklenerek 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kuyucukların içeriği 96 kuyucuklu plakaya 100 µl olacak şekilde bölüştürüldü. *Quantichrom Calcium Assay Kiti* prosedürüne göre işlem yapıldı. Kuyucuklar ELISA okuyucusunda 620 nm dalga boyunda okutuldu.

WST-1 Testi İle MKH'lerin Çoğalma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

WST-1 bir çeşit tetrazolyum tuzudur. Prolifere olan hücrelerin tetrazolyum tuzunu kullanarak formazan ürünleri oluşturması sonucunda ortamda bir renk değişimi meydana gelir. Bu değişim *mikroplate* okuyucusunda okutularak ölçüm sonucu değerlendirilir. Hücre canlılığı kaybolduğunda mitokondriyal fonksiyon ve sonuç olarak tetrazolyum tuzunu formazana çevirebilme yeteneği azalır. Böylece bu kimyasal sayesinde hücre canlılığı tespit edilmiş olur. Bu deney büyüme dinamiklerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Pasaj üçe getirilen MKH'ler tripsinize edildi ve 96 kuyucuklu plakalara kuyu başı 10.000 MKH olacak şekilde ekildi. 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde bir gün kültüre edildi. Analizin yapılacağı günler

her bir kuyucukta bulunan besiyeri için %10'u kadar WST-1 solüsyonu eklendi. Plakalar WST-1 kimyasalı eklendikten sonra 4 saat süresince 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde *mikroplate* okuyucuyla 450 nm'de ölçüm yapıldı. Metabolik aktivitenin belirlenmesinde aşağıdaki formülasyon kullanıldı:

$$\% \text{ Metabolik aktivite} = ([A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}] / A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

A_{kontrol} : Kontrol örneğinin absorbansı

$A_{\text{örnek}}$: Test edilen örneğin absorbans

RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qRT-PCR İle Adipojenik Gen İfadelerinin Değerlendirilmesi

Daha önce lizis ajanı içine alınıp saklanan mRNA örneklerine manuel mRNA izolasyonu protokolü uygulandı. Buz içerisinde çözülmesi sağlanan örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklenerek vortekslendi (DragonLab, Çin). Örnekler +4°C'de 12000 xg'de 15 dk santrifüjlendi. RNA içeren faz yeni tüpe aktarıldı ve üzerine -20°C'de soğutulmuş 750 µl %100 saflıkta moleküler derece etanol (Sigma, ABD) eklenerek 45 dakika -20°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler +4°C'de 12000 xg de 15 dakika santrifüjlendi. Pellet üzerine -20°C'de soğutulmuş 750 µl %75'lik etanol eklenerek +4°C'de 7500 xg'de santrifüjlendi. Pellet üzerine 30 µl nükleaz içermeyen su eklenerek resüspanse edildi. mRNA miktarları, A260/A280 ve A260/A230 oranları spektrofotometre cihazıyla (Nanodrop) (Thermo Scientific, Almanya) ölçülerek örnekler -80°C'de saklandı. mRNA örnekleri Bio-Rad iScript cDNA sentez kiti kullanılarak kalıp elde etmek için cDNA'ya çevrildi. Elde edilen cDNA'lar ile Tablo 3.3.'te belirtilen genlere ait ifadeler *Bio-Rad iTaq Universal SYBR Green Supermix* kiti kullanılarak qRT-PCR reaksiyonu ile değerlendirildi. Bu genlere ait ifadeler Kİ-MKH, KİY-MKH ve SKY-MKH'lerinde bazal durumda ve adipojenik farklılaşma uyarılmasını takiben 10. ve 21. günlerde incelenmiştir.

3.2.3. MKH ve HL-60 Hücreleri İle Yapılan Ko-kültür Çalışmaları

HL-60 Hücrelerin Kültürü ve Çoğaltılması

Azot tankında yer alan hücreler buz içerisinde alınarak laminar kabine getirildi. Sıcak suyla hızlıca çözülerek DMEM-LG içine %1 L-glutamin, %10 FBS eklenmiş besiyerine alındı. 1500 rpm'de 5 dk yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet resüspanse edildi. Tripan mavisi ile sayılan hücreler, $2-3 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde T 75'e ekilerek dikey bir şekilde 37° C, %5 CO₂'li inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. Haftada 2 kez besiyeri değişimi yapıldı.

MKH ve HL-60 Hücrelerine Uygulanan Ko-kültür Koşulları

Literatürdeki yayınlarda kanser hücreleri ile tümör dokusunun etrafında yer alan stromal hücrelerin daha uzak bölgelerdeki hücrelerden farklı karakterde olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Bu sebeple ko-kültürlerde *trans-well* sistemi yerine direk kültür metodu seçilmiştir (112, 113). Pasaj üçe getirilmiş olan Kİ-MKH ve KİY-MKH'leri 6 kuyucuklu plakalara ekildi. %90 yoğunluğa ulaşıncaya kadar haftada iki kez besiyeri değiştirilerek çoğaltıldı. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak kuyular 1 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler kontrol kuyuları hariç 24 saat %1 yağ asidi içermeyen sığır serum albümini (BSA), %1 L-glutamin ve Pen-Strep içeren DMEM-LG ile hazırlanmış 200 µM palmitik asit (PA) solüsyonu ile inkübe edildi. 24 saat inkübasyon sonrasında PA'lı besiyeri uzaklaştırılıp kuyular 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra her kuyuya MKH ve HL-60 oranı 1:5 olacak şekilde yine %1 yağ asidi içermeyen BSA, %1 L-glutamin içeren DMEM-LG ile HL-60 hücreleri ekildi. 24 saatlik inkübasyon bitiminde HL-60 hücreleri toplanarak falkon içine alındı. Kuyular 2 kez PBS ile yıkanarak kalan HL-60 hücreleri de toplandı. MKH'ler akütaz ile normal tripsinizasyon protokolüne göre kaldırılarak toplandı. Moleküler analizler qRT-PCR analizi için ekilen MKH'ler ve HL-60'lar 1 ml QIAZOL liziz ajanı içine alındı.

4. BULGULAR

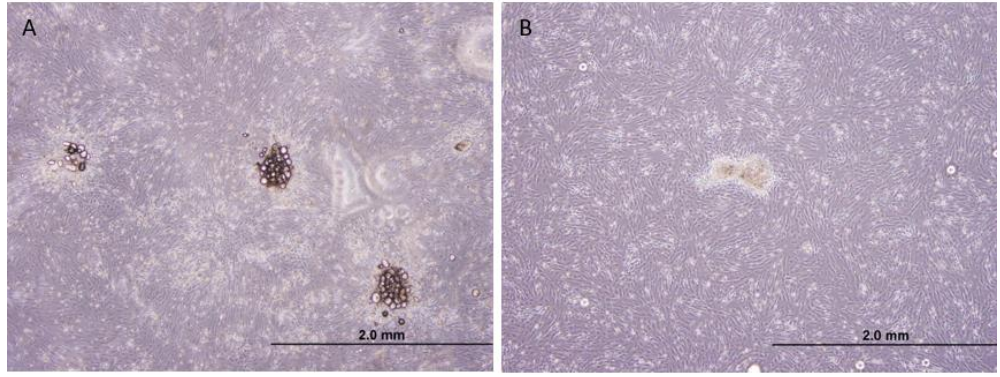
Bu tez çalışması kapsamında sağlıklı Kİ ve KİY, FA hastalarının Kİ ve KİY kökenli MKH'leri ile SKY-MKH'leri olmak üzere 5 ayrı grupta yapılan analiz sonuçları aşağıda verilmektedir.

4.1. Hücrelerin İzolasyonu ve İn Vitro Çoğaltılması

4.1.1. Kemik İliği Aspirasyon Materyallerinden KİY-MKH ve Kİ-MKH Eldesi ve Çoğalma Kapasitelerinin İncelenmesi

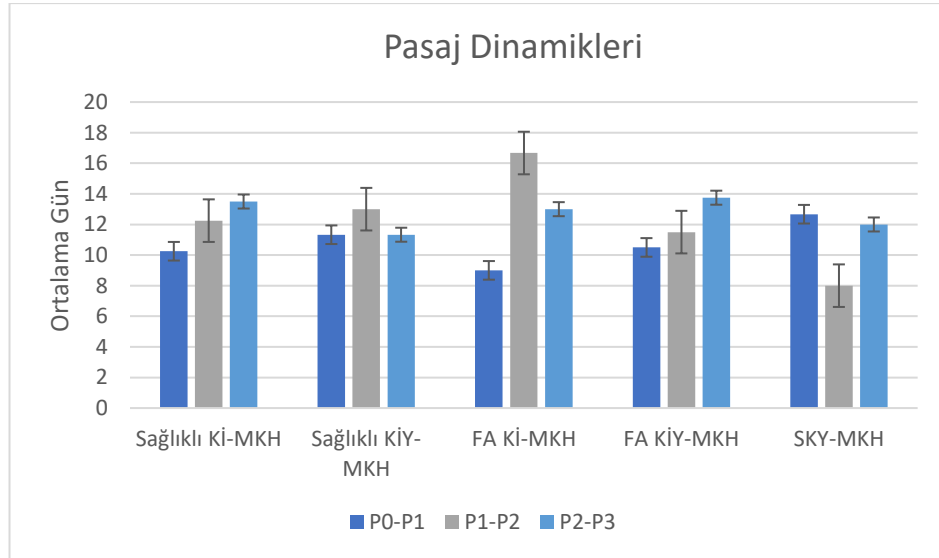
Kİ aspirasyon örneklerinin büyük bir kısmında, santrifüj sonrası gözle görülür bir yağ tabakası dikkati çekmekte, bu yağ tabakasının miktarı kişiden kişiye değişmektedir. Çalışmamızda, KİY-MKH'lerinin elde edilmesi için bu yağ tabakasının direkt kültürü yapılmış, birkaç pasaj çoğaltıldıktan sonra deneylerde kullanılmıştır. Kİ aspirasyon materyali, hematopoetik hücrelerden zengindir ve çok düşük oranda da stromal hücre içermektedir. Bu yöntemle elde edilen primer hücrelerin, kırmızı ilikte hematopoetik hücrelerin arasına karışmış olan düzenleyici yağ dokusunu (*rMAT*) temsil edeceği düşünülmüştür. Deneylerde, hücrelerin pasajlamalarla iyi geliştirildiği ve aynı örnekten hem KİY-MKH hem de Kİ-MKH'lerinin elde edildiği örnekler kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde sağlıklı donörler ve hastalar arasında yapılan karşılaştırmalar dışında her hasta ve donörün KİY-MKH örneği, kendi içerisinde, standart yöntemle Kİ'den izole edilen klasik Kİ-MKH'lerle karşılaştırılmıştır.

Kültür kabına ekim sonrası tabana yapışan hücreler pasaj sıfır sonunda %80 yoğunluğa ulaşınca kadar çoğaltılmıştır. Pasaj bir ve sonrası ekimlerde ise tüm örneklerde cm^2 'ye 2000-3000 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve yine %80 yoğunluğa ulaştıklarında tripsinizasyon işlemi ile pasajlanmıştır. Hücrelerin karakterizasyon testleri ve deneyler pasaj dördte yapılmıştır. Kültür sırasında KİY ve SKY örneklerinden izole edilen ise pasaj sıfır örneklerde MKH tabakası üzerinde hematopoetik kolonileri ve yağ veziküllerini andıran hücre kümeleşmeleri görülmüştür. Bu durum Kİ-MKH kültürlerinde gözlenmemiş ve pasaj atlatma işleminden sonra bu yapılar kaybolmuştur. Şekil 4.1.'de pasaj sıfır KİY ve SKY'den izole edilen hücrelere ait inverted mikroskop görüntüleri gösterilmektedir.



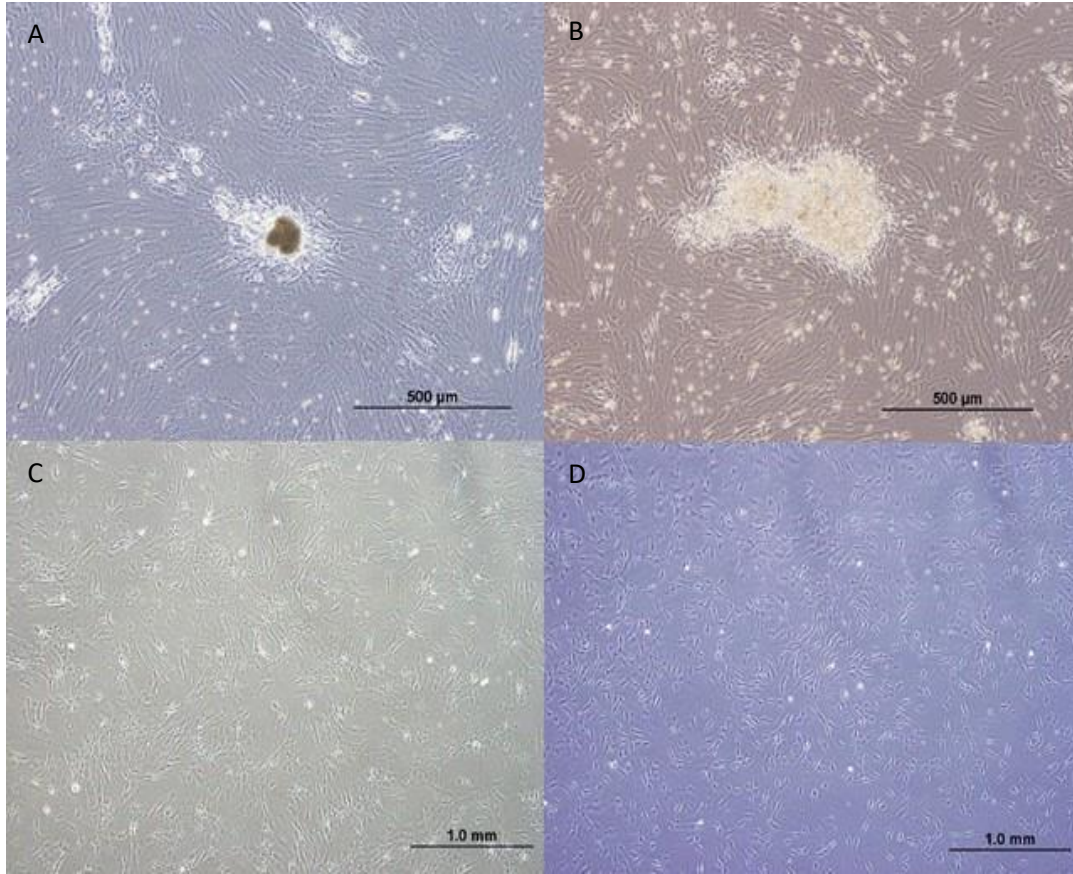
Şekil 4. 1. Sağlıklı bireylere ait KİY-MKH'lerine (A) ve SKY-MKH'lerine (B) ait pasaj sıfır inverted mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. x4 büyütme.

Sağlıklı ve FA hastalarının Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinin kültürde pasajlanana kadar geçen sürelerini gösteren grafik Şekil 4.3.'te verilmiştir. Bireyler arası farklılıklar nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.



Şekil 4.2. Sağlıklı bireylere ve FA hastalarına ait Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinin izolasyon sonrası kültürde çoğaltılmaları sırasında geçen ortalama süre gösterilmiştir (n=3).

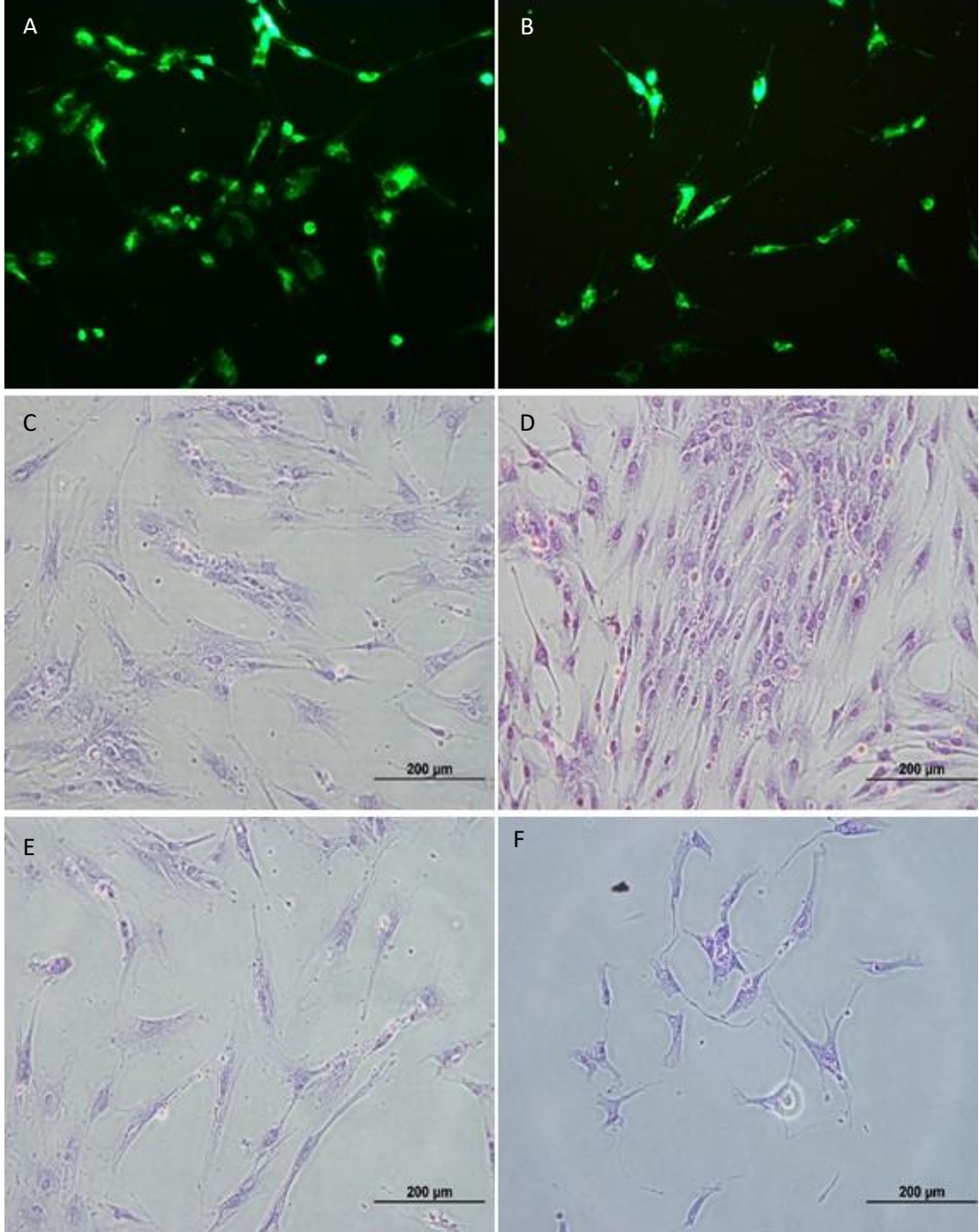
SKY-MKH'leri, obez olmayan ve sağlıklı bireylerden cerrahi rekonstrüktif sebeplerle karın içinden alınan subkutan yağ dokuya ait *lipoaspirat* materyallerinin enzimatik muamelesi sonucu kültüre ekilmesi ve pasajlanması ile elde edilmiştir. Şekil 4.3.'te SKY-MKH'lerinin mikroskopik görüntüleri verilmektedir. KİY-MKH'lerinde olduğu gibi pasaj sıfırda hücre kolonileri oluşmuş ve veziküler oluşumlar/yağ hücrelerini andıran yapıların olduğu gözlenmiş ve pasaj atlama işlemi sonucu kaybolmuşlardır.



Şekil 4. 3. Sağlıklı bireylerden alınan subkutan yağ doku kökenli MKH'lerin, pasaj sıfır (A, B), pasaj iki (C) ve pasaj üçteki (D) morfolojilerinin invert mikroskopundaki görüntüleri gösterilmektedir. x4, x10 büyütme.

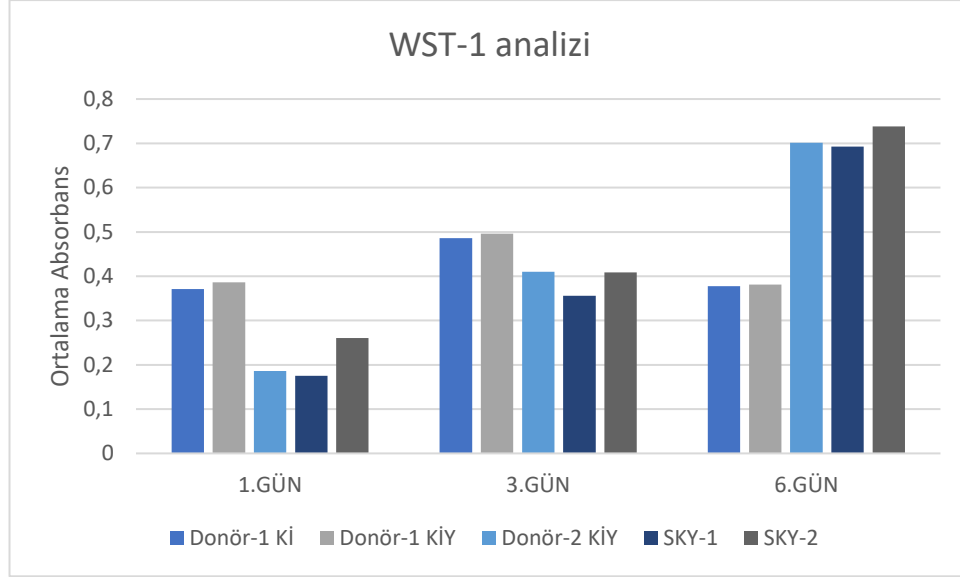
Hücre morfolojilerinin daha iyi değerlendirilmesi, KİY-MKH'lerinin beyaz/kahverengi yağ dokusuna ait özelliklerinin SKY-MKH'leri ile karşılaştırmak ve hücrelerde belirli bir bölgede mitokondriyal yoğunluk olup olmadığını gözlemlemek amacıyla *mitotracker green* boyaması, ayrıca *Wright* boyaması yapılmıştır.

Şekil 4.4.'te SKY ve KİY-MKH'lerine ait *mitotracker green* boyaması ve Kİ-MKH, KİY-MKH ve SKY-MKH'lerine ait *Wright* boyamaları gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Sağlıklı KİY-MKH'leri ile SKY-MKH'lerine ait *mitotracker* ve *Wright* boyaması görüntüleri. Floresan mikroskop ile çekilmiş KİY-MKH (A) ve SKY-MKH'lerine (B) ait *mitotracker* boyaması ve sağlıklı Kİ-MKH (C, D), KİY-MKH (E) ve SKY-MKH'lerine (F) ait inverted mikroskopta çekilmiş *Wright* boyaması görüntüleri gösterilmektedir. (x20 büyütme).

Şekil 4.5.'te çoğalma kapasitelerini değerlendirmek için yapılan WST-1 analiz sonuçları verilmiştir. Bu test sırasında daha önce hücreleri dondurulan donör 2'nin Kİ-MKH'si çoğaltılamadığından değerlendirilememiştir. Grafikte her birey ayrı ayrı gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH'leri ile SKY-MKH'lerinin çoğalma kapasitelerinin incelenmesi. y eksenini dublike olarak çalışılan örneklerin absorbans değerlerine ait ortalamaları alınarak oluşturulmuştur.

4.2. MKH'lerin Fenotipik Özelliklerinin İncelenmesi

FA hastalarından ve sağlıklı donörlerden elde edilen Kİ-MKH, KİY-MKH ve SKY-MKH'lerinin hepsinde akım sitometri ile stromal belirteçlerden CD29, CD44, CD105, CD 73 ifadelerinin yüksek oranda pozitif olduğu, hematopoetik belirteçlerden CD34, CD45 ve CD 11b ifadelerinin ise çok düşük olduğu gözlenmiştir (FA-3 hastasında yüksek görülen CD11b ifadesinin bireyin özel durumuna bağlı olabileceği düşünülmüş ve tekrarı planlanmıştır). Akım sitometri ile yüzey belirteç ifadeleri değerlendirildiğinde sağlıklı kontrol Kİ-MKH ve KİY-MKH'leri, FA hastalarının Kİ-MKH ve KİY-MKH'leri ile SKY-MKH'leri stromal belirteçler yönünden yüksek pozitif, hematopoetik belirteçler yönünden negatif olup MKH karakter özelliklerini taşıdıkları görülmüştür. Tüm örneklerle ait sonuçlar Tablo 4.1.'de hematopoetik ve stromal belirteçlerin akım sitometrik ölçüm değerlerine ait yüzdeler verilmektedir. Donör 2'ye ait dondurulmuş olan Kİ-MKH'leri çoğaltılamadığından bireye ait veriler gösterilememiştir.

Tablo 4.1. Genel mezenkimal kök hücre belirteçlerinin incelenmesine ait yüzde veriler

	CD11B	CD 34	CD 73	CD146	CD47	CD 29	CD105	CD 44
Donör-1 Kİ	0,9	1,3	100	-	94,6	100	96,9	99,7
Donör-1 KİY	0,4	2,0	99,7	-	99,8	100	99,7	98,6
Donör-2 KİY	0,3	0,7	99,9	94,0	29,5	100	99,9	99,4
FA 1 Kİ	2,0	0,2	95,9	94,0	95,0	100	97,5	99,7
FA 2 Kİ	30,4	2,4	100	98,0	100	100	99,8	99,4
FA 1 KİY	21,0	0,2	95,4	-	98,4	100	97,4	99,7
FA 2 KİY	64,5	0,9	99,5	94,0	99,2	100	100	99,5
SKY-1	3,3	0,5	99	75,9	50,7	100	98,6	98,2
SKY-2	1,7	0,4	99,9	69,2	59,4	100	98,2	99,4

Tablo 4.2.'de ise standart MKH belirteçleri dışında lösemi-Kİ mikroçevre ilişkisinde rolü olduğu düşünülen moleküllerin akım sitometri ile ifade düzeyleri gösterilmektedir.

Tablo 4.2. Lösemi-Kİ mikroçevresi ile ilişkilendirilen moleküllerin akım sitometrik ölçüm yüzdelerine ait grafik

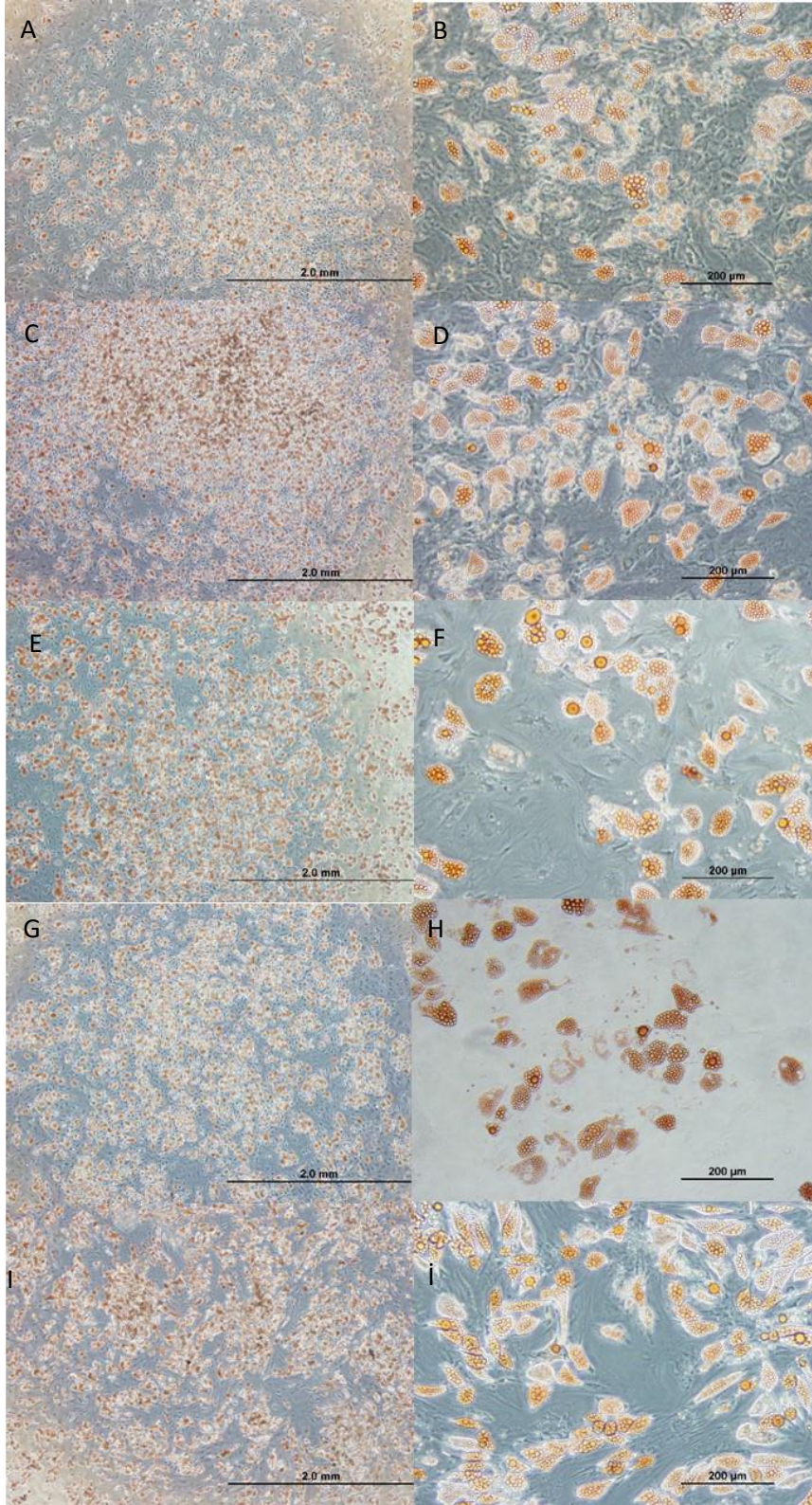
	LEP-R	FABP-4	GAL-3	PDGFR-A
Donör-1 Kİ	9,0	2,2	56,1	12,7
Donör-1 KİY	27,2	0,8	62,4	6,5
Donör-2 KİY	7,4	0,4	52,3	0,5
FA1 Kİ	14,7	0,7	3,4	15,9
FA2 Kİ	35,3	0,6	59,9	2,2
FA1 KİY	12,6	0,6	29,5	9,5
FA2 KİY	30,9	0,6	71,6	26
SKY1	11,1	0,6	56,3	1,6
SKY2	13,9	0,1	60,3	0,5

Bu incelemelerde, Gal-3 ifadesinin %50-60 seviyelerinde olup her iki FA hastasında da çok farklı olduğu (bir hastada Kİ-MKH! de <%5, diğer bir hastada ise Kİ-MKH'de>%70); FABP-4 ifadesinin tüm gruplarda <%2 olduğu, LepR ifadelerinin

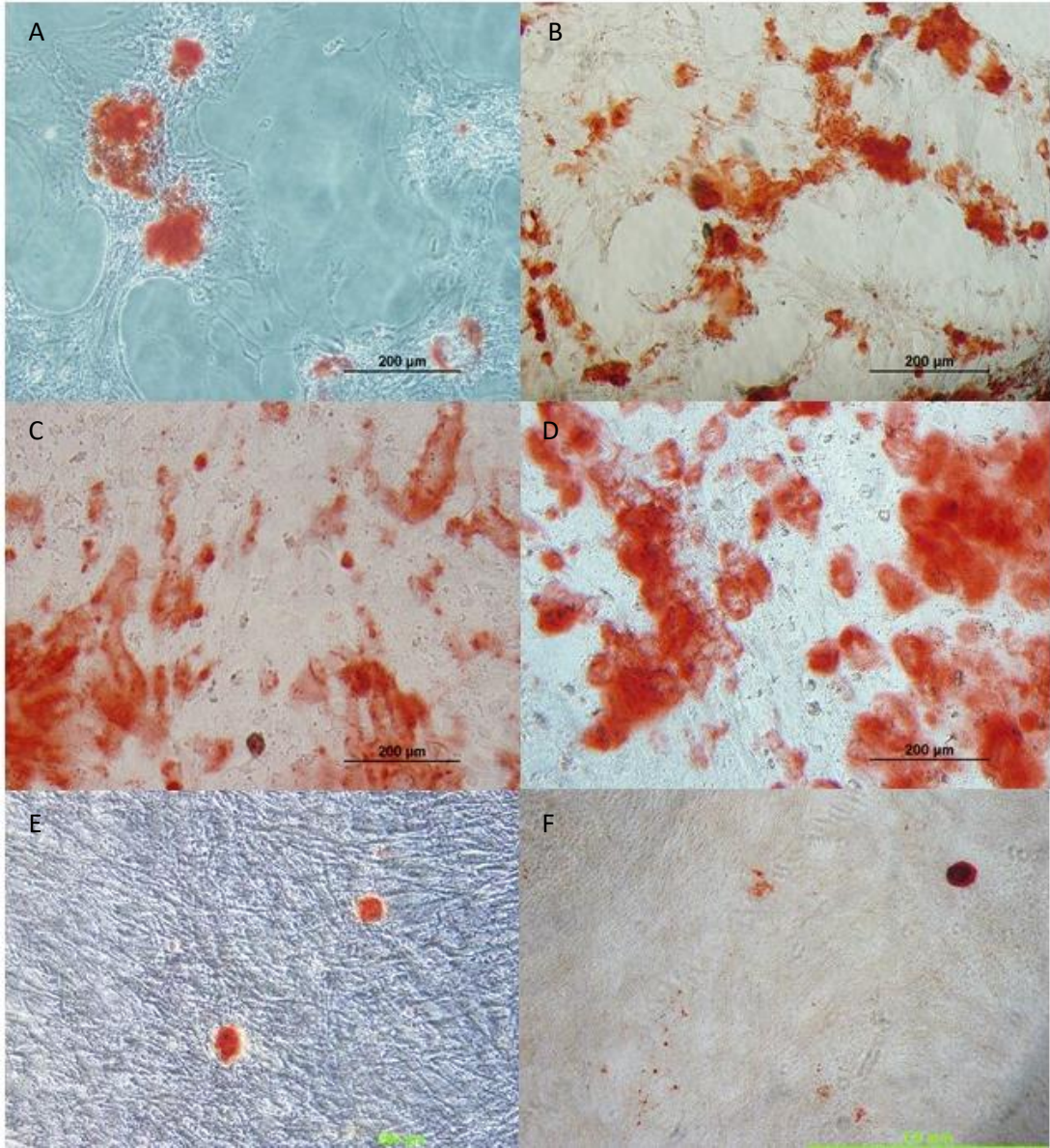
de %9 ile %15 arasında değiştiği, bir FA hastasının Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinde >%30 olduğu; PDGFR- α düzeylerinin ise Kİ-MKH'lerde %6-15 iken SKY-MKH'lerde <%2 olduğu görölmüştür. Tüm değerlendirmelere ait temsili örneklerin akım sitometri ile histogram görüntüleri EK-4'te verilmiştir.

4.3. MKH'lerin İn Vitro Farklılaşma Potansiyeli

Tüm farklılaştırma deneyleri pasaj dörtte yapılmış olup kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Tüm gruplarda MKH'lerin her 2 yönde farklılaşma potansiyelinin bulunduğu görölmüş, ancak, bireyler arasında boyanma yoğunluklarının farklı olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.6.'da her gruptan seçilmiş örneklere ait kalitatif boyama görüntüleri verilmiştir.

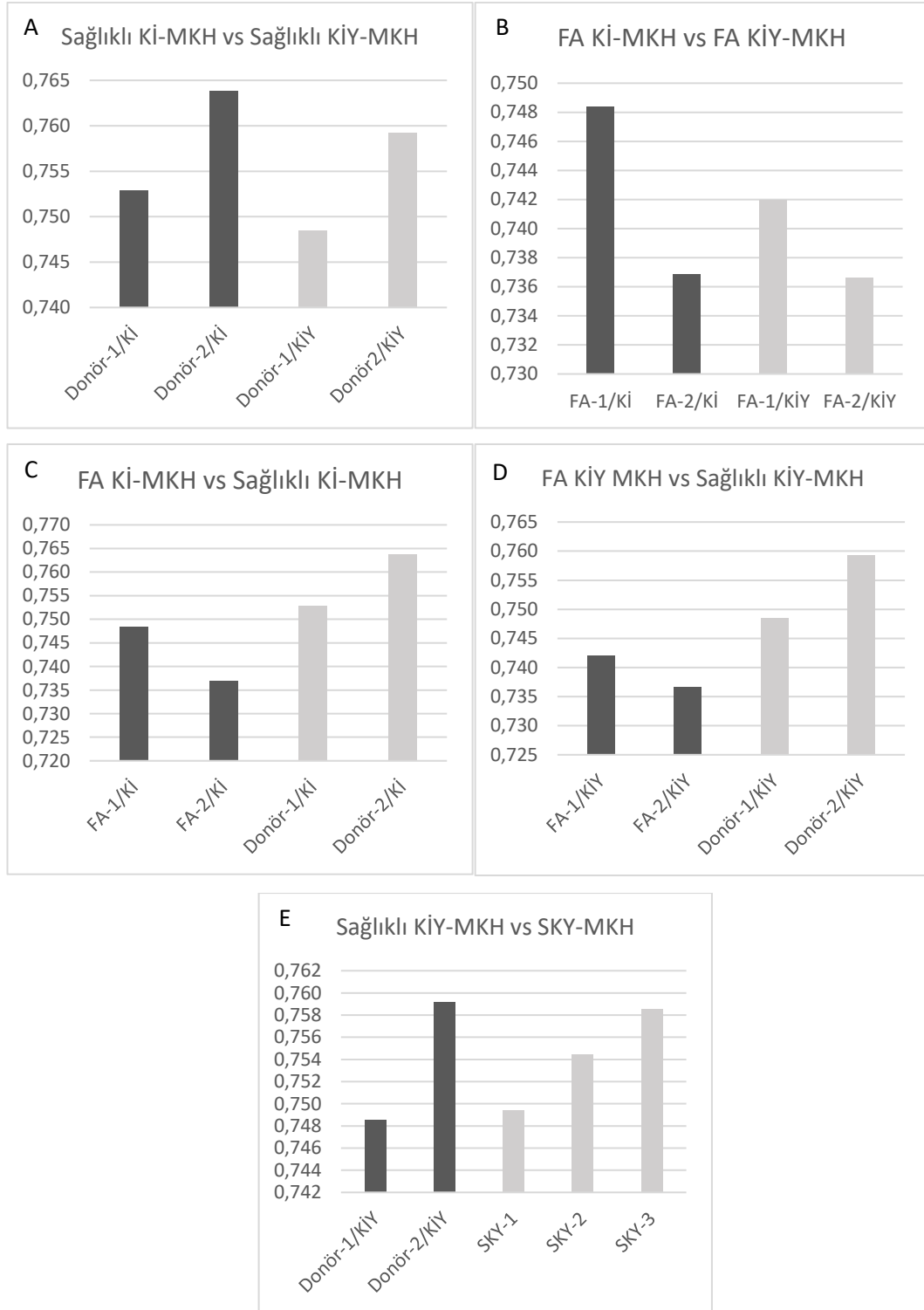


Şekil 4.6. FA hastası Kİ-MKH (A, B) ile FA KİY-MKH (C, D), sağlıklı Kİ-MKH (E, F) ile sağlıklı KİY-MKH (G, H) ve SKY-MKH'lerine (I, İ) ait *Oil Red O* boyaması. Görüntüler adipojenik farklılaştırma protokolü uygulanmış MKH'lerin *Oil-Red-O* boyaması yapıldıktan sonra çekilen invert mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. x4 ve x20 büyütme.



Şekil 4.7. FA hastası KI-MKH (A) ve KIY-MKH (B), sağlıklı KI-MKH (C) ve KIY-MKH (D) ile SKY-MKH'lerinin (E-F) osteojenik *Alizarin Red S* boyamasına ait invert mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. x20 büyütme.

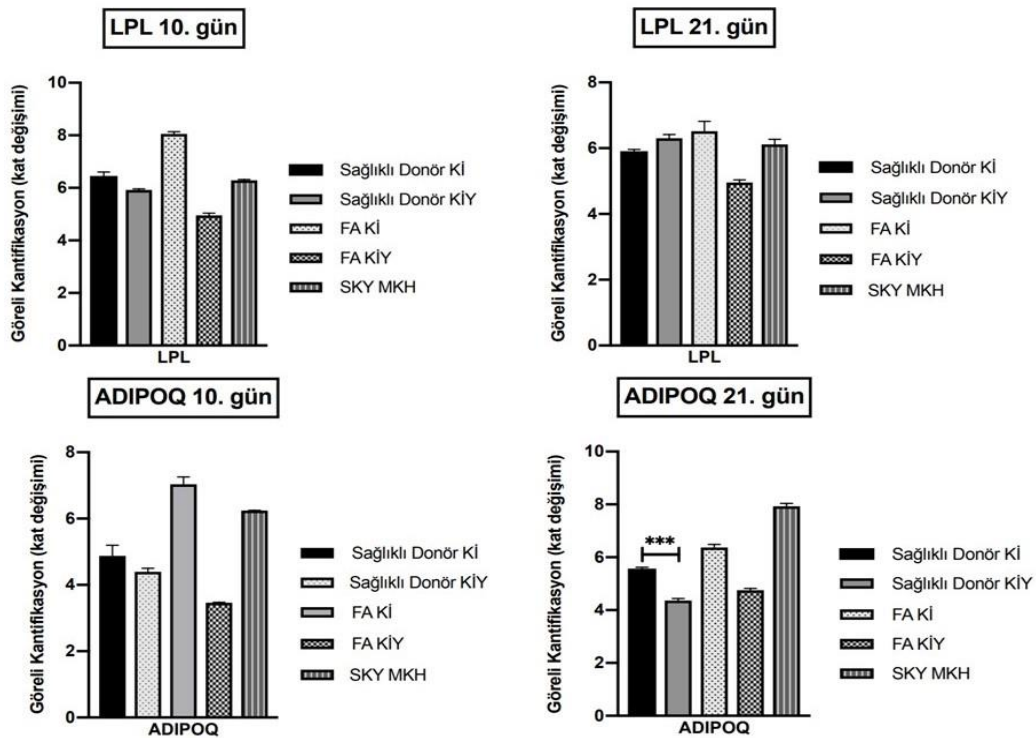
Şekil 4.8.'de adipojenik farklılaştırmalara ait kantitatif analizlerine ait grafikler gösterilmektedir.

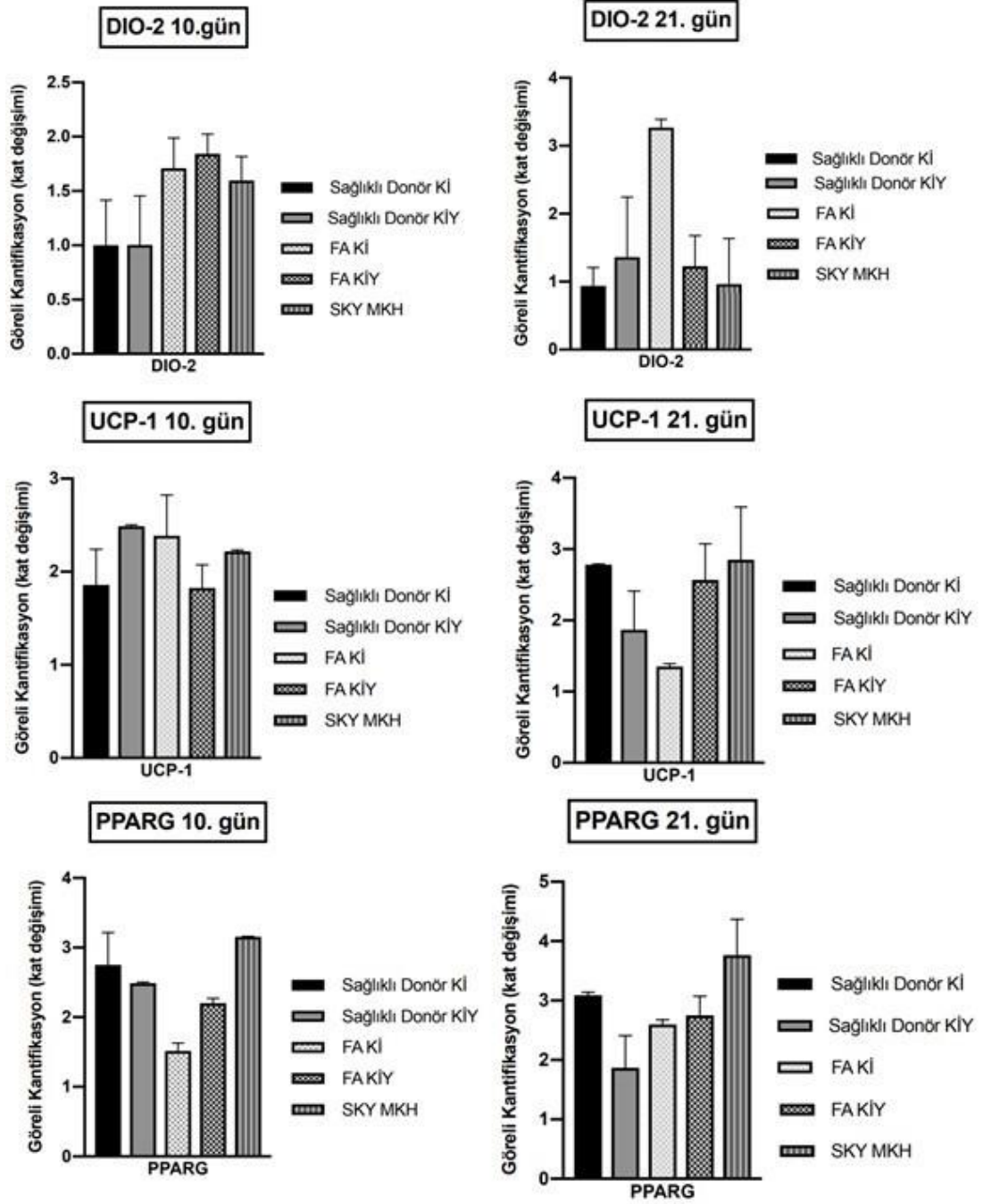


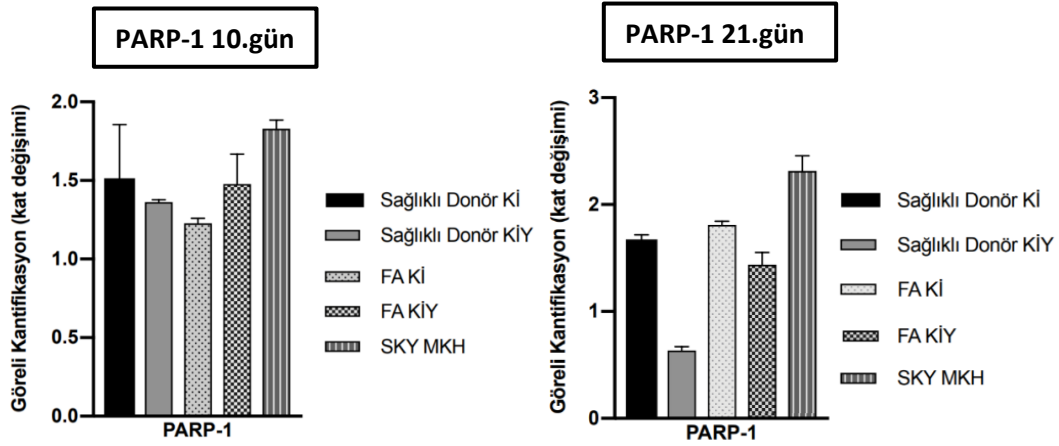
Şekil 4.8. Adipojenik farklılaştırma yapılan örneklerin semi-kantitatif analiz grafikleri. Sağlıklı KI-MKH ve KIY-MKH'lerinin (A), FA hastası KI-MKH ve KIY-MKH'leri (B), FA hastası KI-MKH ve sağlıklı KI-MKH'leri (C), FA hastası KIY-MKH ve sağlıklı KIY-MKH'leri (D) ile sağlıklı KIY-MKH ve SKY-MKH'lerinin (E) karşılaştırılmalı bar grafikleri gösterilmektedir.

4.3. MKH'lere Ait Adipojenik Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi

Adipojenik gen ekspresyonu analizleri, in vitro koşullarda adipogenezin uyarılması için standart besiyerine 1 μ M deksametazon, 2 μ g/ml insulin, 500 μ M 3-izobütül-1-metilksantin (IBMX) ve 60 μ M indometazin eklenmesiyle elde edilen adipojenik farklılaştırma besiyerine maruz bırakılan hücreler ile gerçekleştirilmiştir. Adipojenik farklılaştırılmanın başlatıldığı günden itibaren kontrol grubunda ve 10 ve 21. günlerde beş gruba ait hücrelerin gen ifadeleri qRT-PCR ile incelenmiştir. Bu amaçla PPAR γ , LPL, AdipoQ gibi adipojenik farklılaşmanın erken ve geç dönem belirteçlerinin yanında genellikle beyaz, bej ve kahverengi yağ dokuyu ayırt etmekte kullanılan UCP-1 ve Dio-2 ifadeleri FA hastaları Kİ-MKH ve KİY-MKH, sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH'leri ile SKY-MKH'lerinde değerlendirilmiştir. Grafiklerin çizimi için Graphpad Prism 8 programı kullanılmış, parametrik testlerden tek yönlü ANOVA testi, Post-Hoc testleri adı verilen çoklu karşılaştırma testlerinden grup-içi varyansın homojen olması nedeniyle Tukey Testi uygulanarak analiz gerçekleştirilmiştir. Verilerden elde edilen grafikler, beş gruba ait birer donörün dublike çalışmasıyla elde edilmesi nedeniyle istatistiksel olarak yorum ve anlamlandırma yapılmaması uygun görülmüştür. Bar grafikleri Şekil 4.9.'da gösterilmektedir.

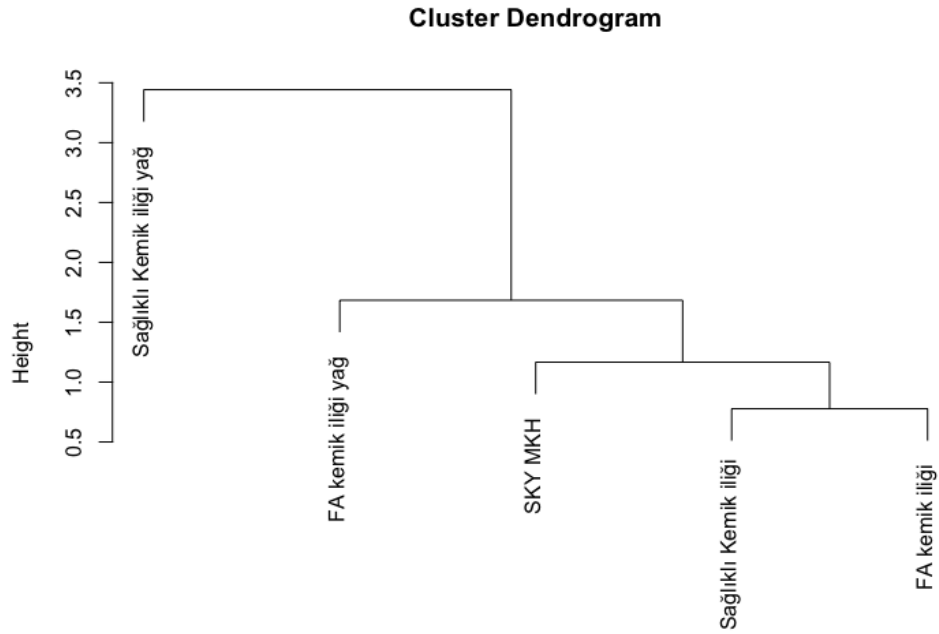




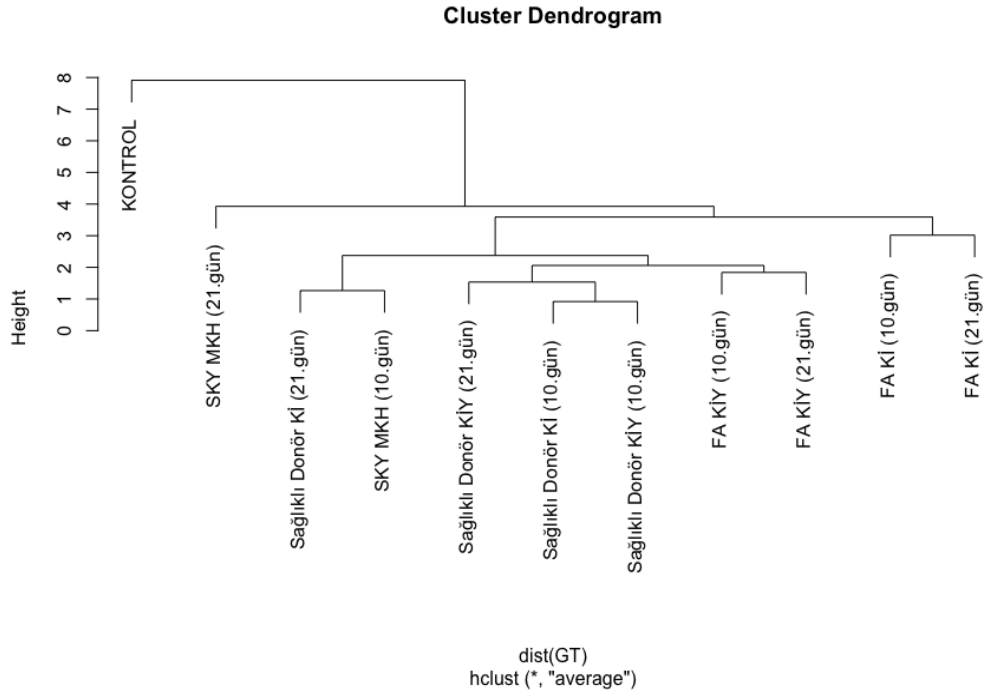


Şekil 4.9. Adipojenik farklılaştırmanın onuncu ve yirmibirinci günlerinde yapılan gen ekspresyon incelemelerine ait bar grafikleri. İki gözlem noktası arasında toplanan hücrelerin LPL, AdipoQ, UCP-1, DiO-2, PARP-1 ve PPAR γ gen ifadelerine ait bar grafikler gösterilmektedir.

Bu çalışmada yer alan beş grubun birbiriyle ne kadar benzer ya da farklı olduğunu görebilmek için hiyerarşik gruplandırma analizi (*hierarchical cluster*) yapılmıştır. Hiyerarşik kümeleme analizinde qRT-PCR kantifikasyonu için $2^{\Delta\Delta CT}$ metodu ile normalize edilen veriler kullanılmıştır. Analiz; R yazılımındaki R cluster paketi ve hclust fonksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Küme ayrıştırma metodlarından ortalama "average" kümeleme ile gruplar arasındaki bütün uzaklıklar hesaplanmış ve bu hesabın ortalaması iki grup arasındaki uzaklık olarak kabul edilerek dendogramlar oluşturulmuştur. Dendogram değerlendirilirken, tek bir donör verisiyle oluşturulduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Farklılaştırma yapılmayan örnekler ile oluşturulan dendogram grafiği Şekil 4.10.'da gösterilmekte olup, sağlıklı ve FA hastası KIY-MKH'leri kendi KI-MKH'lerine göre, sağlıklı ve FA hastası MKH'lerini karşılaştırabilmek için FA hastası KI-MKH'si ve KIY-MKH'si sağlıklı KI-MKH ve KIY-MKH'ye göre, SKY-MKH'leri ile KIY-MKH'lerini karşılaştırabilmek için KIY-MKH'leri SKY-MKH'lerine göre normalize edilerek analiz edilmiştir. Şekil 4.11.'de verilen dendogram grafiği ise adipojenik farklılaştırma uygulanan MKH'lere ait olup her grubun kendi kontrolüne göre normalize edilmesiyle hazırlanmıştır.



Şekil 4.10. Herhangi bir uyarıya maruz kalmamış MKH'lerin gruplandırma analizine ait dendrogram grafiği. Adipojenik uyarıya maruz kalmayan sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH, FA hastası Kİ-MKH ve KİY-MKH ile SKY-MKH'ye ait altı genin her grup için, kendi içinde kıyaslanması ile elde edilmiştir.



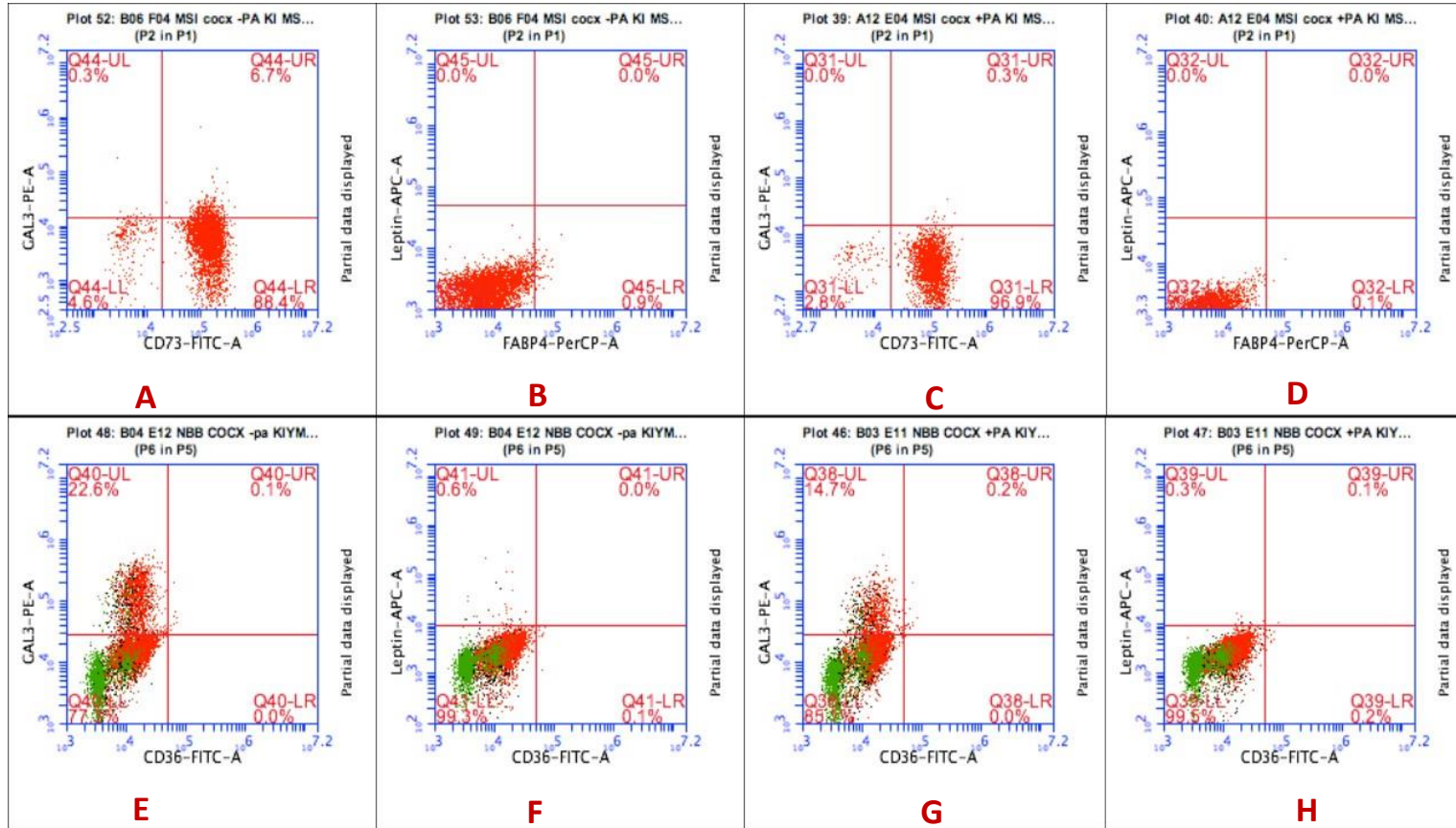
Şekil 4.11. On ve yirmibir gün boyunca adipojenik farklılaştırma uygulanmış MKH'lerin dendrogram grafiği. Grafik altı genin her grup için birlikte değerlendirilmesiyle elde edilmiştir.

4.4. Kİ ve KİY-MKH'lerinin HL-60 Hücreleri ile Ko-Kültürü

Kİ MKH'lerinde lipid metabolizma değişiklikleri oluşturmak ve AML (HL-60) hücreleri ile karşılıklı etkileşimlerini uyarmak amacıyla ko-kültürler düşük serum ortamı (%2 FBS) ve PA uyarımı altında yapılmış, ko-kültür sonrası hücrelerde AML patogenezi ile ilişkili olabileceği öngörülen moleküllerin ifade düzeyleri incelenmiş, moleküllerin ifade değişimleri Şekil 4.12.'de dotplot olarak Tablo 4.3'te ise yüzdelere ait tablo şeklinde verilmiştir.

Tablo 4.3. Ko-kültür şartlarında MKH'ler üzerinde incelenen belirteçler. Akım sitometri ile incelenen belirteçlere ait yüzde veriler verilmiştir.

	PA Uygulanmamış				PA Uygulanmış			
	Gal-3	Lep-R	CD36	FABP-4	Gal-3	Lep-R	CD36	FABP-4
Kİ-MKH	6,7	0,0	-	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0
KİY-MKH	12,4	0,1	0,0	-	22,6	0,6	0,1	-



Şekil 4.12. Sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinin HL-60 hücreleri ile yapılan ko-kültürlerin akım sitometrik grafikler. Sağlıklı Kİ-MKH'lerine palmitik asit (PA) uygulanmadan yapılan ko-kültürde Gal-3 ve Lep-R ifadeleri (A-B), sağlıklı Kİ-MKH'lerine PA uygulanarak yapılan ko-kültürde Gal-3 ve Lep-R ifadeleri (C-D), sağlıklı KİY-MKH'lerine PA uygulanmadan yapılan ko-kültürde Gal-3 ve Lep-R ifadeleri (E-F) ve sağlıklı KİY-MKH'lerine PA uygulanarak yapılan ko-kültürde Gal-3 ve Lep-R ifadeleri (G-H) dotplot olarak gösterilmektedir.

5. TARTIŞMA

Tümör mikroçevresinin önemli bir bileşeni olan ve kanser hücreleri ile yakın temas ve karşılıklı etkileşim halinde bulunan adipositlerin kanser gelişimi ve seyri ile yakın ilişkisi olduğu bildirilmektedir. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda, lösemi patogeneğinde özellikle KİY dokusunun anahtar rol aldığı gösterilmiş, ayrıca çeşitli kanser türlerinin kemik metastazlarıyla da ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (114). Beyaz yağ dokusundan farklı özelliklere sahip olan ve normal ve anormal hematopoez ile ilişkilendirilen bu hücrelerin karakteristik özellikleri ve patoloji oluşumundaki rolleri hakkında halen çok az şey bilinmektedir (9). Son yıllarda lösemi tedavisinde lipid metabolizmasına yönelik hedeflenmiş stratejilerin geliştirilmesinin önemi üzerinde durulmaktadır (115, 116). Bu durum da Kİ mikroçevresinde lipid metabolizması ile direkt ilişkili olan KİY dokusunun detaylı incelenmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Kİ, adipositlerden zengin bir dokudur. Hematopoez regülasyonunda rolü vardır. Aplastik anemi, Kİ yetmezliklerinde Kİ aspirasyon/biyopsi materyallerinin incelenmesinde hematopoetik hücrelerin yerini adipositlerin aldığı, adipositlerin sayıca çok arttığı görülmektedir. Diğer taraftan adipogenez ile osteogenez arasında da ters ilişki vardır. MKH'lerden adipogenezin uyarılması durumunda osteogenezin baskılandığı dikkati çekmektedir. KİY dokusunun hematopoez düzenlenmesindeki aktif rolü son yıllarda vurgulanmakta, hematopoez üzerinde bazen baskılayıcı, bazen de uyarıcı, düzenleyici role sahip olduğu, patolojik hematopoez gelişiminde de rolü olabileceği ileri sürülmektedir. Bu özellikleriyle, KİY dokusu subkutan yağ dokudan farklılık göstermektedir. Sağlıklı hematopoez yanında lösemik hücre proliferasyonu için gerekli olan SYA'yı temin ederek lösemi gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (117).

Kanser hücresi ile yakın komşulukta olan adipositlerin kanser hücresi ile etkileşiminde farklı mekanizmalar içerisinde en temel olanı, adipositlerde uyarılan lipoliz sonucu açığa çıkan SYA'ları, kanser hücrelerinin yaşama ve çoğalma için kullanmasıdır (10). Bu durum, solid tümörlerle yakın komşulukta olan adipositlerde olduğu gibi Kİ-adipositlerinde de gösterilmiş, solid dokuda kanser hücresinin yakın çevresinde olan adipositlerin daha uzak yerleşimde olanlara göre daha küçük oldukları

bildirilmiştir (118). Kİ dokusunun solid bir doku olmaması ve lösemilerde incelemelerin çoğunlukla Kİ aspirasyon materyallerinde yapılması nedeniyle KİY adipositlerinin incelenmesinde zorluklar vardır ve tipik özellikleri bilinmemektedir. Literatürde, KİY dokusunda hem beyaz hem de termoregülasyonda rolü olan kahverengi yağ dokusuna ait özelliklerin olduğu bildirilmiş, bej adiposit olarak adlandırılan hücrelere yakın olduğu, ya da tamamen farklı bir yağ dokusu tipi olduğu ileri sürülmektedir (13, 69)

İnsanlarda KİY dokusunun incelendiği çalışmaların bir kısmında kalça protezi nedeniyle çıkarılan iliak kemiklerin yağlı kısımlarının enzimatik yöntemle muamele edilip kültürü sonucu geliştirilen hücreler kullanılmıştır (119). Ancak kalça replasmanı yapılan bireylerin çoğunlukla ileri yaşta olup, bu hastalarda osteoartrit veya başka patolojiler söz konusu olabilir. Bu durumun inflame adipoz dokuyu ve sağlıklı insan KİY dokusunu temsil etmek için uygun olmayacağı düşünülmüştür. Ayrıca, bu çalışmalarda iliğin yağlı kısmı kullanılmıştır. Bu dokunun cMAT dokusunu temsil ettiği bu nedenle de hematopoez regülasyonunda rolü olan ve hematopoetik hücreler arasında kalan rMAT dokusunu temsil etmek için ideal yöntem olmadığı düşünülerek bu tez çalışmasında direkt Kİ aspirasyon materyalinden kültür yapılarak adiposit öncülerinin zenginleştirilmesi planlanmıştır (13). Literatürde insanlarda yapılan diğer çalışmalarda ise Kİ-MKH'lerinin in-vitro adiposit farklılaşması uyarımı sonrası elde edilen hücrelerin KİY adipositleri olduğu ileri sürülmüş, KİY dokusunu inceleyen hayvan çalışmalarında ise tavşan, sıçan ve farelerin sakrifiye edilmeleri sonrası çıkarılan kemiklerin yağlı kısımdan kültür yapılması veya seleksiyon yöntemleri kullanılmıştır (120-122).

İnsan KİY dokusunu incelemeyi amaçladığımız bu tez çalışmasında Kİ aspirasyon materyalinin santrifüjü sonrası üstte kalan yağ tabakasından MKH'ler geliştirilmiş; bu hücrelerin adiposit- "*primed*" MKH veya pre-adiposit (veya adiposit öncüsü/prekürsör) olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Kİ aspirasyon materyalinde temel olarak hematopoetik hücreler bulunmaktadır. Aspirasyon sırasında stromadan da çok az sayıda hücre koparak toplanan aspirasyon ürününe karışmaktadır. Hematopoetik hücreler içerisine karışan bu hücrelerin düşük molekül ağırlığına sahip olmaları ve içerdikleri yağ moleküllerinin de etkisiyle santrifüj sonrası diğer hücreler gibi pellet oluşturmayıp yağ tabakasının içerisine karışmış olabileceklerinden yola

çıkılmıştır. Bu yöntemle Kİ materyalinde var olan adipositlerin, in-vitro adipogenez uyarılmasına ihtiyaç duyulmadan fiziksel özellikleri nedeniyle zenginleştirilerek kültürde çoğaltılabileceği, bu hücrelerin de KİY dokusunu daha iyi temsil edileceği düşünülmüştür. Kİ aspirasyon örneklerinin büyük bir kısmında, kişiden kişiye değişmekle beraber santrifüj sonrası gözle görülür bir yağ tabakası dikkati çekmektedir.

Çalışmamızda, bu yağ tabakasının direkt kültürü ile geliştirilen hücrelerin (KİY-MKH), standart yöntemle Kİ aspirasyon materyalinden geliştirilen Kİ-MKH'ler, ayrıca *liposuction* örneklerinden elde edilip çoğaltılan SKY-MKH'leri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta, KİY-MKH'lerinin, kültürde adezyon göstermeleri, standart MKH karakterizasyonu için gerekli olan fenotipik özelliklere sahip olmaları (pozitif stromal, negatif hematopoetik belirteçler) ve in-vitro adipojenik ve osteojenik potansiyeli taşımaları nedeniyle Kİ-MKH ve SKY-MKH'lerine benzerlik göstermekte, ancak bazı protein ve gen ifade analizlerinde ve adipojenik uyarıma cevaplarında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir.

İn vitro adipojenik uyarım altında MKH'lerin adiposit yönünde farklılaşması bu hücrelerin karakterizasyonu için gereken temel özelliklerden biridir. Beklendiği gibi Kİ-MKH, KİY-MKH ve SKY-MKH'lerinin hepsinde, in vitro adipogenez uyarılmasını takiben 21. günde yapılan *Oil-Red O* boyaması ile adipositlerin geliştiği görülmüş, 10. ve 21. günlerde yapılan qRT-PCR analizlerinde de uyarım yapılmamış kontrol örneklerine göre adipojenik gen ifadelerinde artış görülmüştür. Moleküler analizlerde, her gruptan birer örnekte (sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH, FA hastası Kİ-MKH ve KİY-MKH ile SKY-MKH) ikişer replika ile altı gen (PARP1, PPAR γ , UCP-1, Dio-2, Adiponektin, LPL) analiz edilmiştir. Analizler birer örnek üzerinden olduğu için yorum yapılamasa da sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH ile FA hastası Kİ-MKH ve KİY-MKH, sağlıklı Kİ-MKH ve KİY-MKH ile SKY-MKH'leri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Genel olarak adipojenik uyarıma cevap yönünden, histokimyasal, semi-kantitatif ve moleküler analizler değerlendirildiğinde hem sağlıklı kontrol örneklerinde hem de FA hastası örneklerinde KİY-MKH'lerinin Kİ-MKH'lerine göre adipojenik farklılaşma özelliklerinin azalmış olduğu izlenimi edinilmiştir. Bu durum, KİY-MKH'lerinin adipojenik farklılaşmasında gecikme/ de-diferansiye veya farklı regülasyon olabileceği şeklinde yorumlanmış ve MKH araştırmalarında yaygın

kullanılan ve de daha ziyade beyaz adiposit gelişimini uyaran farklılaşma protokolunun uygulanması ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Ancak, bu sonuca varabilmek için daha fazla bireyde ve tekrarlı analizlere ihtiyaç vardır. Beyaz yağ doku olan SKY ile KİY farklılıklarını ortaya koymak için yapılan karşılaştırma sonucu da PARP1, PPAR γ , AdipoQ, UCP-1 ve LPL ifadelerinde bazı değişiklikler olduğu dikkati çekmiş, iki farklı yağ doku hücrelerinin adipogenez açısından farklı özellikleri olduğu izlenimi edinilmiştir. Çalışmamızın diğer kısıtlılığı, analizlerin 10. ve 21. günlerde yapılıp adiposit yönünde uyarımın erken dönemlerinin incelenmemiş olmasıdır. Ayrıca, kahverengi yağ dokusu gelişimini uyaran hipotermik ortam veya farklı uyaranların kullanımı ile de hücre tipleri arasında adipojenik cevap farklılıklar daha net ortaya konabilecektir. Çalışmamızda kısıtlı örnek sayısına rağmen hiyerarşik gruplandırma sonucu çizilen dendogram grafiğinde de Kİ-MKH, KİY-MKH ve SKY-MKH'lerinin, ayrıca FA hastası örneklerinin de adipojenik uyarım altında ve uyarılmamış durumlarda altı gen açısından ifade farklılıkları gösterdiği dikkati çekmiştir.

Bu tez çalışması, Kİ aspirasyon materyalinin yağ tabakasından geliştirilmiş KİY-MKH'lerinin kırmızı ilik içerisine serpişmiş olan düzenleyici (r-MAT) adipositleri temsil edebileceği ve beyaz yağ dokusundan farklı regülasyona veya farklı özelliklere sahip olacakları düşünülerek planlanmıştır. Elde edilen ön bulgular kısıtlı örnek sayılarına rağmen bu düşünceyi destekleyici yöndedir. FA hasta örneklerinin sağlıklı kontrol örnekleri ile karşılaştırılmasında da adipojenik uyarım histokimyasal analizleri ve gen ifadelerinde farklılıklar olduğu görülmüş, FA hasta örneklerinin olası bir adipojenik disregülasyon yönünden incelenmesinin önemini düşündürmüştür. FA hastalarında Kİ yetmezliği ve/veya AML gelişiminde adipojenik disregülasyon ve lipid metabolizması değişikliklerinin katkısı literatürde yakın zamana kadar gündeme getirilmemiş konulardır (123).

Farklı kaynaklardan geliştirilen hücrelerin morfolojik değerlendirilmesinde de bazı değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca, pasaj bitiminde yaklaşık %80 doygunluk durumunda iken yapılan hücre sayımlarında KİY-MKH ve SKY-MKH'lerine göre Kİ-MKH sayısının daha yüksek olması da yağ kökenli hücrelere göre daha küçük boyutta olmalarına bağlanmıştır.

Fankoni anemisi, FANC genlerinde oluşan mutasyonlar sonucunda DNA hasar onarımında bozukluklar, kromozom kırıkları, konjenital anomaliler ve kanser yatkınlığı ile karakterize bir hastalıktır. Bu hastalarda AML gelişimi riski yüksektir ancak hastalarda Kİ yetmezliği bulgularının ortaya çıktığı veya AML geliştirdikleri yaş büyük değişkenlik göstermektedir. Bunda, farklı genlerdeki farklı mutasyonların olduğu kadar çevresel koşulların da etkisi olabileceği, zenobiyotik maruziyetleri sonucu KİY dokusunda biriken toksik maddelerin KİY adipositlerinde modifikasyona yol açmasının rolü olduğu düşünülmüştür. Bu sebeple bu bu çalışmada FA KİY-MKH'leri de incelenmiştir (12). Literatürde, bu konularla ilgili kısıtlı sayıda çalışma vardır. KİY dokusu konusu ise FA açısından ele alınmamıştır

Literatürde FA hastalarının Kİ mikroçevresinin incelendiği çalışmalarda FA hastalarında Kİ-MKH'lerinin immünofenotipinin kontrol MKH'leri ile benzer olduğu, farklılaşma potansiyelinin, immün modulator ve hematopoez destek özelliklerinin korunduğu, ancak uzun süre proliferasyon kapasitelerinin daha düşük, SCF ve IL-6 seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. FANC genlerindeki mutasyon nedeniyle beklenildiği gibi mitomycin C'ye aşırı duyarlılık ve senesens gösterdiği bildirilmiş, bu özelliklerin de FA'de Kİ yetmezliği gelişiminde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (106). Grubumuzdan yapılan bir çalışmada da FA hastası MKH'leri diğer çalışmalarla uyumlu olarak kontrol MKH'lerle genel olarak benzer özellikte bulunmuş ancak belirli mutasyon (FANCD2) taşıyan ve lösemi yatkınlığı diğerlerine göre yüksek olan hastalarda ise Kİ nişinin önemli komponenti olan TGF- β ifadesinin olmadığı görülmüştür (109). Çalışmanın devamında FA MKH'lerinde bakılan HOX ve TALE transkripsiyon faktörlerinin ifadeleri genel olarak kontrollerle benzer bulunmuş, sadece TALE grubu üyesi olan PKNOX2, FA hastalarında düşük bulunmuş ve TGF- β düzeyleri ile ilişkisi gündeme getirilmiştir (108). Diğer taraftan FANCC ve FANCCg -/- farelerde MKH'lerin hematopoez destekleyici özelliklerinin bozulduğu, bunun da kısmen, MKH'lerin osteojenik farklılaşmasının bozulmasıyla ilişkili olabileceği gösterilmiş, bu çalışmada, diğer çalışmaların aksine FA hastalarının da osteojenik farklılaşmada azalma, ve hematopoez destekleyici özelliklerde bozulma gösterilmiştir (110). Elde edilen farklı sonuçlar, hastalar ve MKH'lerin heterojen subpopulasyonları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar HKH ve kanser kök hücre biyolojisinde metabolik faktörlerin önemine

değınmektedir. FA MKH'lerinden gliserofosfolipidlerin TLR4 sinyali üzerinden hematopoetik disregölasyona yol açtığı gösterılmış, ve gliserofosfolipid biyosentezi modifikasyonunun hematopoez düzenlenmesinde rolü olabileceğine değınılmıştır (124).

Bu tez çalışmasında, adipojenik uyarım altında ve bazal durumda sağlıklı Kİ ve KİY örnekleri ile kıyaslandığında, FA örneklerinin adipojenik uyarıma cevabında gözlenen farklılıkların daha fazla sayıda hasta örneğinde gösterilmesi halinde bu hastalarda KİY dokusunun hematolojik patolojilerin gelişimine muhtemel katkıları gündeme gelecektir. Kanser gelişiminde kronik inflamasyon durumunun da etkisi vardır. FA hastalarında Kİ inflamasyonu vardır. Bu nedenle, FA'de lösemi yatkınlığında adipoz doku inflamasyonunun da araştırılmasının önemli olduğu düşünölmüş, ancak bu konu bu tez kapsamına dahil edilmemiştir. Çalışmamızda, FA hastası örnekleri yüzey belirteçleri açısından değerdendirilmış, standard MKH belirteçlerine sahip oldukları görölmüştür. Lösemi-mikroçevre ilişkisinde rolü olan moleküller (galektin-3, LepR, FABP4, PDGFR- α) de incelenmiş, ancak bireyler arasındaki farklılıklar ve hasta sayılarının kısıtlı olması nedeniyle istatistiksel değerdendirme mümkün olmamıştır. İnsanlardan elde edilen biyolojik örneklerle yapılan çalışmalarda örnekler arasında heterojenite olması bilinen bir problemdir. Bu heterojenite daha çok fonksiyonel testlerde ortaya çıkmaktadır. Yüzey belirteçleri yönünden genel olarak bir benzerlik olsa da uyarım altında farklılaşma potansiyelleri önemli oranda değışkenlik gösterebilmektedir. Sağlıklı vericilerin örneklerinde bile genetik yapı, yaş, cinsiyet, farklı çevresel faktörlerin etkisiyle farklılıklar saptanmaktadır. Bu çalışmada Kİ örneklerinin alındığı sağlıklı Kİ nakli donörlerinin yaşları, adolesan/genç erişkin yaşta olan SKY donörleri ile benzer tutulmuştur.

Diğer taraftan, lipid metabolizması açlık ve tokluk durumunda büyük değışkenlik göstermektedir. Toklukta, adipositler hücre içerisinde lipid depolamakta iken açlık durumunda enerji üretimi için lipoliz ile serbest yağ asitleri açığa çıkar ve yağ asit oksidasyonu ile yüksek verimlilikte enerji üretimi sağlanır (79). Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada KİY dokusunun subkutan yağdan farklı olarak açlık durumunda da lipolize dirençli olduğu bildirilmış (125), bu durum, KİY dokusunun hematopoezin sürdürölmesi için korunduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu durum, solid tümörlerde gösterilmış olan adiposit-kanser ilişkisinin Kİ'de lösemi gelişimi/seyri ile

ilişkinini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir. Bu çalışmada da, Kİ-MKH ve KİY-MKH'leri düşük serum ortamına (%2 FBS) maruz bırakılmış, ancak Kİ adipositlerinin lipolize dirençli olduğu bilgisinin ışığında diğer bir uyaran olarak da PA ile muamele edilmişlerdir. Vücutta sentezlenen diğer uzun zincirli yağ asitlerinin prekürsörü olan PA'ın ayrıca lipolizi uyardığı, bazı durumlarda ise negatif geri bildirim ile inhibe ettiği bildirilmiştir. Literatürde, adipositlerden tümör hücrelerine serbest yağ asidi transferinde etkili faktörlerin başında FABP-4'ün geldiği bildirilmiştir. FABP-4'ün ko-kültür sonrası tümör hücrelerinde ekspresyonu artmaktadır. FABP-4'ün inhibisyonu, kanser hücrelerinde lipid birikimin azalmasına ve tümör gelişimin durmasına/yavaşlamasına yol açtığı gösterilmiştir (9). Bu özellikler, tümör hücresine serbest yağ asidi transferinin hedeflenmiş tedavi potansiyeli taşıdığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, FABP-4'ün yanında lösemi-Kİ mikroçevre ilişkisinde rolü olması nedeniyle Gal-3, LepR ve CD36 ifadeleri de incelenmiş, düşük serum ortamında ve PA maruziyeti ile Kİ ve KİY-MKH'lerinde Gal-3 seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Çalışma birer örneklem ile yapıldığından yorum yapılamamıştır. Ön çalışma niteliğinde olan bu sonuçların ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. FABP-4 ifadelerinin qRT-PCR ile ölçülmesi, diğer belirteçlerin tekrar edilmesi ve hormon sensitif lipaz (HSL) gibi diğer adipojenik ve lipogenez/lipoliz belirteçlerine de bakılması planlanmıştır.

Özetle bu çalışmada, literatürde bildirilen çalışmalardan farklı olarak KİY tabakasından geliştirilen MKH'lerin karakterizasyonu yapılmış, in-vitro adipojenik uyarıma cevap yönünden Kİ-MKH'leri ve SKY-MKH'lerinden farklı özellik gösterdikleri gözlenmiş, FA hastalarının da Kİ-MKH ve KİY-MKH'lerinde sağlıklı kontrollere göre farklılıklar saptanmıştır. Çok kısıtlı örnek sayısı ile elde eden ön bulguların hasta sayıları artırılarak desteklenmesi halinde KİY-MKH'lerinin beyaz adipoz doku olan SKY-MKH'lerinden farklı bir regülasyona sahip olduğu, FA örneklerinde ise adipojenik disregülasyona işaret edebileceği düşünülmüştür. Bu bulgular da, bu durumun lösemi gelişimi/seyri ile ilişkisinin detaylı araştırılmasının gereğini ortaya koymuştur.

6. SONUÇLAR

- Sağlıklı Kİ nakli donörleri veya FA hastalarının Kİ aspirasyon örneklerinin yağ tabakasının hücre kültürüne ekimi ve çoğaltılması sonucu KİY-MKH'leri elde edilir.
- KİY-MKH'leri, Kİ mononükleer hücrelerinin dansite gradient yöntemi sonrası kültürü ile elde edilen Kİ-MKH'leri ile karşılaştırıldığında genel MKH özellikleri (adezyon, stromal fenotip, in vitro adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyeli taşımaları) yönünden benzerlik gösterir. İn vitro adipojenik uyarıma cevaplarında KİY ile Kİ-MKH'leri arasında histokimyasal analizler, adipojenik gen ifade düzeyleri ve cevap süreleri arasında farklılıklar olduğu izlenimi edinilmiş, KİY-MKH'lerinin adipojenik farklılaşmasında gecikme veya kullandığımız farklılaştırma protokolüne uymayan, farklı tipte adiposit gelişimine eğilimli oldukları şeklinde değerlendirilmiştir.
- Hematopoetik hücrelerin yoğun bulunduğu Kİ aspirasyon örneğinin içerisindeki yağ tabakasından hücre kültüründe zenginleştirilerek elde edilmiş olmaları ve Kİ-MKH'lerle adipojenik uyarılara cevap yönünden farklılıkları nedeniyle KİY-MKH'lerinin, düzenleyici adipoz dokuyu (rMAT) temsil edebilecekleri düşünülmüştür. Bu ön deney sonuçlarının daha fazla sayıda örnekle desteklenmesi halinde, bu yöntemin, literatürde insan veya hayvan örneklerinde iliğin sarı yağ dokusundan elde edilen ve konstitutif (cMAT) yağ dokusuna göre hematopoez düzenlenmesinde rolü olan adipositleri zenginleştirmek yönünden avantajlı olduğu düşünülmüştür.
- KİY-MKH'lerin, beyaz yağ dokusunu temsil eden subkutan yağ dokusundan elde edilen MKH'lerle (SKY-MKH) karşılaştırılması sonucu da genel MKH özellikleri yönünden benzerlik bulunmuş, in vitro adipojenik uyarıma cevaplarında ise adipojenik gen ifade düzeyleri ve cevap süresinde KİY ile SKY-MKH arasında farklılıklar olduğu görülmüş olup SKY-MKH'lerinin adipojenik farklılaşma özelliklerinin KİY-MKH'lerinden farklı olduğu izlenimi edinilmiştir.
- FA hastalarının KİY ve Kİ-MKH'lerinin incelenmesinde de sağlıklı KİY-MKH ve Kİ-MKH'lerle kıyaslandığında uyarım altında adipojenik gen ifadelerinde bazı farklılıklar tespit edilmiş, adipogenez cevabında gecikme

olduğu dikkati çekmiştir. Bu bulguların, ileri çalışmalarla desteklendiği takdirde FA hastalarında Kİ adiposit farklılaşmasında bir disregölasyona işaret edebileceği düşünölmüştür.

- Bu bulgular, dünyada son 5 yıldır tanımlanmaya çalışılan ve KİY dokusunun tanımlanması ve in vitro, in vivo metodolojik harmonizasyon sağlanmasına yönelik rehberin 2020 yılında yayınlandığı düşünöldüğünde konunun güncelliğini ve araştırılmaya açık bir alan olduğunu ortaya koymaktadır.
- Bu çalışmada elde edilen ön bulguların ileri çalışmalarla desteklenmesi ve detaylandırılması hedeflenmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Birbrair A, Frenette PS. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1370(1):82-96.
2. Duarte D, Hawkins ED, Lo Celso C. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood.* 2018;131(14):1507-11.
3. Fraczak E, Olbromski M, Piotrowska A, Glatzel-Plucinska N, Dziegiel P, Dybko J, et al. Bone marrow adipocytes in haematological malignancies. *Acta Histochem.* 2018;120(1):22-7.
4. Mendez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(5):285-98.
5. Hardouin P, Rharass T, Lucas S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:85.
6. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548-56.
7. Turner RT, Martin SA, Iwaniec UT. Metabolic Coupling Between Bone Marrow Adipose Tissue and Hematopoiesis. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(2):95-104.
8. Zhang Z, Huang Z, Ong B, Sahu C, Zeng H, Ruan HB. Bone marrow adipose tissue-derived stem cell factor mediates metabolic regulation of hematopoiesis. *Haematologica.* 2019;104(9):1731-43.
9. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, Robinson SD, Edwards DR, Marlein CR, et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood.* 2017;129(10):1320-32.
10. Yang S, Lu W, Zhao C, Zhai Y, Wei Y, Liu J, et al. Leukemia cells remodel marrow adipocytes via TRPV4-dependent lipolysis. *Haematologica.* 2019.
11. Tratwal J, Labella R, Bravenboer N, Kerckhofs G, Douni E, Scheller EL, et al. Reporting Guidelines, Review of Methodological Standards, and Challenges Toward Harmonization in Bone Marrow Adiposity Research. Report of the Methodologies Working Group of the International Bone Marrow Adiposity Society. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:65.
12. Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014;27(3-4):214-21.
13. Li Y, Meng Y, Yu X. The Unique Metabolic Characteristics of Bone Marrow Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:69.
14. Yan F, Shen N, Pang JX, Zhao N, Zhang YW, Bode AM, et al. A vicious loop of fatty acid-binding protein 4 and DNA methyltransferase 1 promotes acute myeloid leukemia and acts as a therapeutic target. *Leukemia.* 2018;32(4):865-73.
15. Nangia-Makker P, Hogan V, Raz A. Galectin-3 and cancer stemness. *Glycobiology.* 2018;28(4):172-81.
16. Ruvolo PP. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(3):427-37.
17. Ning HM, Zhang Y, Mao N. [Leptin and its receptor in acute myeloid leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2010;18(1):234-7.
18. Naymagon L, Marcellino B, Mascarenhas J. Eosinophilia in acute myeloid leukemia: Overlooked and underexamined. *Blood Rev.* 2019;36:23-31.
19. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10.
20. Yu VW, Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. *Curr Top Dev Biol.* 2016;118:21-44.
21. Armstrong L, Lako M, Buckley N, Lappin TR, Murphy MJ, Nolte JA, et al. Editorial: Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem Cells.* 2012;30(1):2-9.
22. Wang A, Zhong H. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology.* 2018;23(10):729-39.
23. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(3):183-93.
24. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.
25. Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, Weissinger EM, Holler E, van Rood JJ, et al. Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front Immunol.* 2016;7:470.

26. Musial-Wysocka A, Kot M, Majka M. The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplant*. 2019;28(7):801-12.
27. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16(1):3-32.
28. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N, et al. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci*. 2018;15(1):36-45.
29. Henon PR. Human embryonic or adult stem cells: an overview on ethics and perspectives for tissue engineering. *Adv Exp Med Biol*. 2003;534:27-45.
30. Yokota T. "Hierarchy" and "Holacracy"; A Paradigm of the Hematopoietic System. *Cells*. 2019;8(10).
31. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*. 2015;125(17):2605-13.
32. Dzierzak E, Bigas A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell*. 2018;22(5):639-51.
33. Heazlewood SY, Oteiza A, Cao H, Nilsson SK. Analyzing hematopoietic stem cell homing, lodgment, and engraftment to better understand the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1310:119-28.
34. Carrelha J, Meng Y, Kettyle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, et al. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature*. 2018;554(7690):106-11.
35. Pouzolles M, Oburoglu L, Taylor N, Zimmermann VS. Hematopoietic stem cell lineage specification. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(4):311-7.
36. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112(9):3543-53.
37. Kocabas F, Xie L, Xie J, Yu Z, DeBerardinis RJ, Kimura W, et al. Hypoxic metabolism in human hematopoietic stem cells. *Cell Biosci*. 2015;5:39.
38. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):380-90.
39. Friedenstein A. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models. *Haematol Blood Transfus*. 1989;32:159-67.
40. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
41. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
42. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
43. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells*. 2019;8(8).
44. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
45. Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheding S. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1370(1):109-18.
46. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-49.
47. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*. 2015;2015:394917.
48. Klamer SE, Dorland YL, Kleijer M, Geerts D, Lento WE, van der Schoot CE, et al. TGFBI Expressed by Bone Marrow Niche Cells and Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Regulates Hematopoiesis. *Stem Cells Dev*. 2018;27(21):1494-506.
49. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
50. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003;89(2-3):267-70.

51. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101-9.
52. Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2008;214(2):413-21.
53. Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol*. 2010;695:155-68.
54. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(9):573-90.
55. Levesque JP, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia*. 2010;24(12):1979-92.
56. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-6.
57. Kiel MJ, Acar M, Radice GL, Morrison SJ. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell*. 2009;4(2):170-9.
58. Zhao M, Tao F, Venkatraman A, Li Z, Smith SE, Unruh J, et al. N-Cadherin-Expressing Bone and Marrow Stromal Progenitor Cells Maintain Reserve Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep*. 2019;26(3):652-69 e6.
59. Xing J, Hou T, Jin H, Luo F, Change Z, Li Z, et al. Inflammatory microenvironment changes the secretory profile of mesenchymal stem cells to recruit mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(4):905-19.
60. Haylock DN, Nilsson SK. Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle*. 2005;4(10):1353-5.
61. Nilsson SK, Simmons PJ. Transplantable stem cells: home to specific niches. *Curr Opin Hematol*. 2004;11(2):102-6.
62. Horowitz MC, Berry R, Holtrup B, Sebo Z, Nelson T, Fretz JA, et al. Bone marrow adipocytes. *Adipocyte*. 2017;6(3):193-204.
63. Wen JQ, Feng HL, Wang XQ, Pang JP. Hemogram and bone marrow morphology in children with chronic aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *World J Pediatr*. 2008;4(1):36-40.
64. Frigolet ME, Gutierrez-Aguilar R. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex*. 2020;156(2):142-9.
65. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
66. Scheller EL, Doucette CR, Learman BS, Cawthorn WP, Khandaker S, Schell B, et al. Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nat Commun*. 2015;6:7808.
67. Fazeli PK, Klibanski A. The paradox of marrow adipose tissue in anorexia nervosa. *Bone*. 2019;118:47-52.
68. Seo Y, Shin TH, Kim HS. Current Strategies to Enhance Adipose Stem Cell Function: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15).
69. Bukowska J, Frazier T, Smith S, Brown T, Bender R, McCarthy M, et al. Bone Marrow Adipocyte Developmental Origin and Biology. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(3):312-9.
70. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252-63.
71. Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, et al. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res*. 2010;25(9):2078-88.
72. McGrath C, Sankaran JS, Misaghian-Xanthos N, Sen B, Xie Z, Styner MA, et al. Exercise Degrades Bone in Caloric Restriction, Despite Suppression of Marrow Adipose Tissue (MAT). *J Bone Miner Res*. 2020;35(1):106-15.
73. Poloni A, Maurizi G, Serrani F, Mancini S, Zingaretti MC, Frontini A, et al. Molecular and functional characterization of human bone marrow adipocytes. *Exp Hematol*. 2013;41(6):558-66 e2.
74. Li Q, Wu Y, Kang N. Marrow Adipose Tissue: Its Origin, Function, and Regulation in Bone Remodeling and Regeneration. *Stem Cells Int*. 2018;2018:7098456.
75. Bani Hassan E, Ghasem-Zadeh A, Imani M, Kutaiba N, Wright DK, Sephehrizadeh T, et al. Bone Marrow Adipose Tissue Quantification by Imaging. *Curr Osteoporos Rep*. 2019;17(6):416-28.

76. Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, et al. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell*. 2016;19(1):23-37.
77. Zhou D, Samovski D, Okunade AL, Stahl PD, Abumrad NA, Su X. CD36 level and trafficking are determinants of lipolysis in adipocytes. *FASEB J*. 2012;26(11):4733-42.
78. Yan F, Shen N, Pang JX, Zhang YW, Rao EY, Bode AM, et al. Fatty acid-binding protein FABP4 mechanistically links obesity with aggressive AML by enhancing aberrant DNA methylation in AML cells. *Leukemia*. 2017;31(6):1434-42.
79. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest*. 2010;120(1):142-56.
80. Yang L, Guan G, Lei L, Lv Q, Liu S, Zhan X, et al. Palmitic acid induces human osteoblast-like Saos-2 cell apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Stress Chaperones*. 2018;23(6):1283-94.
81. Khalid A, Siddiqui AJ, Huang JH, Shamsi T, Musharraf SG. Alteration of Serum Free Fatty Acids are Indicators for Progression of Pre-leukaemia Diseases to Leukaemia. *Sci Rep*. 2018;8(1):14883.
82. Zeng L, Wu GZ, Goh KJ, Lee YM, Ng CC, You AB, et al. Saturated fatty acids modulate cell response to DNA damage: implication for their role in tumorigenesis. *PLoS One*. 2008;3(6):e2329.
83. Malodobra-Mazur M, Cierznia A, Dobosz T. Oleic acid influences the adipogenesis of 3T3-L1 cells via DNA Methylation and may predispose to obesity and obesity-related disorders. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):230.
84. Piccolis M, Bond LM, Kampmann M, Pulimeno P, Chittraju C, Jayson CBK, et al. Probing the Global Cellular Responses to Lipotoxicity Caused by Saturated Fatty Acids. *Mol Cell*. 2019;74(1):32-44 e8.
85. Pabst T, Kortz L, Fiedler GM, Ceglarek U, Idle JR, Beyoglu D. The plasma lipidome in acute myeloid leukemia at diagnosis in relation to clinical disease features. *BBA Clin*. 2017;7:105-14.
86. Loew A, Kohnke T, Rehbeil E, Pietzner A, Weylandt KH. A Role for Lipid Mediators in Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10).
87. Hellmann J, Zhang MJ, Tang Y, Rane M, Bhatnagar A, Spite M. Increased saturated fatty acids in obesity alter resolution of inflammation in part by stimulating prostaglandin production. *J Immunol*. 2013;191(3):1383-92.
88. Zhang Q, Kong X, Yuan H, Guan H, Li Y, Niu Y. Mangiferin Improved Palmitate-Induced-Insulin Resistance by Promoting Free Fatty Acid Metabolism in HepG2 and C2C12 Cells via PPARalpha: Mangiferin Improved Insulin Resistance. *J Diabetes Res*. 2019;2019:2052675.
89. Sooranna SR, Saggerson ED. Inactivation of rat adipocyte pyruvate dehydrogenase by palmitate. Protection against this effect by insulin in the presence of glucose. *Biochem J*. 1979;184(1):59-62.
90. Fu J, Ling S, Liu Y, Yang J, Naveh S, Hannah M, et al. A small shared epitope-mimetic compound potently accelerates osteoclast-mediated bone damage in autoimmune arthritis. *J Immunol*. 2013;191(5):2096-103.
91. Moharana K, Zabeau L, Peelman F, Ringler P, Stahlberg H, Tavernier J, et al. Structural and mechanistic paradigm of leptin receptor activation revealed by complexes with wild-type and antagonist leptins. *Structure*. 2014;22(6):866-77.
92. Hino M, Nakao T, Yamane T, Ohta K, Takubo T, Tatsumi N. Leptin receptor and leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2000;36(5-6):457-61.
93. Gorska E, Popko K, Wasik M. Leptin receptor in childhood acute leukemias. *Adv Exp Med Biol*. 2013;756:155-61.
94. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.
95. Ma JJ, Shang J, Wang H, Sui JR, Liu K, Du JX. Serum adiponectin levels are inversely correlated with leukemia: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther*. 2016;12(2):897-902.
96. Ruvolo PP. Galectins as regulators of cell survival in the leukemia niche. *Adv Biol Regul*. 2019;71:41-54.
97. Ruvolo PP, Ruvolo VR, Burks JK, Qiu Y, Wang RY, Shpall EJ, et al. Role of MSC-derived galectin 3 in the AML microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865(7):959-69.
98. Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene--a review. *Diabetes Metab Syndr*. 2015;9(1):46-50.

99. Boyd AL, Reid JC, Salci KR, Aslostovar L, Benoit YD, Shapovalova Z, et al. Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nat Cell Biol.* 2017;19(11):1336-47.
100. Hepler C, Vishvanath L, Gupta RK. Sorting out adipocyte precursors and their role in physiology and disease. *Genes Dev.* 2017;31(2):127-40.
101. Hoang T, Smith MD, Jelokhani-Niaraki M. Expression, folding, and proton transport activity of human uncoupling protein-1 (UCP1) in lipid membranes: evidence for associated functional forms. *J Biol Chem.* 2013;288(51):36244-58.
102. Samudio I, Fiegl M, McQueen T, Clise-Dwyer K, Andreeff M. The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer Res.* 2008;68(13):5198-205.
103. Cheung RS, Taniguchi T. Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers. *Int J Hematol.* 2017;106(3):335-44.
104. Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev.* 2010;24(3):101-22.
105. Pagano G, Manini P, Bagchi D. Oxidative stress-related mechanisms are associated with xenobiotics exerting excess toxicity to Fanconi anemia cells. *Environ Health Perspect.* 2003;111(14):1699-703.
106. Mantelli M, Avanzini MA, Rosti V, Ingo DM, Conforti A, Novara F, et al. Comprehensive characterization of mesenchymal stromal cells from patients with Fanconi anaemia. *Br J Haematol.* 2015;170(6):826-36.
107. Lecourt S, Vanneaux V, Leblanc T, Leroux G, Ternaux B, Benbunan M, et al. Bone marrow microenvironment in fanconi anemia: a prospective functional study in a cohort of fanconi anemia patients. *Stem Cells Dev.* 2010;19(2):203-8.
108. Cagnan I, Cosgun E, Konu O, Uckan D, Gunel-Ozcan A. PKNOX2 expression and regulation in the bone marrow mesenchymal stem cells of Fanconi anemia patients and healthy donors. *Mol Biol Rep.* 2019;46(1):669-78.
109. Cagnan I, Gunel-Ozcan A, Aerts-Kaya F, Ameziane N, Kuskonmaz B, Dorsman J, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Carrying FANCD2 Mutation Differ from the Other Fanconi Anemia Complementation Groups in Terms of TGF-beta1 Production. *Stem Cell Rev Rep.* 2018;14(3):425-37.
110. Zhou Y, He Y, Xing W, Zhang P, Shi H, Chen S, et al. An abnormal bone marrow microenvironment contributes to hematopoietic dysfunction in Fanconi anemia. *Haematologica.* 2017;102(6):1017-27.
111. Schneider S, Unger M, van Griensven M, Balmayor ER. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. *Eur J Med Res.* 2017;22(1):17.
112. Duong MN, Cleret A, Matera EL, Chettab K, Mathe D, Valsesia-Wittmann S, et al. Adipose cells promote resistance of breast cancer cells to trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Breast Cancer Res.* 2015;17:57.
113. Chu DT, Phuong TNT, Tien NLB, Tran DK, Nguyen TT, Thanh VV, et al. The Effects of Adipocytes on the Regulation of Breast Cancer in the Tumor Microenvironment: An Update. *Cells.* 2019;8(8).
114. Luo G, He Y, Yu X. Bone Marrow Adipocyte: An Intimate Partner With Tumor Cells in Bone Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:339.
115. Castro I, Sampaio-Marques B, Ludovico P. Targeting Metabolic Reprogramming in Acute Myeloid Leukemia. *Cells.* 2019;8(9).
116. Rashkovan M, Ferrando A. Metabolic dependencies and vulnerabilities in leukemia. *Genes Dev.* 2019;33(21-22):1460-74.
117. Cuminetti V, Arranz L. Bone Marrow Adipocytes: The Enigmatic Components of the Hematopoietic Stem Cell Niche. *J Clin Med.* 2019;8(5).
118. Lu W, Weng W, Zhu Q, Zhai Y, Wan Y, Liu H, et al. Small bone marrow adipocytes predict poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2018;103(1):e21-e4.
119. Park SR, Oreffo RO, Triffitt JT. Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone.* 1999;24(6):549-54.
120. Lu Q, Liu H, Cao T. Efficient isolation of bone marrow adipocyte progenitors by silica microbeads incubation. *Stem Cells Dev.* 2013;22(18):2520-31.

121. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *J Tissue Eng.* 2015;6:2041731415592356.
122. Tavassoli M. Ultrastructural development of bone marrow adipose cell. *Acta Anat (Basel).* 1976;94(1):65-77.
123. Ravera S, Degan P, Sabatini F, Columbaro M, Dufour C, Cappelli E. Altered lipid metabolism could drive the bone marrow failure in fanconi anaemia. *Br J Haematol.* 2019;184(4):693-6.
124. Amarachintha S, Sertorio M, Wilson A, Li X, Pang Q. Fanconi Anemia Mesenchymal Stromal Cells-Derived Glycerophospholipids Skew Hematopoietic Stem Cell Differentiation Through Toll-Like Receptor Signaling. *Stem Cells.* 2015;33(11):3382-96.
125. Starling S. Characterizing bone marrow adipocytes. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(4):196.

8. EKLER

EK- 1: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Yazısı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -2139

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27 KASIM 2018 SALI
Toplantı No : 2018/28
Proje No : GO 18/1113 (Değerlendirme Tarihi: 27.11.2018)
Karar No : GO 18/1113-20

Üniversitemiz Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. İbrahim VARGEL, Öğr. Gör. Dr. Cansu Özdemir SAKA ile birlikte çalışacakları ve Gülsena TONYALI'nın yüksek lisans tezi olan, GO 18/1113 kayıt numaralı, "*Kemik İliği Yağ Tabakasından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Akut Myeloblastik Lösemi (AML) Patogenezine Etkilerinin İncelenmesi ve Subkutan Yağ Dokusu ve Kemik İliği Kökenli MKH'ler ile Karşılaştırılması*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Aralık 2018-01 Aralık 2020 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)	IZINLI	10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye)		11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SAKA (Üye)		12. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)		13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)
IZINLI		
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)		14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ (Üye)
IZINLI		
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)		15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR (Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)		16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye)
IZINLI		
8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)		17. Av. Meltem ONURLU (Üye)
9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)		

EK- 2: Turnitin dijital makbuz

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Gülsena Tonyali
 Ödev başlığı: KEMİK İLİĞİ YAĞ TABAKASINDAN ...
 Gönderi Başlığı: Kemik İliği Yağ Tabakasından Elde ...
 Dosya adı: Yeni_Microsoft_Word_Belgesi_2.docx
 Dosya boyutu: 8.25M
 Sayfa sayısı: 59
 Kelime sayısı: 13,212
 Karakter sayısı: 92,186
 Gönderim Tarihi: 09-Eyl-2020 12:45PM (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 1382709328



EK- 3: Turnitin ekran görüntüsü

Kemik İliği Yağ Tabakasından Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu ve Subkutan Yağ ve Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücreleri İle Karşılaştırılması

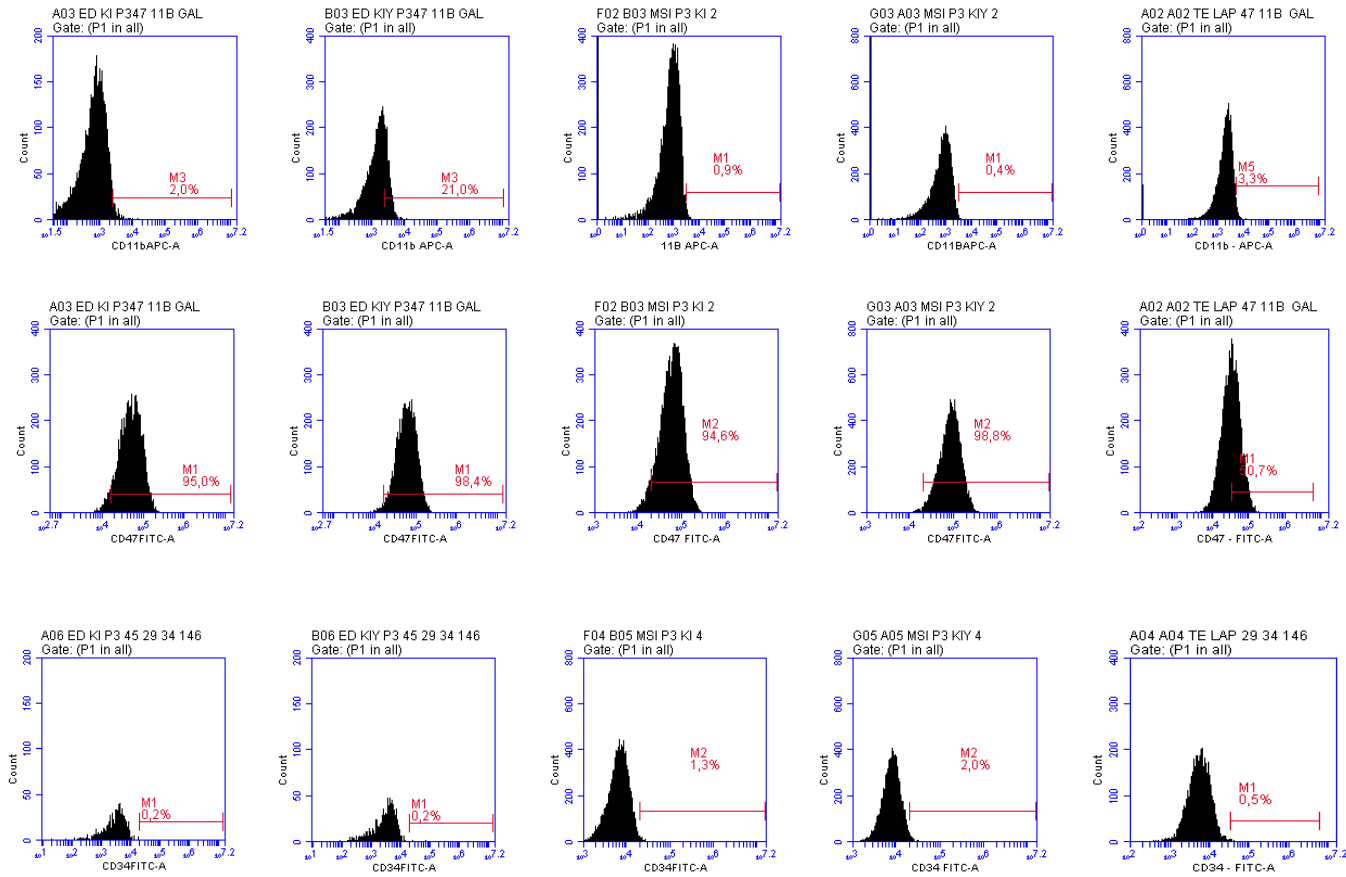
ORIJINALLIK RAPORU

%2	%1	%0	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

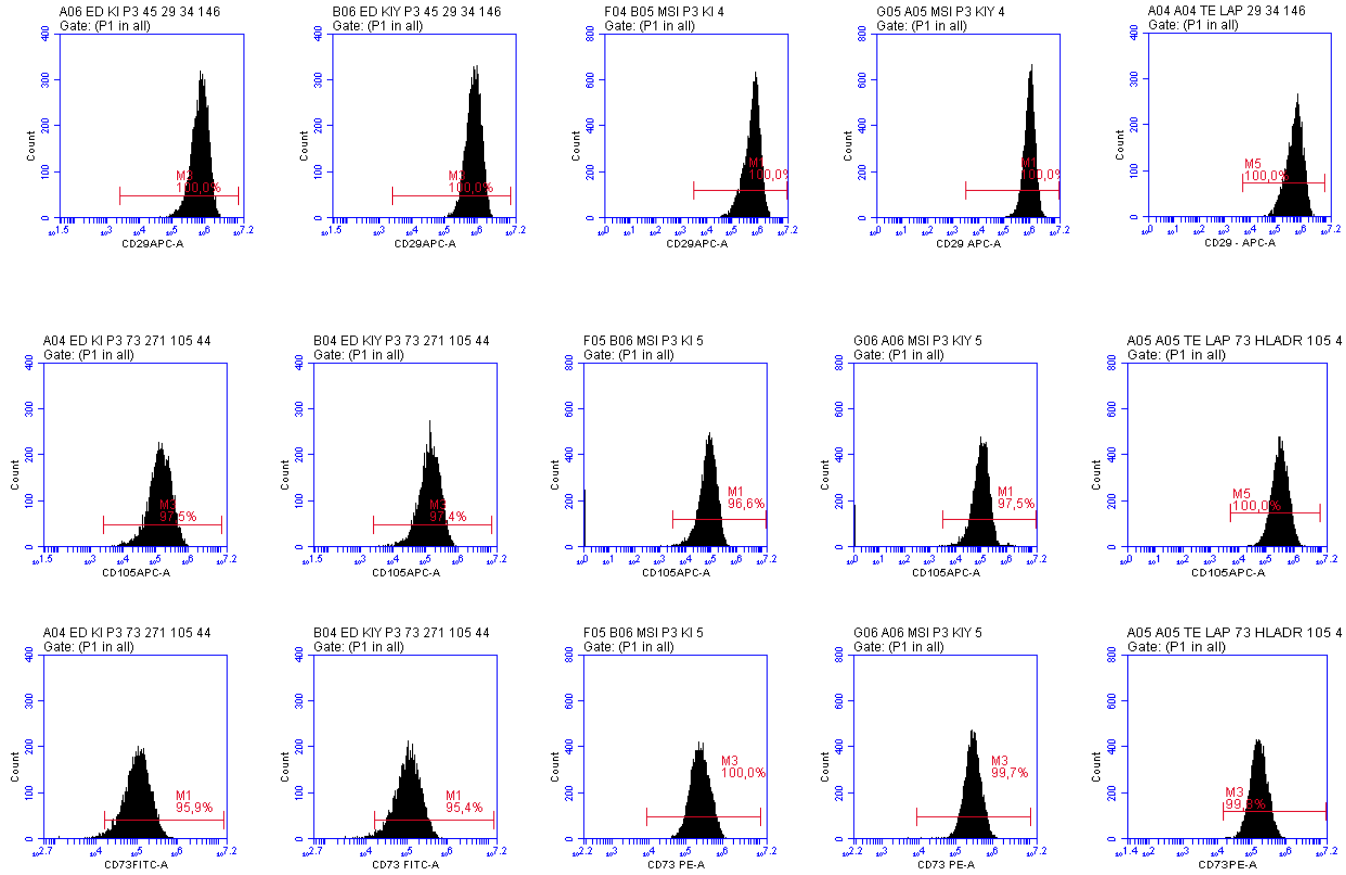
BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Kirikkale University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
3	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	openaccess.maltepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.uludagtezmerkezi.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1

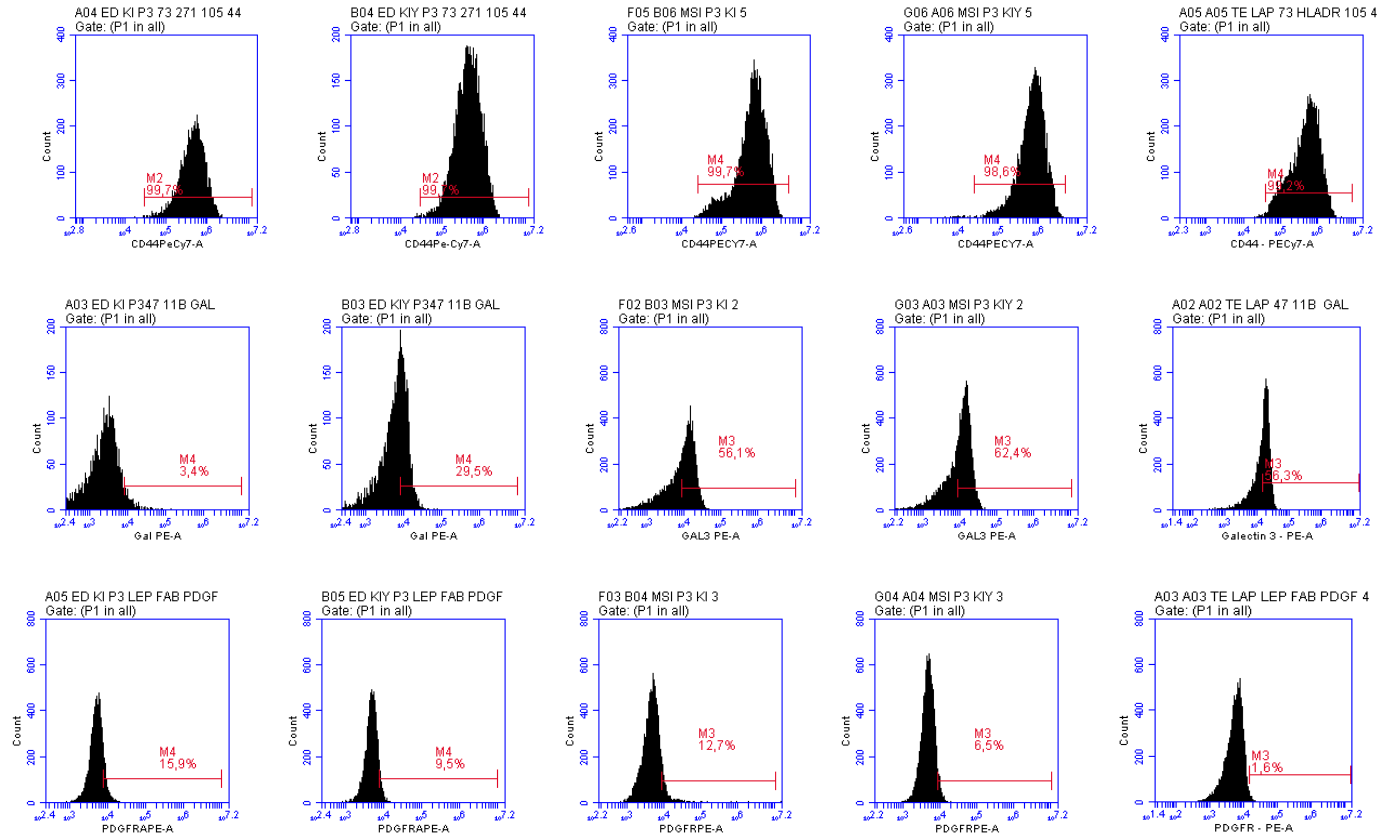
EK- 4: MKH'lerin akım sitometrik karakterizasyonlarına ait histogramlar



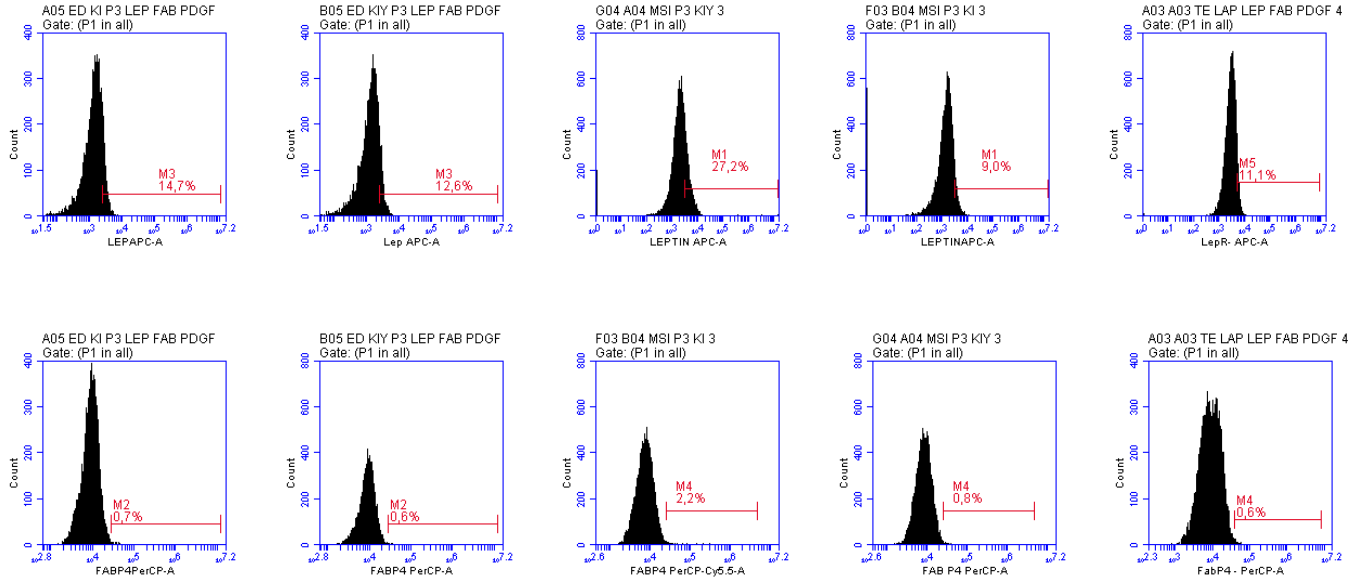
EK-4: Histogramlar (Devam)



EK-4: Histogramlar (Devam)



EK-4: Histogramlar (Devam)



9. ÖZGEÇMİŞ

I. Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı: Gülsena TONYALI

Doğum Tarihi ve Yeri: 13/07/1994 TRABZON

İletişim Adresi: Ertuğrulgazi mah. Cebeci Doruğu sk. No: 18/13 Cebeci Çankaya/ANKARA

Telefon: +90 0539 616 31 35

E-posta: gulsenatonyali@gmail.com

II. Eğitim

2017-... : Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre, Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Programı), Ankara, Türkiye; Ağırlıklı Not Ortalaması (GPA): 3,15/4.00

2012-2016: Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi (Lisans Programı), Ağırlıklı Not Ortalaması (GPA): 3.02/4.00

2006-2012: Trabzon Fatih Lisesi, Türkiye

III. Nitelikler

Anadil: Türkçe

Yabancı dil: İngilizce

IV. Laboratuvar Deneyimi ve İlgili Alanları

- Hücre Kültürü Teknikleri, Histokimyasal Boyama Teknikleri, Spektrofotometri, Akım Sitometrisi, Dokulardan Hücre İzolasyonu ve Kültürü, Kök-kültür, RNA izolasyonu, cDNA sentezi, qRT-PCR, Üç Boyutlu Kültür.
- Kemik iliği yağ dokusu-lösemi ve kemik iliği mikroçevresi etkileşimleri, Fankoni anemisinde lösemi gelişimi, Organoidler.

V. Yer Aldığı Projeler

- Karaciğer Rezeksiyonu Sonrası Karaciğer Yenilenmesinin Biyobelirteçlerinin Saptanması, Destek Alınan Kuruluş: TKAD (Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği), Yürütülen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Tıp Fakültesi Ankara, Türkiye